

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Distribution intracellulaire et trafic des récepteurs à  
tyrosine kinase EphA4 et EphB2 à la synapse mature  
dans le système nerveux central murin**

par

Bouvier David

Département de pathologie et biologie cellulaire  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en pathologie et biologie cellulaire  
option système nerveux

Avril, 2008

© David Bouvier, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Distribution intracellulaire et trafic des récepteurs à tyrosine kinase EphA4 et EphB2 à la  
synapse mature dans le système nerveux central murin

présentée par :  
David Bouvier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Karl J.L Fernandes, président-rapporteur  
Guy Doucet, directeur de recherche  
Adriana Di Polo, co-directrice  
Richard Robitaille, membre du jury  
Jean-François Cloutier, examinateur externe  
Nicole Leclerc, représentante du doyen de la FES

## Résumé

Les récepteurs EphA4 et EphB2 ont été impliqués dans la synaptogenèse et la potentialisation à long terme dans le cortex cérébral et l'hippocampe, où ils sont généralement perçus comme des récepteurs post-synaptiques. Cependant, les données actuelles sont difficiles à modéliser en termes mécanistes, en partie à cause du manque de connaissances quant à leur localisation et leur trafic cellulaires.

Pour déterminer la distribution précise de EphA4 et EphB2 aux synapses du cerveau adulte murin, nous avons utilisé le fractionnement cellulaire et la microscopie électronique. Nous avons observé que EphA4 et EphB2 étaient enrichis dans les microsomes et les synptosomes, et dans ces derniers, présents aux membranes et dans la fraction vésiculaire. Tous deux étaient aussi détectés dans les membranes jonctionnelles. Cependant, alors que EphA4 était fortement associé aux densités post-synaptiques, EphB2 en était facilement extrait avec des détergents. Par contre, les deux récepteurs étaient associés à la zone pré-synaptique active. En microscopie électronique, au niveau de l'hippocampe et du cortex, EphA4 fut principalement détecté dans les terminaisons axonales, alors que EphB2 fut plus souvent détecté dans les troncs dendritiques. Cependant, EphB2 a été plus fréquemment détecté dans les terminaisons axonales dans le thalamus ventro-basal.

La localisation sans équivoque de EphA4 et EphB2 dans des compartiments fonctionnels pré-synaptiques de la synapse suggérait que ces récepteurs pouvaient être impliqués dans le fonctionnement de la terminaison axonale. Pour évaluer cette question, nous avons examiné en détails l'association de EphA4 avec les vésicules synaptiques.

L'immunocytochimie en microscopie électronique et la séparation de la fraction vésiculaire sur un gradient linéaire de sucrose, ont montré que EphA4 était associé avec plusieurs types de vésicules. Nous avons alors procédé à l'immunoisolation de plusieurs sous-populations de vésicules. EphA4 a ainsi été associé à des vésicules synaptiques immunoisolées avec des anticorps contre la synaptophysine, VGLUT1 ou VGAT, mais n'a pas été détecté dans les vésicules de transport de la matrice pré-synaptique, immunoisolées avec un anti-piccolo. En microscopie électronique, le double immunomarquage de EphA4 avec VGLUT1 ou VGAT dans la région CA1 de l'hippocampe de souris adulte a révélé que EphA4 était associé à des vésicules dans des terminaisons axonales glutamatergiques, mais pas dans les gabaergiques. Cependant, le double marquage de EphA4 avec VGLUT1 ou VGAT, sur des neurones hippocampiques en culture, a montré une co-localisation fréquente avec les deux marqueurs vésiculaires. Un protocole de fractionnement, a aussi révélé la présence de EphA4 dans les vésicules à manteau de clathrine, dans lesquelles le récepteur pourrait être endocyté avec les composants des vésicules synaptiques. Finalement, l'expression de EphA4 à la surface cellulaire, telle que mesurée par immunocytochimie sans détergent, a été augmentée par une stimulation au KCl de l'activité électrique de neurones d'hippocampe en culture; ce qui est conséquent avec l'idée d'une présence de EphA4 dans les vésicules synaptiques.

La démonstration de la présence d'un récepteur Eph dans les vésicules synaptiques et dans les vésicules à manteau de clathrine est entièrement nouvelle et permet de poser des hypothèses originales sur les rôles de ces récepteurs à tyrosine kinase dans le cycle vésiculaire, l'endocytose et les mécanismes de plasticité synaptique.

**Mots-clés** : Récepteurs Eph, éphrines, zone active pré-synaptique, densité post-synaptique, vésicules synaptiques, vésicules à manteau de clathrine, fractionnement cellulaire, microscopie électronique, hippocampe, cortex cérébral.

## Abstract

The receptors EphA4 and EphB2 have been implicated in synaptogenesis and long-term potentiation in the cerebral cortex and hippocampus of adult brain, where they are generally viewed as postsynaptic receptors. However, most of current data of their functions at the synapse are hardly interpretable in terms of mechanisms, partly due to the lack of knowledge on their subcellular localization and trafficking.

To determine the precise distribution of EphA4 and EphB2 in mature brain synapses, we used cell fractionation and immunocytochemistry in electron microscopy. EphA4 and EphB2 were both enriched in microsomes and synaptosomes. In synaptosomes, they were present in the membrane and the synaptic vesicle fractions. Both receptors were attached to the junctional matrices, but while EphA4 was tightly associated with postsynaptic density fractions, EphB2 was easily extracted with detergents. In contrast, both receptors were found in the presynaptic active zone fraction. By electron microscopy, EphA4 was mainly detected in axon terminals, whereas EphB2 was more frequently detected in large dendritic shafts, in the hippocampus and cerebral cortex. Both receptors were nevertheless detected frequently in dendritic spines. In contrast, in the ventrobasal thalamus, EphB2 was detected most frequently in axon terminals.

The clear localization of EphA4 and EphB2 in functional presynaptic compartments of mature synapse suggested that Eph receptors were implicated in the function of the axonal terminals. To address this hypothesis further, we examined the association of EphA4 with various types of vesicles. Immunocytochemistry in electron microscopy and further

fractionation of the vesicular fraction, on a linear sucrose density gradient, confirmed that EphA4 was indeed associated with various types of vesicles. We therefore proceeded to the immunoisolation of different subpopulation of vesicles. EphA4 was detected in synaptic vesicles, immunoisolated with antibodies anti-synaptophysin, anti-VGLUT1 or anti-VGAT, but not in piccolo-bassoon transport vesicles, immunoisolated with an anti-piccolo antibody. Dual immunolabeling in electron microscopy of EphA4 with VGLUT1 or VGAT in the CA1 region of adult mouse hippocampus revealed that EphA4 was detected only in glutamatergic, and not in gabaergic axon terminals. In contrast, double immunofluorescence for the same molecules on hippocampal neurons at DIV 15 in culture showed a frequent co-localization of EphA4 with both vesicular markers on hippocampal cell neurites. The receptor was also detected in a cell fractionation preparation of clathrin-coated vesicles (CCVs), in which the receptor could be endocytosed with synaptic vesicle components. Finally, we observed that the cell surface expression of EphA4, as measured in immunofluorescence without detergent, was increased following KCl stimulation of the neuronal activity; which is consistent with the presence of EphA4 in synaptic vesicles.

The demonstration of an Eph receptor in synaptic and clathrin-coated vesicles is totally novel and raises new hypotheses about the potential roles of these molecules in the vesicle cycle, endocytosis, and synaptic plasticity.



**Keywords:** Eph receptors, ephrins, presynaptic active zone, post-synaptic density, synaptic vesicles, clathrin-coated vesicles, cell fractionation, electron microscopy, cerebral cortex, hippocampus.

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract .....	vi
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures .....	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Chapitre I - Introduction.....	1
I.1. Les récepteurs Eph : Découverte et caractéristiques communes .....	2
I.1.1. Les Eph et les éphrines. ....	2
I.1.2. Les Eph dans le règne animal .....	3
I.1.3. Structure.....	4
I.1.4. Liaisons Eph - éphrines et activation réciproque.....	6
I.1.5. La signalisation bidirectionnelle.....	7
I.1.5.1. Mécanismes généraux.....	7
I.1.5.2. Signalisation des récepteurs EphA4 et EphB2 via les protéines Rho.....	9
I.1.5.3. Signalisation Eph par les protéines Ras.....	14
I.1.6. Répulsion et adhérence .....	15
I.1.6.1. Répulsion .....	16
I.1.6.2. Adhérence .....	18
I.2. Implication des Eph dans le développement du SNC.....	19
I.2.1 Prolifération et différenciation cellulaires .....	19
I.2.2. Segmentation et compartimentation .....	21
I.2.3. Développement des connexions neuronales .....	22
I.2.3.1. Guidage de la croissance axonale .....	22
I.2.3.2. Cartographie et topographie.....	25
I.3. Présence et rôles des Eph et des éphrines dans le SNC adulte .....	27
I.3.1. Distribution des Eph et des éphrines dans le SNC mature .....	28

I.3.1.1. Distributions régionales .....	28
I.3.1.2. Distributions subcellulaires et synaptiques .....	29
I.3.2. Éphrines, Eph et plasticité synaptique .....	34
I.3.2.1. Éphrines, Eph et morphogenèse des épines dendritiques .....	34
I.3.2.3. Les Eph dans la transmission et la plasticité synaptique .....	41
I.4. Structure, formation et fonctionnement d'une synapse chimique .....	51
I.4.1. Structure de la synapse chimique.....	51
I.4.2. Formation et maintien des terminaisons pré-synaptiques.....	53
I.4.3. Activité synaptique et trafic vésiculaire.....	55
I.5. Hypothèses de travail et objectifs .....	56
I.5.1. Hypothèses.....	56
I.5.2. Objectifs de recherche .....	58
 Chapitre II - Presynaptic and postsynaptic localization of EphA4 and EphB2 in adult mouse forebrain .....	59
 Chapitre III - EphA4 is associated with synaptic and clathrin-coated vesicles in synapses of adult mouse brain .....	122
 Chapitre IV - Discussion.....	170
IV.1. Résumé de la recherche .....	171
IV.1.1. EphA4 et EphB2: distribution pré- et post-synaptique .....	171
IV.1.2. Association de EphA4 avec les vésicules synaptiques et vésicules à manteau de clathrine.....	172
IV.2. EphA4 et EphB2 dans le fonctionnement des synapses .....	174
IV.2.1. Fonctions ou rôles post-synaptiques .....	175
IV.2.1.1. EphA4, un récepteur à plusieurs compétences .....	175
IV.2.1.2. EphB2 associé aux dendrites .....	177

IV.3. Rôle potentiel des Eph au niveau des terminaisons axonales .....	178
IV.3.1 Les Eph en transit sur les vésicules synaptiques.....	178
IV.3.2. Les Eph comme molécules d'adhérence pour le maintien des synapses .....	179
IV.3.3. Rôle potentiel des Eph dans l'endocytose dépendante de la clathrine.....	180
IV. 4. EphA4 et EphB2 dans l'activité synaptique .....	186
IV.4.1. EphA4 aux synapses excitatrices et inhibitrices. ....	186
IV.4.2 Liens avec la LTP et la LTD revisités .....	187
IV. 5. Bilan et avenues de recherche.....	190
IV.5.1. Les Eph en pré-synaptique : un travail de recherche pertinent à continuer ...	190
IV.5.2. Perspectives pathologiques .....	191
Conclusion .....	192
Bibliographie.....	194
Curriculum Vitae.....	I

## Liste des tableaux

Table 1. Neuropil distribution of the silver-intensified immunogold particles for EphA4 and EphB2.....	97
--	----

## Liste des figures

### CHAPITRE I

Figure 1: Structure des récepteurs Eph et des éphrines.....	6
Figure 2: Exemples de voie de signalisation par les protéines Rho induites par l'activation de récepteurs EphA .....	12
Figure 3: Exemples de voie de signalisation par les protéines Rho induites par l'activation de récepteurs EphB .....	14

### CHAPITRE II

Figure 1: Representative examples of Western blots following cell fractionation of the adult mouse forebrain/midbrain.....	100
Figure 2: Extraction of postsynaptic densities (PSDs) from purified synaptosomes.....	102
Figure 3: Separation of pre- and post-synaptic densities from purified synaptosomes shows that EphA4, but maybe not EphB2, is associated with both sides of synapses.....	104
Figure 4 : EphA4 is preferentially expressed in axon terminals and dendritic spines in area CA3 of the hippocampus.....	106
Figure 5: Pre-embedding immunogold labeling of the hippocampus showing the distributions of EphA4 and EphB2. ....	108
Figure 6 : Distribution of A) EphA4-associated SIGPs in areas CA1 and CA3 of the hippocampus and deep layers of the primary motor cortex (CtxD), and B) EphB2-associated SIGPs in the same regions and in the ventrobasal thalamus (Thal). ....	110
Figure 7 : Localisation of SIGPs at the organelle level. ....	112
Figure 8 : Distribution of SIGPs in axon terminals or dendritic spines, for EphA4 and EphB2.....	114
 Figure S1: Western blots from lysates of HEK293 human embryonal epithelial cells transfected with EphB2 or EphB4 and probed with anti-EphB2 or anti-EphB4	

antibodies demonstrate the specificity of the anti-EphB2 antibody used in the present study. ....	116
Figure S 2: EphB2 immunoperoxidase staining of the hippocampus and dentate gyrus (DG) in light microscopy. ....	118
Figure S 3. Distribution of EphB2-associated SIGPs (black particles) compared to a similar number of virtual particles, or VPs (red) of a comparable size, overlaid on the same electron micrograph. ....	120

### CHAPITRE III

Figure 1 : Electron microscope immunocytochemistry for EphA4 in the CA1 region of adult mouse hippocampus showing that the immunostaining sometimes decorates all synaptic vesicles in an axon terminal profile and sometimes is restricted to only a subgroup of such vesicles. ....	156
Figure 2 : Distribution of EphA4 in an LP2 fraction layered on a linear 10-35% sucrose density gradient. ....	158
Figure 3 : Immunoisolation of synaptic and piccolo-bassoon transport vesicles from the LS1 cell fraction. ....	160
Figure 4 : Isolation of clathrin-coated vesicles by cell fractionation. ....	162
Figure 5: Double immunocytochemistry for EphA4 with VGLUT or VGAT in the CA1 region of adult mouse hippocampus show that EphA4 is co-localized with VGLUT1 in glutamatergic axon terminals, but appears absent from gabaergic terminals labeled for VGAT. ....	164
Figure 6 : Double immunocytochemistry for EphA4 with VGLUT1 or VGAT on hippocampal neurons at DIV15 in culture. ....	166
Figure 7 : Cell surface expression EphA4 is modulated by neuronal activity in DIV 15 hippocampal cultures. ....	168

## Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate
AP-2	<i>Adaptator Protein-2</i>
Arg	<i>Abl related gene</i>
Arp 2/3	<i>Actine-related protein 2/3</i>
ARN	acide ribonucléique
CaMKII	<i>Calcium-calmoduline-dependant kinase II</i>
Cas	<i>Crk associated substrate</i>
CCVs	<i>Clathrin-Coated Vesicles</i>
Cdk5	<i>Cyclin dependant kinase 5</i>
COS7	Fibroblastes transformés de rein de singe vert africain
DAG	Diacylglycérol
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Ephrin	<i>Eph family receptor interacting proteins</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factors</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GPI	Glycosyl phosphatidylinositol
Grb10	<i>Growth factor receptor bound 10</i>



GRIP	<i>Glutamate Receptor Interacting Protein</i>
GST	Gluthation-S transferase
HEK 293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i>
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>
IP3	1,4,5-trisphosphate
KIF	<i>Kinesin Family member</i>
LIM	<i>Lipase-Inactive Mutant</i>
LTD	<i>Long Term Depression</i>
LTP	<i>Long Term Potentiation</i>
Pak	<i>p21 activated kinase</i>
PDZ	<i>Postsynaptic density, Disc large, Zona occludens</i>
PI3	phosphatidylinositol-3
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PRD	<i>Proline Rich Domain</i>
MAGUK	<i>Membrane Associated Guanylate Kinase proteins</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MDCK	<i>Mardin-Darby Canin Kidney</i>
NMDA	N-methyl-D-Aspartate
N-WASP	<i>Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
PICK1	<i>Protein that interacts with C kinase1</i>
PLC $\gamma$	Phospholipase-C gamma

PSD	<i>Post Synaptic Densities</i>
PTV	<i>Piccolo/Bassoon Transport Vesicles</i>
Pyk2	<i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i>
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
SAM	<i>Sterile Alpha-Motif</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SHEP 1	<i>SH2 domain-containing Eph receptor-binding protein</i>
SynCAMs	<i>Synaptic Cell Adhesion Molecules</i>
SNC	Système nerveux central
RAGS	<i>Repulsive Axon Guidance Signal</i>
RCG	cellules ganglionnaires de la rétine
VGAT	<i>Vesicular GABA Transporter</i>
VGLUT	<i>Vesicular Glutamate Transporter</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

*À Annie et Thierry pour m'avoir donné  
équilibre et racines, à Marie-Antoinette, qui  
aurait été si fière, et à Isabel qui a donné un  
sens à tout cela.*

## Remerciements

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce doctorat.

Merci tout d'abord à mon directeur de recherche, le Dr Guy Doucet, qui m'a offert la possibilité de venir étudier à Montréal, une ville si active dans le domaine des neurosciences. Je le remercie de m'avoir accordé sa confiance, son soutien, et ses critiques pertinentes ; de m'avoir poussé à travailler de façon autonome et responsable ; et de m'avoir financé. Merci à mes précieux collaborateurs, Tidjane Corera, Ted Fon et Keith Murai pour leur générosité, enthousiasme et pour leurs enseignements. Merci à Marie-Ève Tremblay pour sa collaboration à mon travail. Merci aux nombreux étudiants du laboratoire pour leur gentillesse et interactivité. Merci à Michel Lauzon pour sa précieuse expertise. Merci à mes amis et collègues du département de pathologie et biologie cellulaire, qui ont enrichi mon quotidien, et qui m'ont apporté aides, conseils et amitiés, Sophie, Michel, Denis, Céline, Grégoire, Johanne, Nicole, Fred, Annie et Christiane.

Merci à mes parents, Annie et Thierry, pour leur soutien inconditionnel et leur chaleur immense, ainsi qu'à toute ma famille, ma petite sœur Amandine bientôt maman, Nadette, Ana et Javier, si généreux, Elena, Miguel, Carlos et Cris. Merci à mes amis de chaque jour, Baptiste, Patrick, Jean-Nicolas, Sébastien, Jacques et Louise, pour leur écoute et réconfort.

Enfin, le plus grand merci de tous à Isabel, qui fait battre mon cœur d'instantanés féériques, et qui me donne tant de force et de courage.

**Chapitre I**  
**Introduction**

## **I.1. Les récepteurs Eph : Découverte et caractéristiques communes**

### **I.1.1. Les Eph et les éphrines.**

Le premier récepteur Eph fut identifié en 1987 dans un contexte de recherche d'identification d'un récepteur à tyrosine kinase impliqué dans le cancer (Hirai *et al.* 1987). Ce récepteur a été nommé Eph d'après la lignée cellulaire dont provenait l'ADN complémentaire qui a servi à l'identifier, c'est à dire d'après la lignée des carcinomes hépatocellulaires produisant l'érythropoïétine (*Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma cell*).

Les Eph représentent la plus grande famille de récepteurs à tyrosine kinase du règne animal. Elle est représentée par 16 récepteurs chez les vertébrés, dont 14 chez les mammifères. Les récepteurs ont tout d'abord été considérés comme « orphelins » jusqu'au milieu des années 90, alors que leurs premiers ligands ont été identifiés et dénommés Elf (pour *Eph ligand family*) (Bergemann *et al.* 1995). La nomenclature de ces récepteurs et de leurs ligands est devenue complexe, au cours du temps, et au gré de l'identification de nouveaux candidats chez diverses espèces. Elle a été simplifiée depuis (Eph Nomenclature Committee 1997) (voir aussi : <http://eph-nomenclature.med.harvard.edu/> ). Les Eph sont maintenant catégorisés en deux sous-familles, A (A1- A10) et B (B1- B6), sur la base de leur homologie de séquence extracellulaire et de leur affinité de liaison avec les ligands éphrines de type A ou B (Himanen & Nikolov 2003). Les éphrines, ou « protéines

interagissant avec les récepteurs Eph » (*Eph receptor interacting proteins*), se distinguent entre elles par leur mode d'insertion à la membrane cellulaire. Les éphrines-A sont liées à la membrane par une ancre de type GPI (glycosyl phosphatidylinositol) alors que les éphrines-B possèdent des domaines transmembranaires et cytoplasmiques. La classification numérogique des Eph et des éphrines reflète l'ordre de publication de leur séquence. Si, globalement, les éphrines-A se lient aux EphA et les éphrines-B aux EphB, il existe des exceptions, comme EphA4 qui lie aussi les éphrines-B2 et -B3 (Gale *et al.* 1996) et EphB2 qui lie l'éphrine-A5 en plus des éphrines-B (Himanen *et al.* 2004).

### **I.1.2. Les Eph dans le règne animal**

Les Eph sont présents dans tous le règne animal (Gu & Gu 2003, Drescher 2002). Cette famille a été initialement identifiée chez les vertébrés, puis chez d'autres chordés (amphioxus) (Suga *et al.* 1999a), chez les arthropodes (drosophile) (Scully *et al.* 1999), les nématodes (*C. elegans*) (Zallen *et al.* 1999) et les éponges (Suga *et al.* 1999b). Chez les éponges, le domaine et la structure des récepteurs sont conservés. Chez *C.elegans*, les Eph sont représentés par deux membres, VAB1 et VAB2, et les éphrines par quatre protéines à ancre GPI (EFN1-4) (George *et al.* 1998, Chin-Sang *et al.* 1999, Mohamed & Chin-Sang 2006, Wang *et al.* 1999) mais qui ont néanmoins une plus forte homologie avec le domaine extracellulaire des éphrines-B des vertébrés. Leurs fonctions sont notamment liées aux processus morphogéniques précoces de l'embryon et au développement du système nerveux, mais aussi du système cardio-vasculaire (Zhang & Hughes 2006). La famille des

Eph est très nombreuse et elle est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme dans différents tissus (Merlos-Suarez & Batlle 2008).

Cependant, cette thèse traitera essentiellement de la localisation et des rôles de ces récepteurs dans le système nerveux central (SNC) des mammifères, principalement chez l'adulte, et avec une emphase particulière sur les récepteurs EphA4 et EphB2, qui ont été les plus étudiés et qui sont les sujets de cette recherche doctorale.

### **I.1.3. Structure**

Malgré leur grand nombre, les récepteurs à tyrosine kinase possèdent une structure moléculaire, en domaine, très bien conservée ( Figure 1). Dans le cas des récepteurs Eph, ils possèdent un domaine globulaire de liaison aux éphrines qui est localisé dans leur partie amino-terminale extracellulaire. Ce domaine est suivi par un domaine riche en cystéines, contenant un motif de type « facteur de croissance épidermique » (ou EGF pour *Epidermal growth factor*) et par deux répétitions fibronectines de type III précédant le domaine transmembranaire. Du côté intracellulaire, le domaine kinase est séparé de la membrane par un domaine juxta-membranaire contenant deux tyrosines phosphorylables. Enfin, la partie carboxy-terminale de ces protéines est composée d'un domaine à motif stérile alpha (SAM pour *Sterile Alpha-Motif*), d'environ 70 acides aminés, et d'un motif de liaison aux domaines de type PDZ (*Postsynaptic density, Disc large, Zona occludens*). Le domaine SAM pourrait permettre l'agrégation des récepteurs en dimères ou oligomères (Qiao & Bowie 2005). Les domaines PDZ sont des domaines d'interactions protéiques souvent



associés aux protéines d'échafaudage, indispensables à l'assemblage de complexes multimoléculaires, notamment aux niveaux des jonctions intercellulaires, incluant les synapses, et au trafic intracellulaire (Li & Sheng 2003, Kim & Sheng 2004).

Dans le cas des éphrines, qui sont de petites protéines, le domaine extracellulaire n'est constitué que d'un domaine de liaison aux récepteurs Eph et d'un domaine de liaison à la membrane. Les éphrines-A sont synthétisées avec un court domaine carboxy-terminal, remplacé ensuite, au niveau du réticulum endoplasmique, par une ancre GPI qui les attache à la membrane. Les éphrines-B possèdent un domaine transmembranaire terminé en carboxy-terminal par un motif de liaison aux domaines PDZ.

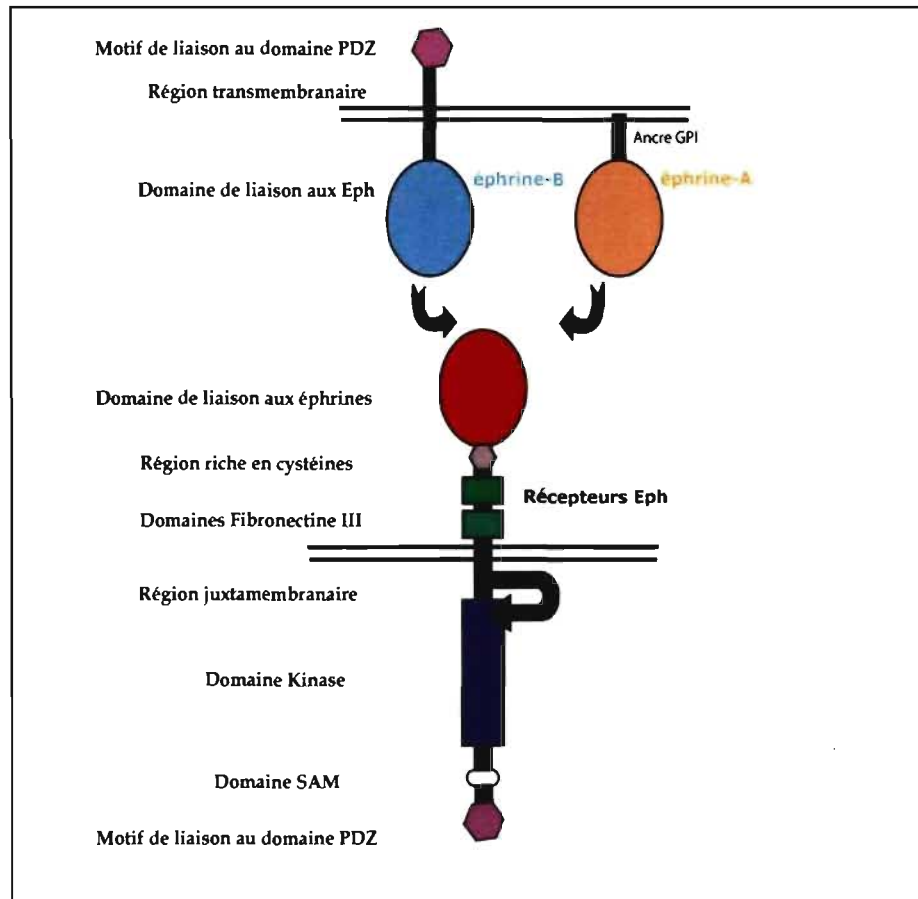


Figure 1: Structure des récepteurs Eph et des éphrines

#### I.1.4. Liaisons Eph - éphrines et activation réciproque

En plus d'être nombreux, les récepteurs Eph et les éphrines montrent un haut degré de promiscuité dans l'affinité de leurs liaisons ligands-récepteurs. En effet, un ligand donné peut se lier à plusieurs récepteurs et vice-versa.

L'interaction en « trans » entre un récepteur Eph et une éphrine, entre deux cellules adjacentes, forme tout d'abord un complexe Eph-éphrine monovalent (Figures 2 et 3). La liaison s'opère entre le domaine globulaire du récepteur et une boucle hydrophobe

protubérante du ligand, qui vient se loger dans sa cavité (Xu *et al.* 2003). Le récepteur et le ligand subissent alors des changements considérables dans leurs conformations réciproques. Cela promeut le recrutement et l'oligomérisation d'un autre hétérodimère et la formation d'un complexe tétramérique. Les complexes Eph-éphrines s'agrègent ainsi aux sites de contact cellulaire. Le degré de multimérisation affecte directement les réponses cellulaires et biochimiques aux sites d'interactions des éphrines et Eph (Stein *et al.* 1998). La proximité physique et les interactions conduisent à une réorientation et à une phosphorylation réciproque des résidus tyrosine sur les molécules agrégées (Kalo & Pasquale 1999, Himanen *et al.* 2001) déclenchant ainsi des cascades de signalisation intracellulaire.

### **I.1.5. La signalisation bidirectionnelle**

#### **I.1.5.1. Mécanismes généraux**

Les récepteurs Eph et les éphrines ont la particularité de déclencher une signalisation bidirectionnelle, c'est-à-dire des cascades de signalisation de part et d'autre du contact, dans les cellules adjacentes portant respectivement le récepteur et le ligand.

L'autophosphorylation du récepteur, sur les deux résidus tyrosine conservés dans la région juxtamembranaire, libère son domaine kinase de l'inhibition exercée par celle-ci (Hubbard 2001, Wybenga-Groot *et al.* 2001, Binns *et al.* 2000). Cela est suivi d'une trans-phosphorylation des domaines tyrosine kinase entre les monomères proximaux, permettant le recrutement de protéines de signalisation à domaines d'homologie Src de type 2 (SH2

pour *Src homology 2*), et la formation de complexes de signalisation. Diverses protéines à domaines SH2 ont déjà été démontrées comme interagissant avec des récepteurs Eph activés telles les Src kinases, la phospholipase-C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), la kinase du phosphatidylinositol-3 (PI3 kinase), les tyrosine kinases Abl et Arg (*Abl related gene*), les protéines activant les GTPases Ras ou RasGAP (GAP pour *GTPase activating protein*), les protéines adaptatrices Crk, Grb10 (*Growth factor receptor bound-10*) et SHEP-1 (*SH2 domain-containing Eph receptor-binding protein-1*) (Kullander & Klein 2002). Les protéines de signalisation à domaines PDZ et certains membres de la famille des facteurs d'échanges du nucléotide guanylique (ou GEFs pour *Guanine nucleotide Exchange Factors*), interagissent avec les récepteurs Eph indépendamment de la phosphorylation.

Comme nous l'avons mentionné, les éphrines sont aussi capables de transmettre un signal à leur cellule d'attache, on parle alors de signal inverse. Bien que les éphrines-A n'aient pas de domaine intracellulaire et que les deux sous-familles d'éphrines ne possèdent aucun domaine catalytique, les deux peuvent induire un signal de transduction et d'activation. Le mécanisme de signalisation des éphrines-A, à ancre GPI, n'est pas connu mais celles-ci sont capables d'activer les membres de la famille des kinases Src et de participer à la signalisation des intégrines (Davy *et al.* 1999, Davy & Robbins 2000, Huai & Drescher 2001). L'activation des éphrines-B induit un recrutement de molécules capables de phosphoryler leurs résidus tyrosine sur leur partie C-terminale, telles les protéines Src, Fyn et Yes (Holland *et al.* 1996, Palmer *et al.* 2002). Leur motif de liaison aux domaines PDZ permet également la liaison à des protéines à domaines PDZ comme la

synténine, PICK1 (*Protein that Interacts with C Kinase1*) (Torres *et al.* 1998), ou les GRIPs (*Glutamate Receptor Interacting Protein*) (Torres *et al.* 1998, Hoogenraad *et al.* 2005).

On a rapporté que les éphrines devaient être agrégées pour pouvoir activer les récepteurs Eph, et vice et versa (Davis *et al.* 1994). À cette fin, on utilise généralement des protéines de fusion comprenant le domaine extracellulaire des éphrine ou Eph et le fragment Fc<sub>γ</sub> des immunoglobulines-G humaines, préalablement agrégées par une incubation avec un anticorps dirigé contre le fragment Fc<sub>γ</sub>. Aussi, on présume, en général, que les constructions Eph-Fc ou éphrine-Fc non agrégée agissent comme des antagonistes des formes agrégées, ou de leur équivalents endogènes exprimés sur les membranes cellulaires (Gerlai *et al.* 1998). Malgré l'utilisation fréquente de ces outils à partir des principes énoncés précédemment, il a aussi été démontré que l'utilisation d'éphrine-A-Fc non agrégée pouvait aussi stimuler la phosphorylation d'un EphA (Gerlai *et al.* 1999). Ceci complique donc l'interprétation des études dans ce domaine (en sus des difficultés liées à la grande promiscuité des interactions Eph-éphrines).

#### **I.1.5.2. Signalisation des récepteurs EphA4 et EphB2 via les protéines Rho**

Les cascades de signalisation induites par les Eph et les éphrines entraînent une modification du cytosquelette via une régulation de la dynamique de l'actine, notamment par les petites GTPases monomériques de la famille des Rho (RhoA, Rac et Cdc42) et des Ras. Ces GTPases agissent en tant qu'interrupteurs moléculaires, en cycle entre leur forme

GDP, inactive, et leur forme GTP, active, modulant ainsi des effecteurs en aval comme l'actine. Dans le SNC, l'activation de RhoA favoriserait un signal répulsif, comme la rétraction du cône de croissance dans le guidage axonal, alors que Rac1 et Cdc42 promeuvent son extension (Etienne-Manneville & Hall 2002, Ethell & Pasquale 2005). Les GTPases Rho sont contrôlées par des familles de protéines à effets opposés. Les GEFs transforment les GTPases en forme active, en catalysant l'échange de la GDP contre la GTP. Inversement, les protéines activatrices de l'activité GTPase (GAPs pour *GTPase activating protein*) inactivent les protéines G en favorisant l'hydrolyse du GTP en GDP.

Cette section présente quelques voies de signalisations, impliquant les protéines Rho, induites lors de l'activation de récepteurs EphA (EphA4) ou EphB (EphB2).

#### *1.1.5.2.1. Voies de signalisation induites lors de l'activation de EphA4.*

L'éphexine est une protéine de la famille des Dbl, qui sont des RhoGEFs. Elle est fortement exprimée dans le SNC et se lie au récepteur EphA4 (Shamah *et al.* 2001), formant ainsi un lien avec la voie de signalisation avec les GTPases Rho. En l'absence de stimulation par les éphrines, l'éphexine active les protéines RhoA, Rac-1 et Cdc42, permettant une balance de l'activité GTPasique et favorisant une croissance axonale. Ce GEF est phosphorylé à la suite de l'activation du récepteur EphA4 par l'éphrine-A1 agrégée, et cette phosphorylation semble essentielle à la dépolymérisation des filaments d'actine. En effet, la phosphorylation de l'éphexine favoriserait son activité GEF sur la protéine Rho A, sans alterner son activité basale sur Rac-1 et Cdc42 (Sahin *et al.* 2005),

ceci entraînant un changement local de l'activité GTPasique des Rho, et par conséquent une stimulation de la contractilité et un affaissement local du cône de croissance. Ce mécanisme permettrait ainsi de contrôler le cytosquelette d'actine dans un contexte de croissance axonale.

Un autre RhoGEF, Vav2, a été identifié comme un effecteur important dans la signalisation Eph au cours de la croissance axonale (Cowan *et al.* 2005). Cette protéine qui est majoritairement exprimée à des stades embryonnaires, est localisée sur les neurites et synapses. Vav2 peut se lier directement aux tyrosines phosphorylées de la région juxtamembranaire de EphA4. Ainsi, une stimulation par des éphrines-A1-Fc agrégées de neurones en culture provoque la phosphorylation et l'activation de Vav2. Des tests *in vitro* sur des neurones de souris doubles knockouts Vav 2 *-/-* Vav3 *-/-* ont montré des déficits d'endocytose des complexes Eph-éphrines et une atténuation de l'affaissement des cônes de croissance lors d'une stimulation avec les éphrines-A1-Fc agrégées (Cowan *et al.* 2005). Vav2, en régulant l'endocytose des récepteurs activés, pourrait donc être impliqué dans une modulation du signal de répulsion induit par les Eph.

La contribution des Rho GAPs dans le contrôle de la dynamique de l'actine en aval de la signalisation induite par les récepteurs Eph a été nouvellement mise en valeur par la découverte d'une interaction entre EphA4 et les  $\alpha$ -chimérines. Les chimérines sont des GAPs avec une activité spécifique pour Rac, celle-ci étant fortement exprimée dans le cerveau et ayant un rôle reconnu dans le guidage axonal. Les  $\alpha$ -1 et  $\alpha$ -2 chimérines

interagiraient toutes deux avec EphA4 au niveau de ses domaines SH2 et kinase, mais indépendamment de l'activité kinase (Beg *et al.* 2007, Dalva 2007, Iwasato *et al.* 2007, Wegmeyer *et al.* 2007). À l'état activé, EphA4 favoriserait l'activité GAP de l' $\alpha$ -2 chimérine sur Rac-1 et, par ce biais, modulerait la morphologie des cônes de croissance (Shi *et al.* 2007).

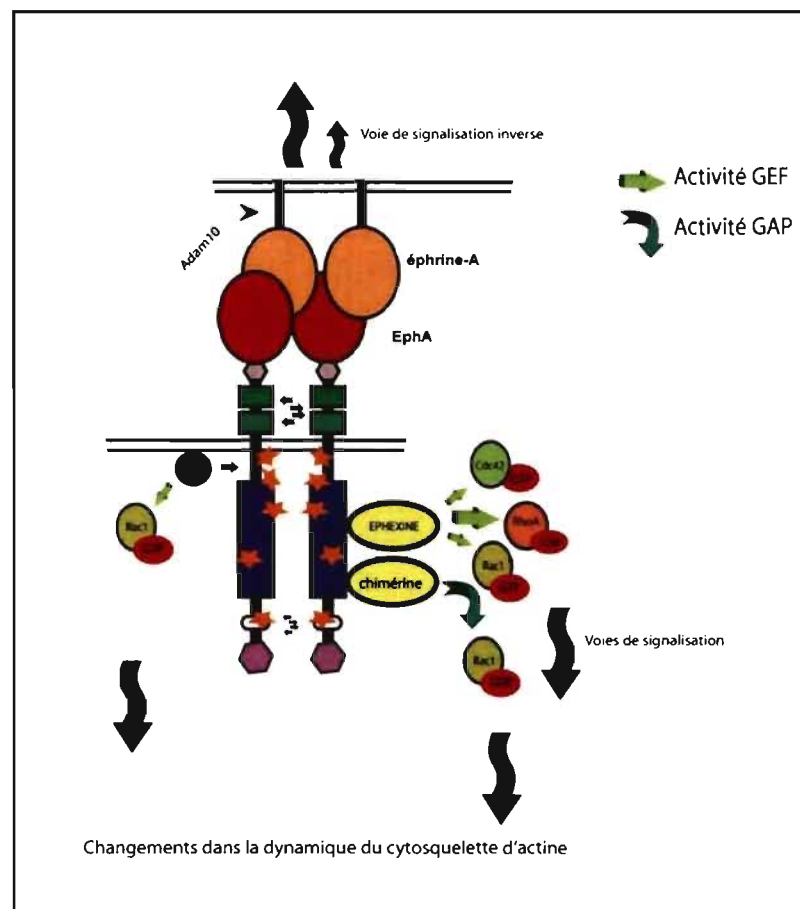


Figure 2: Exemples de voie de signalisation par les protéines Rho induites par l'activation de récepteurs EphA



#### *1.1.5.2.2. Voies de signalisation induites lors de l'activation de EphB2*

Les EphB participent également à la régulation du cytosquelette d'actine via la signalisation par la famille des Rho.

La RhoGEF, la kalirine, active la GTPase Rac1, par l'intermédiaire de son effecteur Pak (*p21 activated kinase*). La kalirine est phosphorylée en réponse à l'activation en amont du récepteur EphB2 au niveau des épines dendritiques (Penzes *et al.* 2003). La kalirine se lierait à EphB2 par son domaine PDZ. Ce signal favoriserait la formation d'épines dans des neurones hippocampiques stimulés avec l'éphrine-B1-Fc agrégée.

EphB2 est aussi associé physiquement à l'intersectine, un autre GEF, qui agit sur la Cdc42 et dont l'activité dépend d'une coopération avec la protéine adaptatrice N-WASP (*Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) (Irie & Yamaguchi 2002). Cdc42 et N-WASP activeraient ensemble le complexe protéique Arp 2/3 (*Actine-related protein 2/3*) et, par ce biais, la polymérisation des filaments d'actine. Ces cascades de signalisation contribuent à l'expansion de la tête des épines dendritiques.

Tiam-1 (*T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*) est un GEF spécifique de Rac-1. Fortement exprimé dans le SNC et en particulier dans les épines dendritiques, il interagirait avec EphB2 de façon dépendante de l'activité kinase du récepteur. En effet, l'activation du récepteur avec l'éphrine-B2-Fc agrégée induirait la phosphorylation de Tiam-1 et son recrutement dans un complexe multimoléculaire regroupant les récepteurs au

glutamate de type N-méthyl-D-Aspartate (*NMDA*) (Tolias *et al.* 2007). L'interaction EphB2/Tiam-1 permettrait aussi une modulation du cytosquelette d'actine via Rac-1.

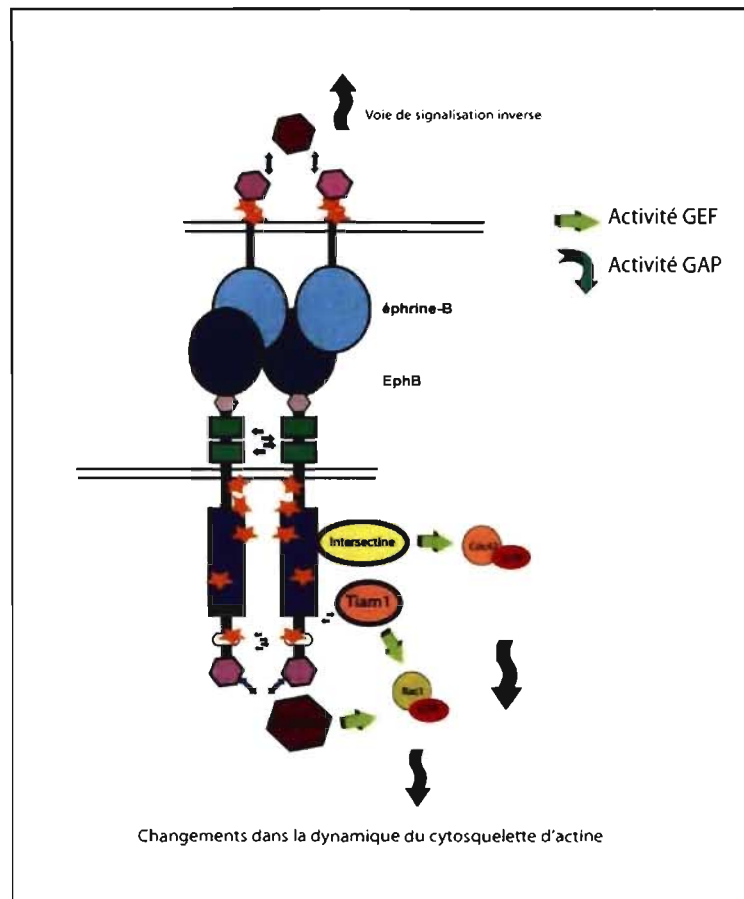


Figure 3: Exemples de voie de signalisation par les protéines Rho induites par l'activation de récepteurs EphB

### 1.1.5.3 Signalisation Eph par les protéines Ras

Les récepteurs Eph régulent également l'activité des petites GTPases de la famille des Ras. Les Ras activent les cascades de signalisation des protéines kinase activées par les

mitogènes (MAPK, pour *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Celles-ci peuvent phosphoryler d'autres éléments du cytosquelette, comme les microtubules ou les microfilaments.

La « protéine se liant aux récepteurs Eph et contenant un domaine SH2 » (SHEP-1 pour *SH2 domain containing Eph receptor binding protein-1*) est exprimée dans le cerveau en développement et adulte. SHEP-1 a été découverte par système double hybride, après un criblage d'une banque d'ADNc de souris embryonnaire avec pour appât le domaine cytoplasmique phosphorylé de EphB2. Cette interaction avec les récepteurs Eph a été confirmée par des tests de capture avec des protéines fusion de EphB2 et, également de EphA4, avec la glutathione-S transférase (GST pour *Glutathione-S transferase*). SHEP-1 se lie d'une part aux tyrosines phosphorylées du domaine juxtamembranaire des récepteurs Eph et, d'autre part, aux GTPases R-Ras et Rap-1A (Dodelet *et al.* 1999)

En général, il semblerait que EphB2 inhibe la signalisation des voies Ras-MAPK. Le récepteur activé par l'éphrine-B1-Fc agrégée, induit une régulation négative de Ras dans sa forme GTP, ayant pour conséquence d'inhiber indirectement la cascade ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*)-MAPK et provoquant ainsi la rétraction neuritique dans des lignées neuronales (Elowe *et al.* 2001, Tong *et al.* 2003).

### **I.1.6. Répulsion et adhérence**

Toutes ces voies de signalisation conduisent éventuellement à une modulation du cytosquelette de la cellule. Les récepteurs Eph sont ainsi impliqués dans divers processus

tout au long du développement. Dès les stades précoces, les Eph jouent un rôle dans la migration cellulaire et dans l'établissement de motifs de connexions topographiques dans le SNC. Ils sont également indispensables au guidage axonal pendant le développement et sont impliqués dans la synaptogenèse et la plasticité synaptique chez l'adulte. Globalement, ils sont donc mis en action au niveau des contacts cellulaires et plus particulièrement dans les processus d'adhérence et de répulsion entre cellules adjacentes.

Cette famille de protéines a tout d'abord été reconnue comme induisant un signal répulsif à la cellule et donc une rétraction membranaire. Cependant, il a été depuis démontré que l'activation d'un même récepteur Eph peut, selon le contexte et le stade de développement, produire des réponses répulsives, attractrices ou adhésives. Ces réponses dépendent de plusieurs mécanismes moléculaires qui déterminent un détachement ou l'adhérence des cellules entre elles, à la suite de l'activation des Eph et des éphrines.

#### **I.1.6.1. Répulsion**

Le paradoxe d'un signal de répulsion induit par des couples récepteur-ligand membranaires est que les cellules en contact doivent se séparer, alors que l'interaction moléculaire est de haute affinité et empêche la dissociation du complexe. Deux stratégies de séparation, selon le type d'éphrine concernée, ont été mises à jour, permettant de résoudre ce paradoxe.

La première stratégie consiste en un clivage de l'éphrine-A au niveau de son lien GPI, après induction du signal, permettant ainsi le détachement de la cellule. La

métalloprotéase dénommée ADAM-10 (*A Disintegrin and Metalloprotease-10*) serait impliquée dans un tel mécanisme. Il s'agit d'une métalloprotéase transmembranaire avec un domaine désintégrine et des répétitions de type EGF (White 2003). On a d'abord supposé qu'ADAM-10 était liée constitutivement à l'éphrine-A3, et activée après une interaction avec le récepteur EphA3 (Hattori *et al.* 2000). Toutefois, des études cristallographiques du complexe EphB2-éphrine-A5 ont établi que la liaison d'ADAM-10 avec le complexe Eph-éphrine ne pouvait se faire directement avec l'éphrine (Himanen *et al.* 2004, Himanen *et al.* 2001). On a ensuite démontré qu'un attachement constitutif de ADAM-10 avait lieu plutôt avec le récepteur EphA3. La formation du complexe EphA3-éphrine-A5 crée un nouveau motif de reconnaissance du domaine riche en cystéines de ADAM-10, positionnant ensuite son domaine protéase en position pour le clivage de l'éphrine (Janes *et al.* 2005). Le complexe semble alors endocyté dans la cellule portant le récepteur, selon les observations des auteurs ayant réalisés ces expériences, dans des cultures de cellules HEK293 surexprimant EphA3 et l'éphrine-A5. Ils ont également démontré la reproductibilité du phénomène en utilisant des cellules surexprimant l'éphrine-A2. Cependant ces données n'ont pas été reproduites pour d'autres Eph.

Les éphrines-B possédant un domaine transmembranaire, une autre stratégie de séparation est donc nécessaire. Un processus de trans-endocytose a été proposé pour supprimer le complexe de la surface et permettre aux cellules de se détacher. Cette endocytose serait bidirectionnelle et permettrait de relocaliser l'intégralité du complexe

Eph-éphrine dans des vésicules endocytaires (Zimmer *et al.* 2003, Marston *et al.* 2003). Le type d'endocytose n'a pas encore été déterminé.

### **I.1.6.2. Adhérence**

Les Eph et les éphrines peuvent également entraîner de l'attraction et l'adhérence intercellulaire.

La possibilité d'adhérence intercellulaire résultant de la liaison Eph-éphrine a été proposée à la suite de l'observation de défauts de fermeture du tube neural chez les souris knockouts pour l'éphrine-A5. Les différentes formes de EphA7, résultant d'un épissage alternatif de l'ARN, réagissaient différemment à la liaison avec l'éphrine-A5 (Holmberg *et al.* 2000). Ainsi trois isoformes de EphA7, deux tronquées sans domaine kinase et une entière, peuvent être exprimées dans des proportions variées dans une même cellule en fonction du contexte. Les deux formes inactives, dépourvues d'activité kinase, pourraient ainsi jouer un rôle de dominant négatif et favoriser l'adhérence quand elles prédominent dans une cellule. Plusieurs anomalies de développement observées chez des souris knockouts Eph ou éphrines pourraient ainsi s'expliquer par un déficit d'adhérence (Orioli *et al.* 1996).

Le degré d'oligomérisation des éphrines semble aussi influencer la signalisation en faveur soit de l'adhérence ou de la répulsion. En effet, il semble que la forme tétramérique induirait un signal d'adhérence alors que la forme dimérique induirait plutôt un signal de répulsion (Stein *et al.* 1998).

## **I.2. Implication des Eph dans le développement du SNC**

Les récepteurs Eph sont impliqués, dès les premiers stades du développement embryonnaire, dans des processus clés. Graduellement ces protéines vont participer à divers mécanismes cellulaires, variant selon les stades ontogéniques. Leur activation aura alors des conséquences différentes en fonction du contexte environnemental et temporel. Nous allons, à partir de quelques exemples essentiellement basés sur EphA4 et EphB2, décrire les diverses fonctions attribuées aux Eph au cours du développement.

### **I.2.1 Prolifération et différenciation cellulaires**

Les Eph et les éphrines peuvent influencer directement le devenir et la prolifération d'une cellule souche. Le traitement de cellules précurseuses neurales (gliales et neuronales) avec des éphrines-Fc agrégées les dirige vers une différenciation ou une prolifération, selon la nature même de l'éphrine. En effet, un traitement avec l'éphrine-A1-Fc agrégée a conduit les cellules souches embryonnaires de télencéphale vers une différenciation neuronale, alors qu'un traitement avec l'éphrine-B2-Fc a induit la prolifération cellulaire (Aoki *et al.* 2004). De même le blocage du signal par EphA2-Fc ou EphB2-Fc agrégé a réduit considérablement la neurogenèse dans des tranches de télencéphale E14,5 *in vitro*.

L'étude des cellules progénitrices dans la zone sous-ventriculaire du ventricule latéral chez l'animal adulte, a aussi révélé un rôle important des Eph. L'infusion dans le cerveau de souris adulte d'éphrine-B2-Fc agrégée ou de récepteur EphB2-Fc agrégé a

induit, dans les deux cas, un blocage de la migration des neuroblastes et une prolifération cellulaire dans le ventricule latéral (Conover *et al.* 2000, Holmberg *et al.* 2005). Cependant, la même expérience réalisée avec l'éphrine-A2-Fc ou EphA7-Fc, agrégé ou non agrégé, a aussi entraîné une prolifération cellulaire dans cette même région (Holmberg *et al.* 2005), soulevant des questions quant à l'origine du signal. Le récepteur EphA7 et l'éphrine-A2 sont fortement exprimés dans le ventricule latéral adulte de souris, avec des motifs d'expression complémentaires et mutuellement exclusifs. Les cellules progénitrices du ventricule latéral ont montré un cycle cellulaire plus court et une prolifération augmentée chez les souris éphrine-A2<sup>-/-</sup> et EphA7<sup>-/-</sup> suggérant un effet d'inhibition de ces deux protéines sur la prolifération (Holmberg *et al.* 2005). L'expression d'une forme tronquée de EphA7 dans son domaine cytoplasmique, et donc sans activité kinase, dans les cellules souches neurales, par infection avec une construction rétrovirale marquée avec GFP (*Green Fluorescent Protein*) a induit une baisse de la prolifération des cellules progénitrices au niveau du ventricule latéral, et a donc provoqué l'effet inverse de la perte du récepteur. EphA7 semble ainsi agir en tant que ligand de l'éphrine-A2 dans l'inhibition de la prolifération des cellules souches neurales.

Des expériences chez la grenouille ont aussi démontré que l'éphrine-B1 est nécessaire à la différenciation des cellules embryonnaires de la rétine. Le signal inverse induit par l'activation de l'éphrine-B1 favorise le mouvement des cellules progénitrices rétiniennes vers le champ oculaire où elles entament leur différenciation (Moore *et al.* 2004).



L'expression d'une forme tronquée, dominante-négative de EphA4, chez des embryons de poisson zébré a aussi induit une expansion de tissu rétinien dans le diencéphale associée à une perte de structure diencéphalique (Xu *et al.* 1996).

La signalisation par les Eph et les éphrines aurait donc un rôle fondamental dans le contrôle de la différenciation des cellules immatures et dans la prolifération neuronale.

### **I.2.2. Segmentation et compartimentation**

Les Eph sont aussi impliqués dans la formation de motifs de segmentation dans le SNC en développement.

Le cerveau postérieur en développement est constitué d'une série de segments métamériques ou rhombomères. D'abord régulièrement répétés, ils se développent en une série de noyaux postérieurs, incluant les noyaux des nerfs craniens avec des répétitions en doublets des segments. Par la suite, le mouvement cellulaire entre rhombomères devient restrictif, ce qui produit une compartimentation et aide à maintenir l'identité des rhombomères distincts. Les gènes régulateurs *hox*, facteurs de transcription exprimés sélectivement à l'intérieur de rhombomère spécifique, modifient les plans locaux pour permettre la différenciation des segments. Plusieurs Eph et éphrines ont aussi une expression compartimentée et limitée à certains rhombomères à ce stade de développement (Flanagan & Vanderhaeghen 1998). Ainsi EphA4, EphB2 et EphB3 sont exprimés dans les rhombomères r3/r5, alors que les éphrines-B1 à -B3 sont exprimées dans les rhombomères

r2/r4/r6 (Henkemeyer *et al.* 1994). Une expression de la forme tronquée d'EphA4 sans son domaine kinase, chez le Xénope et le poisson zébré, conduit à la présence de cellules des rhombomères r3/r5 dans les zones de r2/r4/r6, suggérant un rôle crucial du récepteur dans le maintien de cette compartimentation (Xu *et al.* 1995).

Les Eph semblent également impliqués dans des processus similaires de compartimentation au niveau du prosencéphale (Donoghue & Rakic 1999).

### **I.2.3. Développement des connexions neuronales**

Les fonctions les plus étudiées des récepteurs Eph concernent le guidage axonal et l'établissement de motifs topographiques de projections axonales permettant l'organisation précise des connexions neuronales dans le SNC en développement.

#### **I.2.3.1. Guidage de la croissance axonale**

Les axones en croissance expriment à leur surface des récepteurs spécifiques à diverses molécules de guidage présentées dans la matrice extracellulaire ou à la surface des cellules qu'ils rencontrent sur leur chemin. L'activation de ces récepteurs peut induire une réponse répulsive ou attractive relativement à la localisation des ligands. Plusieurs familles de molécules de guidage axonales actives pendant le développement ont déjà été identifiées : les sémaphorines, les slits, les nétrines, qui sont pour la plupart des molécules sécrétées (excepté certaines sémaphorines et nétrines), les SynCAMs (*Synaptic Cell Adhesion Molecules*), les cadhérines et enfin les Eph et les éphrines (Dalva *et al.* 2007).

Les axones en croissance doivent trouver leur cible à travers un chemin parsemé de telles molécules de guidage induisant divers signaux. Après avoir atteint leur cible, les axones doivent ensuite déterminer la localisation exacte de leurs connexions synaptiques.

Les Eph ont d'abord été localisés dans des faisceaux d'axones en développement (Pasquale *et al.* 1992, Henkemeyer *et al.* 1994). Les premières observations associant les Eph au guidage axonal ont alors permis d'identifier l'éphrine-A5 comme étant une molécule répulsive pour certains cônes de croissance axonaux. Son rôle dans le système visuel est d'ailleurs à l'origine de son premier nom RAGS (*Repulsive Axon Guidance Signal*) (Drescher *et al.* 1995). Le cône de croissance, portant les récepteurs EphA ou EphB, évolue ainsi dans un environnement jalonné de gradients d'éphrines, dont la concentration détermine la progression ou l'arrêt (voir le modèle du système visuel décrit plus bas). En effet, il a été démontré que la concentration locale des éphrines jouait un rôle clé dans l'effet induit sur le cône de croissance. *In vitro*, à fortes concentrations, l'éphrine-A2 induit une répulsion des cônes de croissance provenant d'explants rétiniens, alors qu'à faibles concentrations, elle favorise leur croissance (Hansen *et al.* 2004). L'éphrine-A5 peut également donner deux types de réponse sur la croissance des axones rétiniens de Xénope *in vitro*, en fonction du substrat. Sur un substrat de fibronectine, les axones s'éloignent des hautes concentrations d'éphrines, il y a donc répulsion, alors qu'ils traversent ces mêmes concentrations sur la laminine, il y a donc dans ce cas, attraction (Weinl *et al.* 2003). Le contexte environnemental participe ainsi au signal induit par les Eph.

La suppression, la modification ou la surexpression de ces molécules chez des souris transgéniques ont aussi contribué à mieux définir les rôles des Eph et des éphrines dans le guidage axonal.

Par exemple, EphA8 est normalement exprimé dans la partie rostrale du collicule supérieur. Chez les souris EphA8<sup>-/-</sup>, les neurones du collicule supérieur rostral ne projettent plus vers leur cible normales du collicule supérieur controlatéral, mais plutôt vers la moelle cervicale ipsilatérale (Park *et al.* 1997).

Les souris EphA4<sup>-/-</sup> montrent aussi des dysfonctionnements, notamment locomoteurs, exprimés par une absence d'alternance dans les mouvements des membres inférieurs, remplacés par des déplacements par bonds, comme chez le lapin ou le kangourou (Dottori *et al.* 1998). Ces déficits locomoteurs ont été associés à des altérations des faisceaux corticospinaux, aux niveaux de la médulla et de la moelle épinière. Une partie des axones retraversent la ligne médiane de la moelle de façon aberrante. La perte de EphA4 affecte également la formation des commissures antérieure et postérieure. Ce dernier phénotype a pu être sauvé par l'expression d'une forme de EphA4 défectueuse dans son domaine kinase, suggérant que EphA4 agirait en tant que ligand dans la régulation du guidage axonal pour la formation des commissures. Cependant le domaine kinase serait nécessaire pour la formation normale du faisceau corticospinal (Kullander *et al.* 2001). Il a aussi été démontré que l'éphrine-B3 agit comme molécule répulsive sur la ligne médiane,

prévenant le retour du côté ipsilatéral des axones EphA4 positifs après leur passage (Yokoyama *et al.* 2001).

De manière similaire, les axones corticaux de la partie postérieure de la commissure antérieure ont des projections aberrantes vers le plancher du prosencéphale, plutôt que vers les lobes cérébraux, chez les souris EphB2<sup>-/-</sup> (Henkemeyer *et al.* 1996). Cette même étude a démontré que le domaine kinase d'EphB2 n'était pas nécessaire au guidage approprié de ces axones commissuraux.

Les cellules ganglionnaires de la rétine (RCG) de souris n'expriment normalement pas EphA3 (Feldheim *et al.* 1998). L'expression ciblée et ectopique de EphA3 dans les RCGs (pour environ 50 % d'entre elles), entraîne des défauts de migration inattendus (Brown *et al.* 2000). Les axones ayant un niveau d'expression augmenté de EphA3 forment des connexions ectopiques dans la partie antérieure du collicule supérieur. Chez les mêmes souris, les axones des RCGs temporales exprimant d'autres EphA ont aussi des projections ectopiques mais dans la partie postérieure du collicule postérieur. Cela suggère que les axones interagissent entre eux dans un contexte de compétition pour une cible donnée. La perturbation du développement d'un faisceau d'axones vers sa cible peut donc entraîner des changements compensatoires dans d'autres axones.

### **I.2.3.2. Cartographie et topographie**

Les Eph sont donc indispensables à l'établissement correct de nombreuses projections au sein du SNC, comme les projections du système olfactif, les connexions de

la rétine au tectum optique ou au thalamus visuel (corps genouillé latéral), celles de l'hippocampe vers le septum, ou encore celles du thalamus vers le cortex.

L'exemple le plus étudié est celui de l'organisation topographique des projections axonales du système visuel. En effet, les axones des cellules ganglionnaires de la rétine ont une organisation rétinotopique dans les collicules supérieurs ainsi que dans les corps genouillés latéraux. Les cellules ganglionnaires de la rétine nasale projettent dans la partie postérieure des collicules supérieurs, et celles de la rétine temporale dans la partie antérieure. Dans l'axe dorsoventral de la rétine, les neurones ventraux projettent vers la partie médiale des collicules supérieurs et dorsaux vers la partie latérale. Or, plusieurs des Eph et des éphrines sont distribués en gradients dans la rétine ou dans les collicules supérieurs, pendant le développement, et il a été démontré qu'ils contribuent à l'organisation topographique des connexions. Les EphA-éphrines-A agiraient dans l'établissement de l'axe nasotemporal rétinien-antéropostérieur colliculaire alors que les EphB-éphrines-B agiraient dans l'axe dorsoventral-médiolatéral, respectivement des mêmes structures (Feldheim *et al.* 2004, McLaughlin & O'Leary 2005, Knoll *et al.* 2001). Il a été démontré que les concentrations élevées des éphrines-A dans la partie postérieure des collicules supérieurs repoussent et restreignent aux zones antérieures les cônes de croissance des cellules ganglionnaires de la rétine temporale, qui expriment une haute teneur d'EphA à leur surface. Par contre, l'expression à basses concentrations d'éphrines-A dans la partie antérieure des collicules supérieurs stimulerait l'extension des axones rétinien. En effet, *in vitro*, une concentration faible d'éphrine-A2 promeut la croissance

axonale d'explants rétiniens en culture, avec des variations dépendantes de la position topographique d'origine de l'explant (Hansen et al. 2004). De plus, les éphrines-A co-exprimées avec les EphA dans les mêmes axones de la rétine nasale pourraient agir en cis comme inhibiteurs des récepteurs (Knoll & Drescher 2002, Yin *et al.* 2004). Un autre effet des éphrines exprimées dans les collicules supérieurs serait de supprimer les branches axonales collatérales exubérantes formées dans le premier temps de la croissance axonale (Yates *et al.* 2001). D'autre part, l'éphrine-B1, qui est plus concentrée dans la partie médiale des collicules, n'affecte pas les cônes de croissance terminale des cellules rétiniennes (Hindges *et al.* 2002). Cependant elle attire vers la zone médiale les branches collatérales postérieures au cône de croissance principal des axones des cellules ganglionnaires ventrales, qui sont EphB positives (McLaughlin *et al.* 2003).

### **I.3. Présence et rôles des Eph et des éphrines dans le SNC adulte**

Connus pour leurs rôles multiples pendant le développement, les éphrines et les Eph sont aussi largement exprimés dans le SNC mature. On commence seulement à définir leurs fonctions, notamment dans la formation, le fonctionnement et la plasticité de certaines synapses. Jusqu'à présent, les Eph ont été généralement considérés comme des récepteurs post-synaptiques, avec des rôles dans la maturation des épines dendritiques et dans la potentialisation à long terme (LTP pour *Long Term Potentiation*). Nous allons à présent détailler les distributions et les rôles connus ou proposés des éphrines et des Eph dans le SNC de murin adulte.

### **I.3.1. Distribution des Eph et des éphrines dans le SNC mature**

#### **I.3.1.1. Distributions régionales**

La grande majorité des Eph et les éphrines ont été détecté dans le SNC mature, notamment par hybridation *in situ* et immunohistochimie.

EphA4 est fortement exprimé dans le SNC adulte. L'ARNm de EphA4 a été observé par hybridation *in situ* dans les couches de cellules granulaires du bulbe olfactif, dans le cortex, dans la zone subventriculaire et le neuroépithélium du ventricule latéral, dans toutes les couches de l'hippocampe et dans le cervelet (Liebl *et al.* 2003). Une première étude immunohistochimique en microscopie photonique et électronique (Martone *et al.* 1997) a permis de détailler la distribution de la protéine notamment au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe, du néostriatum et des cellules de Purkinje cérébelleuses. Dans la matière blanche, son expression a été détectée dans le corps calleux, le fornix, les commissures antérieure et postérieure, le faisceau mammillothalamique et le chiasma optique. EphA4 a été rapporté comme enrichi dans la région CA1 de l'hippocampe, notamment dans les épines dendritiques (Murai *et al.* 2003).

L'expression de EphB2 dans le SNC change fortement au cours de la période post-natale précoce selon les observations obtenues à partir d'une souris transgénique hétérozygote portant une mutation sur EphB2, avec ses domaines extracellulaires et juxtamembranaire fusionnés à la  $\beta$ -galactosidase (Henderson *et al.* 2001). Ce changement d'expression en période post-natale correspond à la période de synaptogenèse la plus



intense. EphB2, qui est largement exprimé dans le cerveau durant le développement prénatal, voit son expression éteinte à la naissance, excepté dans le collicule supérieur et le cerveau antéro-ventral, jusqu'à P7, où il est de nouveau faiblement exprimé dans l'hippocampe et le cortex. Puis son expression augmente à P10, le plus fortement dans l'hippocampe, le néocortex, dans les cellules de Purkinje, l'amygdale, les corps genouillés, l'hypothalamus et le thalamus. Cette expression est ensuite maintenue chez l'adulte.

Les éphrines sont aussi encore fortement exprimées dans le SNC adulte. Les ARNm des éphrines-B1, -B2 et -B3 ont été détectés dans le bulbe olfactif, le cortex et l'hippocampe (Liebl et al. 2003).

### **I.3.1.2. Distributions subcellulaires et synaptiques**

Au niveau cellulaire, les Eph et les éphrines sont majoritairement associés aux cellules neuronales, mais quelques études ont montré la présence de certains Eph ou éphrines dans les cellules gliales, notamment dans les astrocytes. L'éphrine-A3 a été détectée dans les astrocytes par essai de protection à la RNase et par immunohistochimie au niveau du CA1 de l'hippocampe (Murai et al. 2003). L'éphrine-B2 a aussi été détecté dans des astrocytes et des oligodendrocytes de la moelle épinière avant, et de façon plus marquée, après une lésion par transsection (Bundesen *et al.* 2003). L'expression de EphB3 ainsi que de plusieurs EphA a été démontré en augmentation dans les astrocytes après des lésions complètes de la moelle par immunohistochimie et RT-PCR (Bundesen et al. 2003, Willson *et al.* 2002, Willson *et al.* 2003). EphA4 a aussi été observé dans des astrocytes au

niveau de la rétine et du nerf optique chez des souris transgéniques exprimant EphA4 fusionné avec *LacZ* (Petros *et al.* 2006). Plusieurs EphA ont aussi été détectés par RT-PCR à partir d'astrocytes isolés de l'hippocampe adulte (Nestor *et al.* 2007).

La distribution subcellulaire neuronale des récepteurs Eph et des éphrines reste encore à préciser. En général, on considère les récepteurs Eph comme étant essentiellement post-synaptiques (épines dendritiques) dans le SNC mature, mais cette perception repose sur très peu de données. Or, une meilleure connaissance de la localisation cellulaire précise de ces molécules permettrait de mieux interpréter les observations fonctionnelles réalisées ces dernières années. En effet, une localisation astrocytaire ou neuronale, pré-synaptique ou post-synaptique, vésiculaire ou membranaire, jumelée à la démonstration que le récepteur Eph ou l'éphrine à l'étude agit dans une fonction donnée comme récepteur ou comme ligand, permettrait de mieux comprendre les mécanismes cellulaires de cette fonction. Il est donc nécessaire d'approfondir l'étude de la distribution subcellulaire de ces récepteurs. Un des problèmes majeur est que très peu d'anticorps commerciaux disponibles s'avèrent spécifiques en immunocytochimie ; ce qui limite grandement les progrès dans ce domaine. L'interprétation et la fiabilité de plusieurs des données publiées jusqu'à maintenant s'en trouvent, par ce fait, affaiblies.

Les premières études en microscopie électronique ont permis de détecter EphA4 dans le neuropile, au niveau des axones myélinisés, dans le fornix, et essentiellement au niveau des épines dendritiques, structures post-synaptiques, dans le néostriatum et

l'hippocampe (Martone et al. 1997). En microscopie confocale, EphA4 a aussi été décrit comme étant majoritairement associé aux épines dendritiques au niveau de la région CA1 de l'hippocampe (Murai et al. 2003).

Notre équipe de recherche a permis de démontrer, grâce à des techniques d'immunocytochimie en microscopie électronique, que la distribution de EphA4 dans l'hippocampe de rat adulte n'était pas seulement associée aux épines dendritiques. L'analyse du marquage de EphA4 a permis d'établir que de 9 à 19 % des terminaisons axonales étaient marquées contre 24 à 40 % des épines dans différentes régions de l'hippocampe (Tremblay *et al.* 2007).

Pour EphB2, il a été rapporté que sa localisation subcellulaire changerait au cours du développement (voir I.3.1.1). Surtout présent dans les axones et peu dans les dendrites, au cours du développement embryonnaire de E10 à E16, il deviendrait majoritairement localisé dans les dendrites chez l'adulte (Henderson et al. 2001).

Le domaine de liaison des éphrines-B et des récepteurs Eph aux motifs PDZ en fait des candidats à une localisation dans les densités post-synaptiques (PSD pour *Post Synaptic Densities*), qui contiennent de nombreuses protéines d'échafaudage ou adaptatrices à domaines PDZ. Par exemple, une interaction entre l'afadine, ou AF6, et certains récepteurs Eph, a été démontré par diverses techniques (Buchert *et al.* 1999). L'afadine, une protéine à domaine PDZ, est associée à des membranes cellulaires de sites spécialisés comme les jonctions synaptiques. La co-immunoprécipitation, à partir de lysat de cellules transfectées

avec divers récepteurs Eph, a permis de mettre en évidence une interaction de AF6 avec les récepteurs EphA7, EphB2 ou EphB3 via leur domaine C-terminal. Une telle interaction a ensuite été confirmée à partir de lysats de cerveau murin adulte. La cotransfection de AF6 avec EphA7, dans des cultures de cellules polarisées de la lignée MDCK (pour *Mardin-Darby Canin Kidney*), a aussi permis de démontrer la co-agrégation des deux protéines aux jonctions intercellulaires. Les trois récepteurs ont aussi été localisés dans des épines dendritiques et sur des PSD par microscopie électronique dans le stratum radiatum du CA1. Cette étude recèle cependant beaucoup de faiblesses quant à ces dernières observations, avec des anticorps dont la spécificité en microscopie électronique n'a pas été démontrée, des images montrant une ultrastructure mal définie, et des données non quantifiées.

Des expériences de criblage en double hybride, d'une bibliothèque d'ADNc de souris embryonnaire de P11, par des « appâts » basés sur les motifs de liaison aux domaines PDZ des récepteurs EphA7 et EphB2, ont démontré une association possible des deux récepteurs avec les protéines PICK1 et GRIP1 (Torres *et al.* 1998). L'interaction entre EphB2 et PICK1 a aussi été vérifiée par co-immunoprécipitation, à partir de lysat de cerveau de souris adulte, mais n'a pas été reproduite à partir de cerveau de souris embryonnaire E11. La co-surexpression des protéines EphB2 et PICK1 dans des lignées de cellules COS7 (Fibroblastes transformés de rein de singe vert africain) a aussi provoqué le regroupement des protéines en petits agrégats. Dans cette même étude, on a rapporté, après fractionnement de synaptosomes du cerveau de rat adulte, que EphB2 était associé aux membranes synaptosomales mais absent de la fraction vésiculaire. Cependant, dans ce

fractionnement, les auteurs n'ont pas démontré l'enrichissement en synaptophysine (marqueur usuel des vésicules synaptiques) attendu pour la fraction vésiculaire, qui était d'autre part contaminée avec un marqueur des PSD, le PSD95. Par contre, ces mêmes auteurs ont rapporté une colocalisation de EphB2 et de la synaptophysine, en immunocytochimie sur des neurones d'hippocampe en culture, ce qui indique une localisation à l'intérieur des terminaisons, vraisemblablement en association avec des vésicules.

Une autre étude a examiné la distribution subcellulaire de Eph et d'éphrines, après purification de PSD à partir d'homogénat de cerveau de rat adulte, et localisé tant EphA4 et EphB2 que les 3 éphrines-B dans ces densités (Grunwald *et al.* 2004). Les Eph et les éphrines ont résisté à des extractions successives au Triton X-100, mais ont tous été solubilisés par le sarcosyl, un détergent beaucoup plus puissant qui ne laisse que les protéines formant le cœur des PSD. Selon ces résultats, EphA4 et EphB2 seraient moins abondants que les éphrines-B dans les PSD. Il est à noter que les Eph et éphrines concernés se retrouvaient également dans la fraction dite non-PSD, contenant les membranes synaptosomales pré- et post-synaptiques dénuées des éléments jonctionnels (PSD et zone active pré-synaptique). Cependant, l'absence d'enrichissement attendu en PSD95 dans la dernière fraction solubilisée par le sarcosyl (Cho *et al.* 1992), affaiblit les conclusions de cette expérience, quant à l'absence effective de ces molécules dans le cœur des PSD. Cette étude a aussi démontré que l'éphrine-B2 était plus abondante en post-synaptique dans les

synapses en CA1 de l'hippocampe, ce qui a amené les auteurs à proposer la possibilité d'une localisation également en pré-synaptique pour EphB2 et EphA4.

### **I.3.2. Éphrines, Eph et plasticité synaptique**

Les éphrines et les récepteurs Eph sont donc des éléments des synapses matures du SNC. Cette localisation suggère un ou plusieurs rôles dans la physiologie synaptique. Jusqu'à présent leur fonction dans le maintien de la morphologie des épines dendritiques a été prépondérante. Plusieurs études les ont aussi impliqués dans des phénomènes de plasticité synaptique comme la LTP (pour *Long Term Potentiation*) et la dépression à long terme ou LTD (pour *Long Term Depression*). On a aussi rapporté des interactions avec les récepteurs NMDA par exemple, impliquant des rôles possibles dans l'activation de certaines synapses. Cependant, le nombre élevé de ces molécules, les multiples interactions possibles entre elles et la méconnaissance actuelle de leur localisation individuelle précise au niveau des divers types de synapses, rendent difficile l'interprétation des résultats des études fonctionnelles ou des désordres observés chez des souris knockouts.

#### **I.3.2.1. Éphrines, Eph et morphogénèse des épines dendritiques**

Une des fonctions des plus connues des Eph concerne la modulation de la morphologie des épines dendritiques, petites protusions à la surface des dendrites recevant la plupart des synapses excitatrices et impliquées dans les mécanismes de la mémoire à long terme (Harris 1999). La localisation fréquente des Eph dans ce compartiment et leur fonction établie dans le contrôle du cytosquelette d'actine lors du développement en font

des candidats intéressants dans l'établissement et le contrôle de la forme des épines. Les éphrines-B, de même que les récepteurs EphB2 et EphA4 semblent jouer des rôles importants dans cette fonction.

#### *1.3.2.1.1 Rôles des éphrines-B et du récepteur EphB2 dans la maturation et morphogénèse des épines dendritiques*

La maturation des épines dendritiques intervient dans les phases tardives du développement, essentiellement dans la première semaine post-natale chez le rat (Fiala *et al.* 1998). Les épines dendritiques représentent des compartiments très plastiques et dynamiques. Avant de devenir mature, les épines prennent d'abord la forme de longues et fines protusions, ou filopodes à tête bulbeuse. Après maturation, les filopodes se rétractent et prennent une forme plus courte de type-champignon.

La première étude impliquant un Eph dans le fonctionnement des épines dendritique a rapporté la démonstration d'une interaction entre EphB2 et le syndécane-2 (Ethell *et al.* 2001) protéoglycane transmembranaire de type héparane sulfate (ou HSPG). L'idée d'un rôle potentiel du syndécane-2 à la synapse est liée à son interaction avec une protéine à domaine PDZ, la CASK (pour *Calcium, calmodulin-associated serine/threonine kinase*) (Hsueh *et al.* 1998). Il a été aussi observé sous forme d'agrégats dans les épines matures de neurones hippocampiques en culture (Ethell & Yamaguchi 1999). De plus, la surexpression du syndécane-2 dans ces neurones a entraîné la formation d'épines matures à des stades normalement immatures, un événement dépendant de la phosphorylation de cette protéine.

Les auteurs ont alors émis l'hypothèse de l'implication de récepteurs à tyrosine kinase de la famille des Eph dans cette fonction. Des études immunocytochimiques sur des cultures de neurones hippocampiques ont montré que EphB2 et le syndécan-2 étaient partiellement colocalisés. Ces deux protéines coimmunoprécipitent dans des lysats de cerveau de souris adultes. La phosphorylation du syndécan-2 semble dépendante de EphB2, ceci ayant été démontré à l'aide de réactions kinases produites *in vitro*. Il a également été démontré que l'interaction entre les deux protéines était dépendante de la phosphorylation du syndécan-2. Les EphA, notamment EphA3 et EphA4 ne semblent pas interagir avec le syndécan-2. L'inhibition de l'activité kinase de EphB2, a inhibé l'agrégation du syndécan-2 dans les neurones et remplacé la formation d'épines par des protusions plus courtes. Les auteurs ont ainsi démontré un rôle indispensable de EphB2 dans la formation des épines dendritiques.

La voie de signalisation induite par l'activation de EphB2, et mettant en jeu la RhoGEF, la kalirine, régulerait aussi la morphologie des épines dendritiques (voir I.1.3) (Penzes et al. 2003). Le traitement de neurones hippocampiques avec l'éphrine-B1-Fc agrégée, induit la formation de protusions épineuses. Il induit également la phosphorylation et la redistribution de la kalirine en agrégats aux contacts synaptiques. Enfin, la surexpression de formes dominantes négatives de la kalirine ou de sa cible, Rac1, bloque l'effet de l'éphrine-B1 sur les épines.

L'analyse de souris mutantes triple knockouts pour les gènes EphB1, EphB2 et EphB3 a aussi produit de sévères problèmes structuraux au niveau des épines dendritiques



(Henkemeyer *et al.* 2003). En culture, des neurones hippocampiques de ces souris knockouts montrent une quasi-absence de protusions épineuses, même après 21 jours, les quelques prolongements présents étant longs, fins et immatures. D'autres changements ont été démontrés dans ces mêmes cultures, comme une distribution altérée de PSD95 et de la synaptophysine, des boutons pré-synaptiques plus larges, et une agrégation des récepteurs AMPA et NMDA considérablement réduite. Les synapses GABAergiques n'ont cependant pas été altérées. Ainsi, il semble que les récepteurs EphB agissent en combinaison, les simples knockouts ne montrant pas d'anomalie des épines, alors que différentes combinaisons de doubles knockouts montraient des défauts tels que des protusions de type filipodes plus nombreuses, notamment dans les knockouts EphB1/EphB2.

Les voies de signalisation induites par les EphB, que nous avons déjà évoquées dans le sous-chapitre I.1.3, permettent le contrôle du cytosquelette d'actine. Les épines sont des structures riches en actine et les Eph sont donc importants dans leur formation et leur remodelage.

#### *I.3.3.1.2. Contrôle de la morphologie des épines dendritiques par EphA4*

Plusieurs observations montrent que EphA4 joue aussi un rôle dans la morphogenèse des épines dendritiques, un rôle qui pourrait être complémentaire à celui des EphB. L'expression des récepteurs EphB et EphA4 couvrant parfois les mêmes régions, leurs différences fonctionnelles résident peut-être dans leur distribution subcellulaire individuelle ou dans les voies de signalisation induites spécifiquement par chacun.

EphA4 a été étroitement associé aux épines dendritiques dans différentes régions de l'hippocampe comme CA1 ou CA3 ou le gyrus dentelé. Une étude a mis à jour l'implication de EphA4 dans le maintien de la structure des épines dendritiques, en démontrant premièrement que le traitement de tranches d'hippocampe en culture avec EphA4-Fc non agrégé, qui inhiberait l'interaction du récepteur présent sur les épines avec les éphrines, produisait des changements de formes des épines, celles-ci devenant irrégulières et désorganisées (Murai et al. 2003). Les souris EphA4<sup>-/-</sup> montraient les mêmes irrégularités des épines, affinées et plus longues que la normale, sur des tranches d'hippocampe de souris adultes en culture. L'éphrine-A3 étant essentiellement exprimée dans les astrocytes selon ces mêmes auteurs, ceux-ci ont proposé un modèle de contrôle par les astrocytes de la morphologie des épines, par sa liaison avec EphA4 à la surface des épines.

Plusieurs voies de signalisation en aval de EphA4 ont été proposées pour le contrôle de la morphogenèse des épines. La stimulation de EphA4 par l'éphrine-A3-Fc agrégée ou non, induit la phosphorylation de plusieurs protéines dont Src et Fyn (Bourgin *et al.* 2007). Ces deux dernières protéines régulent le cytosquelette d'actine et ont déjà été impliquées dans les voies de signalisation des Eph (Ellis *et al.* 1996, Zisch *et al.* 2000). Fyn est exprimé notamment à la synapse mature où elle jouerait un rôle dans la plasticité synaptique et le maintien structurel des épines. Par des expériences de coimmunoprécipitation, cette équipe de recherche (Bourgin et al. 2007) a en effet démontré que la stimulation par l'éphrine-A3-Fc dans des tranches d'hippocampe induisait la

phosphorylation de Cas (*Crk associated substrate*), une protéine d'échafaudage, et une diminution de sa liaison avec Fyn. Cette inhibition n'étant pas observée chez les souris EphA4<sup>-/-</sup>, ce récepteur semble donc être le principal EphA responsable de cet effet. Cas est reconnue comme une importante régulatrice de la motilité et de la morphologie cellulaire. Des essais de transfection avec des formes mutantes de Cas ont ainsi permis de démontrer l'importance de son domaine SH3 dans son action sur la densité des épines dendritiques. Ce domaine est un site de liaison pour les protéines kinases FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et Pyk2 (*Proline-rich tyrosine kinase 2*) (Bouton *et al.* 2001, O'Neill *et al.* 2000). La phosphorylation de celles-ci est également réduite après traitement avec l'éphrine-A3-Fc. Cas, FAK et Pyk2 ont déjà été démontrées toutes trois comme étant phosphorylées lors de l'adhérence cellulaire induite par l'activation des intégrines (Girault *et al.* 1999). De plus, l'inhibition de Cas ou de l'intégrine  $\beta 1$  par ARN interférant produisait les mêmes changements morphologiques sur les épines que l'activation de EphA4. L'inactivation de l'intégrine- $\beta 1$ , sur tranches d'hippocampe, par un peptide bloquant empêchait l'action de EphA4 sur la morphologie des épines. Ces résultats soutiennent un modèle selon lequel l'activation d'EphA4 interfère avec la signalisation induite par les intégrines, qui stabilisent les épines dendritiques.

Une autre voie de signalisation d'EphA4 menant à la régulation des états de l'actine serait celle de la phospholipase- $C\gamma 1$  (PLC $\gamma 1$ ) (Zhou *et al.* 2007). La PLC $\gamma 1$  est activée par des récepteurs à tyrosine kinase, et, dans cet état, hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG)

(Rebecchi & Pentylala 2000). La phosphorylation de la PLC $\gamma$ 1 par EphA4 a été observée après double transfection des deux protéines dans des cellules Cos, et confirmée par l'annulation de ce phénomène en remplaçant EphA4 par sa forme tronquée de son domaine kinase. La phosphorylation de la PLC $\gamma$ 1 a aussi été observée après stimulation de tranches d'hippocampe en culture par l'éphrine-A3-Fc ou -A5-Fc non agrégée. Des expériences de précipitation par protéines de fusion -GST de diverses formes mutées de EphA4 ou de la PLC $\gamma$ 1 ont aussi permis d'établir une interaction entre les tyrosines juxtamembranaires de EphA4 et le domaine SH2 de la PLC $\gamma$ 1. La PLC $\gamma$ 1 se trouvait dans de multiples compartiments neuronaux tant du côté pré-synaptique (vésicules, zone active) que post-synaptique (liaison très forte avec les PSD). Elle devient ainsi une bonne candidate à un rôle dans la modulation des épines dendritiques. Bien que sa surexpression par rétrovirus dans des tranches d'hippocampe en culture n'ait pas produit de changements morphologiques des épines, la transfection de sa forme LIM (*Lipase-Inactive Mutant*) a résulté en une réduction marquée de la densité des épines, celles-ci adoptant alors des formes plus allongées. La réduction de l'expression de la PLC $\gamma$ 1 par ARN interférent a produit le même effet. Selon cette même étude, cet effet semblerait se produire par l'intermédiaire de la cofiline, qui est un facteur de dépolymérisation de l'actine (Bamburg 1999).

Une autre partenaire de EphA4 dans sa régulation de l'actine serait la Cdk5 (*Cyclin dependant kinase 5*), une protéine abondamment exprimée dans les PSD (Fu *et al.* 2007). Le traitement de tranches d'hippocampe avec l'éphrine-A1-Fc agrégée réduit la densité des

épines, mais non en présence de la roscovitine, un inhibiteur de la Cdk5. EphA4 peut être coimmunoprécipité avec Cdk5 et avec p35, un activateur de Cdk5, tant après cotransfections des cellule HEK 293 (*human embryonic kidney 293*), qu'à partir de cerveau de rat adulte, suggérant la formation d'un complexe *in vivo*. Les trois protéines sont d'ailleurs présentes dans les PSD. La formation de ce complexe serait dépendante de la phosphorylation de EphA4 et de la stimulation par les éphrines. L'activation de EphA4 dans des neurones corticaux en culture entraîne aussi une augmentation de la forme phosphorylée de Cdk5. Le blocage de l'expression de cette kinase par ARN interférant de la Cdk5, supprime la rétraction épineuse provoquée par le traitement avec éphrines. Les souris Cdk5<sup>-/-</sup> montrent aussi une densité réduite des épines et leurs neurones corticaux en culture ne répondent pas à un traitement avec l'éphrine-A1-Fc. L'activation des récepteurs EphA entraîne aussi une augmentation de l'activité RhoA dépendante de Cdk5. Enfin, l'activation de l'éphexine-1, un RhoAGEF qui interagit avec EphA4, semble aussi dépendante de l'activité Cdk5, et son association avec EphA4 est considérablement réduite chez les souris Cdk5<sup>-/-</sup>. Cette étude a aussi démontré que l'activité de l'éphexine est nécessaire à la modulation de la densité des épines par EphA4 ou Cdk5.

### **I.3.2.3. Les Eph dans la transmission et la plasticité synaptique**

Les Eph semblent avoir plusieurs fonctions au niveau de la synapse. Leurs interactions avec des récepteurs au glutamate les impliqueraient directement dans la transmission du signal nerveux.

### *1.3.2.3.1 Les Eph et les récepteurs au glutamate*

Le rôle des Eph dans le fonctionnement synaptique a d'abord été suggéré par une étude démontrant un lien entre l'activation de ces récepteurs à tyrosine kinase et l'agrégation des récepteurs au glutamate de type NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) (Dalva *et al.* 2000). Ceux-ci sont composés des sous-unités NR1 et NR2, qui forment ensemble un canal calcique sensible au NMDA. Ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans les processus dépendants de l'activité synaptique, comme la plasticité synaptique. L'association directe de EphB2 avec la sous-unité NR1 a été démontrée par co-immunoprécipitation à partir de lysat de cortex cérébral (P1) et après stimulation de neurones corticaux en culture avec l'éphrine-B1-Fc agrégée (Dalva *et al.* 2000). Cette étude a aussi rapporté que EphA4 n'interagissait pas directement avec NR1, pas plus que EphB2 avec les récepteurs AMPA du glutamate ( *$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid*). L'association entre les récepteurs EphB2 et NMDA se ferait au niveau de leurs domaines extracellulaires et ne requerrait pas l'activité kinase de EphB2, tel que démontré par coimmunoprécipitation avec des formes mutées de EphB2. Par contre, l'agrégation des récepteurs après stimulation avec les éphrines serait, elle, dépendante de l'activité kinase de EphB2. En effet, l'expression, dans des neurones corticaux en culture, de formes dominantes négatives de EphB2, tronquées du domaine kinase, diminuait le nombre de spots immunofluorescents de NR1 alors que la surexpression de EphB2 produisait l'effet inverse. Le traitement prolongé de cultures avec des éphrines-B

augmentait aussi considérablement le nombre de structures post- et pré-synaptiques détectées.

Ces premières observations ont donné lieu à des études complémentaires du rôle de EphB2 dans l'activité du récepteur NMDA.

L'analyse par transfert western de lysats d'hippocampe de souris de type sauvage et EphB2<sup>-/-</sup> n'a pas montré de différence quantitative au niveau dans l'expression de deux sous-unités de récepteurs au glutamate, NR1 (NMDA) et GluR1 (AMPA) (Henderson et al. 2001). Les épines dendritiques hippocampiques, au niveau du gyrus dentelé, avaient une apparence normale chez les souris EphB2<sup>-/-</sup>. Cependant une analyse en microscopie électronique du marquage de NR1 au niveau des synapses de cette région, chez des souris de 5 semaines, a révélé une réduction de plus de 40% de grains d'or associés aux densités post-synaptiques. L'intensité du marquage pour NR1 en transfert western et en immunohistochimie étant la même chez les souris EphB2<sup>-/-</sup> par rapport au type sauvage, EphB2 semblerait, d'après les auteurs, influencer la distribution subcellulaire de NR1 plutôt que son niveau d'expression.

Une étude subséquente a rapporté une amplification de la phosphorylation d'une autre sous-unité du récepteur NMDA après activation des récepteurs EphB (Takasu *et al.* 2002). On a en effet démontré une augmentation de la phosphorylation de tyrosines de la sous-unité NR2B, après immunoprécipitation à partir de lysat de neurones corticaux en culture, stimulés par l'éphrine-B2-Fc agrégée. Lors de la transfection de cellules HEK 293

avec NR2B et des formes sauvages ou tronquées du domaine kinase d'EphB2, la phosphorylation de NR2B était conditionnelle à la présence d'une forme fonctionnelle de EphB2. Le traitement de neurones corticaux en culture par l'éphrine-B2-Fc agrégée, induisait aussi une augmentation de la phosphorylation de Src, une kinase cytoplasmique qui peut s'associer aussi bien aux Eph qu'aux récepteurs NMDA, dont elle module le temps d'ouverture du canal (Wang & Salter 1994, Lau & Huganir 1995, Zisch *et al.* 1998). L'utilisation d'inhibiteurs ou de formes dominantes négatives de Fyn, membre de la famille Src, annulait cette augmentation. La transfection de cellules HEK293 avec une forme mutante de EphB2 dépourvue de sa capacité d'association avec Src, mais catalytiquement active, empêchait aussi l'activation de NR2B. L'activation des Src par EphB2 serait donc nécessaire à l'activation de NR2B.

#### *1.3.2.3.2 Interactions indirectes des Eph avec les récepteurs AMPA*

Les récepteurs Eph ont aussi des interactions avec des protéines qui, elles-mêmes interagissent avec des récepteurs glutamatergiques AMPA.

Ainsi des interactions ont été rapportées entre EphA7, EphB2 (Torres *et al.* 1998) ou l'éphrine-B3 (Lin *et al.* 1999) avec GRIP1, une protéine à domaine PDZ connue pour ses interactions avec les sous-unités GluR des récepteurs AMPA (Song & Huganir 2002). GRIP1 facilite l'accumulation des récepteurs AMPA à la surface post-synaptique, en s'associant avec GluR2, et aurait un rôle prépondérant dans le trafic de certaines protéines, comme le suggère son association avec KIF5 (ou kinésine-1), une protéine motrice associée



aux microtubules (Setou *et al.* 2002). L'abolition de l'expression de GRIP1 par ARN interférant, dans des cultures de neurones hippocampiques, provoque une perte importante de la surface couverte par les dendrites et une délocalisation de GluR2, de EphB2 et de KIF5 vers la région péri-golgienne du corps cellulaire (Hoogenraad *et al.* 2005). Mais cette perte dendritique peut être prévenue par une surexpression de EphB2 ou de son domaine extracellulaire (mais non par EphA4 ou EphA7). La surexpression de son seul domaine intracellulaire dans des neurones reproduit le phénotype de perte de dendrites. Le blocage de la liaison GRIP1-KIF5 inhibe le trafic de EphB2 et la croissance dendritique. GRIP1 servirait ainsi de protéine adaptatrice pour le transport, dépendant de la kinésine, de EphB2 aux dendrites.

De manière similaire, PICK1 interagit avec des sous-unités du récepteur AMPA. Cependant, contrairement aux GRIPs, PICK1 induit une baisse de GluR2 en surface, en stimulant l'internalisation du récepteur (Song & Huganir 2002). PICK1 interagit aussi avec EphB2 (voir ci-dessus, chapitre III.1.1). Il semble donc que les EphB pourraient influencer le fonctionnement et le trafic des récepteurs AMPA à la surface des synapses par le biais de ces interactions.

De plus, il a été démontré récemment que la synaptojanine-1, une phosphatidylinositol 5'-phosphatase impliquée dans l'endocytose sous médiation de la clathrine (McPherson *et al.* 1996), est un substrat physiologique de EphB2 (Irie *et al.* 2005). Un traitement avec l'éphrine-B2-Fc agrégée entraîne la phosphorylation de la

synaptojanine-1 dans des neurones hippocampiques en culture. La cotransfection de la synaptojanine-1 et de EphB2 dans des cellules HEK293 a permis de démontrer que cette phosphorylation dépendait du domaine kinase d'EphB2 et avait lieu sur les tyrosines du domaine riche en prolines. Cette phosphorylation aurait pour conséquence d'inhiber la liaison de la synaptojanine-1 à l'endophiline et ainsi, son activité 5'phosphatase. La synaptojanine-1 et l'endophiline contribuent à la séparation du manteau de clathrine des vésicules internalisées, précédant leur livraison aux compartiments endosomaux (Song & Zinsmaier 2003). L'expression en culture d'une synaptojanine-1 non phosphorylable bloque l'internalisation des sous unités GluR1 lors de la stimulation par AMPA. Le même effet est constaté après l'expression de EphB2 avec un domaine kinase non fonctionnel. La signalisation induite par les éphrines aurait donc un rôle potentiel dans l'endocytose, notamment celle des récepteurs glutamatergiques, et pourrait participer aussi bien en pré-qu'en post-synaptique au fonctionnement de la synapse.

#### *1.3.2.3.3 Les éphrines et les Eph dans la plasticité synaptique et la potentialisation à long terme*

Tout d'abord une meilleure définition de la plasticité et des phénomènes de LTP nous permettra de mieux comprendre les différentes interprétations possibles des résultats des expériences mentionnées ci-dessous.

La classification de différents types d'activité synaptique est basée sur l'échelle temporelle dans laquelle ils interviennent. La plasticité à court terme représente des

potentialisations ou dépressions de réponses synaptiques qui durent de quelques secondes à quelques minutes. La plasticité à court terme est généralement expliquée par des effets pré-synaptiques directs comme une élévation résiduelle en concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ou une déplétion de plusieurs pools de vésicules rapidement libérables. En contraste, la plasticité à long terme représente des changements de plusieurs heures à plusieurs semaines. On parle d'une amélioration de la force synaptique pour la LTP et d'une réduction pour la LTD.

La plasticité d'origine pré-synaptique est modulée par l'augmentation ou la baisse de libération de neurotransmetteurs, alors que la plasticité d'origine post-synaptique implique des changements en nombre et propriété des récepteurs post-synaptiques, sans changement au niveau de la libération des neurotransmetteurs (Garcia-Junco-Clemente *et al.* 2005).

Les premières preuves de l'implication des Eph dans la plasticité synaptique sont venues d'études visant à perturber l'activité des EphA et des éphrines-A endogènes dans l'hippocampe à l'aide soit d'éphrine-Fc soit de Eph-Fc non agrégées, infusées *in vivo*. Les traitements avec l'éphrine-A5-Fc ou EphA5-Fc produisent des effets inverses sur la LTP (Gerlai *et al.* 1999). Tout d'abord, l'infusion *in vivo* de EphA5-Fc a diminué la taux de réussite des souris traitées à des tests de mémoires, contrairement à l'infusion d'éphrine-A5-Fc qui a contribué à améliorer leurs performances. De plus, l'analyse de la LTP sur des tranches d'hippocampe provenant des souris traitées, a montré que l'infusion de l'éphrine-

A5-Fc a permis une facilitation de la LTP, alors que l'infusion de EphA5-Fc a perturbé son maintien. Il a aussi été montré dans cette publication, que l'infusion *in vivo* de l'éphrine-A5-Fc non agrégée permettait l'augmentation de la phosphorylation de EphA5, alors que l'infusion de EphA5-Fc non agrégé l'inhibait (Meima *et al.* 1997, Winslow *et al.* 1995). La lecture des résultats est donc compliquée, et il faut ajouter que l'éphrine-A5-Fc ou EphA5-Fc peuvent virtuellement se lier à d'autres EphA et éphrines-A et ainsi perturber de nombreuses voies de signalisation. Or, la distribution des Eph et des éphrines dans l'hippocampe, particulièrement au niveau synaptique, n'est toujours pas établie et cette information demeure indispensable pour bien comprendre la signification des expériences ci-dessus.

Deux groupes ont également démontré des déficiences dans la LTP et dans la dépression à long terme au niveau de l'hippocampe de souris EphB2<sup>-/-</sup>. Bien que la transmission synaptique basale n'était pas affectée chez ces souris, la LTP en CA1 était altérée sélectivement dans sa phase persistante, qui suit normalement la stimulation des collatérales de Schaeffer par des bouffées de type thêta (Grunwald *et al.* 2001). De plus, la LTD et la dépotentialisation synaptique, induites par des stimulations à basse fréquence des collatérales de Schaeffer, étaient complètement abolies chez ces souris. Ces défauts de plasticité chez les souris knockouts ont pu être supprimés par l'expression d'une forme de EphB2 dépourvue d'activité kinase, indiquant que cette activité serait dispensable et que EphB2 agirait ici, en tant que ligand. Ces données dans le CA1 ont été reproduites et confirmées par une autre équipe (Henderson *et al.* 2001), qui, de plus, a montré que

l'induction de la LTP dans les fibres de la voie perforante médiane, faisant synapse sur les cellules granulaires du gyrus dentelé, était encore plus fortement atténuée que celle en CA1 chez les souris EphB2<sup>-/-</sup>. Cette différence pourrait être due à une expression différentielle du récepteur EphB2 dans ces couches cellulaires.

La LTP de CA1 est aussi affectée chez les souris éphrine-B2<sup>-/-</sup> ou éphrine-B3<sup>-/-</sup>. Elle est, en effet, fortement réduite dans ses phases précoce et tardive après des stimulations en bouffée thêta (Grunwald et al. 2004). La LTD est également anormale chez ces souris. Ces deux éphrines seraient ainsi impliquées dans les phénomènes de LTP et LTD hippocampiques dépendantes du récepteur NMDA. Or les éphrines-B2 et -B3 ont été associées, dans cette même étude, aux densités post-synaptiques par fractionnement cellulaire et par microscopie électronique, notamment au niveau des synapses en CA1. EphA4 a ainsi été envisagé comme un partenaire pré-synaptique dans ce processus, puisque ce récepteur peut se lier avec ces deux éphrines, et que les souris EphA4<sup>-/-</sup> montrent des déficits similaires de la LTP et de la LTD. De plus, chez les souris EphA4<sup>-/-</sup> la LTP et la LTD sont récupérées par l'expression de la forme de EphA4 sans activité kinase, indiquant un rôle de ligand probable dans ce phénomène. Cette publication témoigne des multiples possibilités d'interactions Eph-éphrines, de part et d'autres de la synapse, et du besoin urgent de détailler leurs distributions subcellulaires, afin de mieux comprendre leurs implications dans les processus plastiques à la synapse.

Les EphB participeraient aussi aux mécanismes de la LTP des connexions des fibres moussues dans CA3, décrite comme dépendante d'un changement du niveau libération du glutamate, donc d'origine pré-synaptique (Harris & Cotman 1986). L'injection intracellulaire, dans les cellules pyramidales de CA3, de peptides et d'anticorps interférant dans la liaison de EphB2 avec le domaine PDZ des protéines GRIPs, a conduit à une réduction de la LTP (Contractor *et al.* 2002). Cette LTP a été également réduite par l'application extracellulaire de l'éphrine-B1-Fc ou de EphB2-Fc non agrégée. Les auteurs ont donc conclu que les interactions des EphB avec des protéines PDZ, telles que les GRIPs, et les interactions trans-synaptiques entre EphB postynaptiques et éphrines-B pré-synaptiques seraient nécessaires à l'induction de la LTP aux synapses des fibres moussues. Encore une fois, le manque de données concernant la distribution des éphrines et des Eph permet d'envisager des conclusions biaisées. Cependant, la même équipe de recherche a par la suite observé, grâce à des souris exprimant l'éphrine-B3 fusionnée, en son C-terminal, à la  $\beta$ -galactosidase, que celle-ci était exprimée dans les fibres moussues (Armstrong *et al.* 2006). La LTP en CA3 était aussi altérée chez ces souris mutantes.

Les Eph et les éphrines semblent jouer divers rôles dans la plasticité et l'activité synaptique, mais il est encore aujourd'hui difficile de bien les définir. La complexité est d'autant plus grande que le nombre de Eph et d'éphrine est élevé, et que leur distribution n'est pas encore clairement caractérisée.

## **I.4. Structure, formation et fonctionnement d'une synapse chimique**

Comme nous le verrons plus loin, notre première étude sur la distribution subcellulaire des récepteurs EphA4 et EphB2 a permis de les localiser dans divers compartiments neuronaux, et notamment sur des vésicules et à la zone active pré-synaptique. Notre deuxième étude ayant porté plus précisément sur cette localisation vésiculaire, nous allons maintenant aborder brièvement la structure de la synapse chimique, la formation des terminaisons axonales et leur fonctionnement intracellulaire pendant l'activité synaptique.

### **I.4.1. Structure de la synapse chimique**

La synapse est constituée de part et d'autre de structures hyperspécialisées se faisant face, concentrées en récepteurs, protéines d'échafaudage et molécules de signalisation, avec du côté post-synaptique, les PSD, et du côté pré-synaptique, les zones actives.

La zone active est la région des membranes plasmiques pré-synaptiques où les vésicules synaptiques s'attachent, fusionnent et relâchent les neurotransmetteurs (Shapira *et al.* 2003). Cette région est caractérisée structurellement par un réseau de filaments denses aux électrons, associés à la membrane plasmique, entouré de vésicules juxtaposées en « paquets » (Siksou *et al.* 2007). Ce réseau ou matrice est essentiel au maintien de la zone active et à la régulation de la motilité des vésicules. Il est composé de plusieurs groupes de

protéines dont les SNARES (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive component attachment protein receptor*), Piccolo et Bassoon (Phillips *et al.* 2001, Rosenmund *et al.* 2003). Trois types de complexes protéiques assurent le fonctionnement de la zone active (Zhen & Jin 2004). Les complexes SNARES sont nécessaires à l'amarrage des vésicules et à leur fusion avec la membrane plasmique. Le second complexe composé de Munc 18/UNC-18 (*mammalian uncoordinated 18/ uncoordinated 18*), Munc 13/UNC 13 et de la synaptotagmine interagit avec les SNARES et régule l'exocytose de la vésicule. Enfin, le troisième complexe, formé de Piccolo et Bassoon, deux protéines de grandes tailles partageant une forte homologie et composées de multiples domaines de liaisons en super-hélice (« coiled-coil »), forme la cytomatrice qui permet d'organiser l'endocytose et l'exocytose.

La densité post-synaptique, ou PSD, apposée à la zone active, apparaît également dense aux électrons, plus large pour les synapses excitatrices, ou synapses asymétriques de type I, et plus étroite pour les synapses inhibitrices, ou synapses symétriques de type II. Les protéines la famille des MAGUK (pour *Membrane Associated Guanylate Kinase proteins*), dont PSD95, les récepteurs NMDA et AMPA, ainsi que la CaMKII (*Calcium-calmoduline-dependant kinase II*) sont des éléments clés des PSD des synapses excitatrices. Les protéines MAGUK se lient aux récepteurs et au cytosquelette, formant ainsi un réseau structurel dense, grâce notamment aux domaines PDZ de ces protéines (Kim & Sheng 2004).



### **I.4.2. Formation et maintien des terminaisons pré-synaptiques**

La formation des synapses dans le SNC est un processus finement régulé, en plusieurs étapes, qui requiert une communication bidirectionnelle de part et d'autre de la jonction synaptique.

Nous avons, dans les chapitres précédents, discuté de l'implication des Eph et des éphrines dans la formation et le maintien des épines dendritiques. Cela nous a permis de décrire ces processus plastiques, modelés notamment par le contrôle du cytosquelette d'actine. Les Eph et les éphrines viennent ainsi s'ajouter à de nombreuses familles de protéines, elles aussi impliquées dans ces processus, comme les neuroligines et les neurexines, les cadhérines, les SynCAMs (*synaptic Cell Adhesion Molecules*) et les récepteurs des neurotrophines et d'autres facteurs de croissance (Ethell & Pasquale 2005).

Cependant le rôle des Eph et des éphrines dans la formation et le maintien des terminaisons axonales étant à ce jour inconnu, nous avons considéré qu'il était pertinent de détailler leur distribution dans ce compartiment. Afin de mieux intégrer leurs rôles possibles au niveau de la terminaison, nous allons résumer ici les connaissances existantes sur la formation des terminaisons axonales.

Il a été d'abord suggéré que les protéines pré-synaptiques étaient préassemblées en paquet et transportées ensemble le long de l'axone jusqu'à la terminaison en formation (Ahmari *et al.* 2000). Une population d'organelles de transport hétérogène, en taille et en

forme, a été observée le long de l'axone, dont des organelles tubulovésiculaires et des vésicules denses (Nakata *et al.* 1998). Des études d'imagerie en microscopie électronique (Zhai *et al.* 2001), des observations en temps réel du trafic de la construction moléculaire GFP-Bassoon (Shapira *et al.* 2003), combinées avec du fractionnement cellulaire et de l'immunoisolation, ont permis d'identifier des vésicules d'environ 80 nm de taille, distinctes des organelles tubulo-vésiculaires, contenant les protéines Bassoon et Piccolo, qui ont été dénommées les vésicules de transport Piccolo/Bassoon (ou PTVs pour *Piccolo/Bassoon Transport Vesicles*). Ces vésicules se distinguent aussi par leur composition moléculaire, les PTV semblant contenir tout le matériel nécessaire à la formation des zones actives incluant Piccolo, Bassoon, Rim, Munc13 et -18, la syntaxine, SNAP-25 et la N-cadhérine. Cependant le matériel protéique spécifique aux vésicules synaptiques, comme la synaptobrevine II, la synaptophysine ou la synaptotagmine, serait plutôt associé aux organelles tubulo-vésiculaires. Ces organelles seraient assemblées dans le corps cellulaire au niveau de la partie Trans de l'appareil de Golgi (Dresbach *et al.* 2006, Sytnyk *et al.* 2004).

Piccolo et Bassoon ont récemment été observés en microscopie électronique sur des agrégats vésiculaires contenant un mélange de vésicules à cœur dense et de petites vésicules de type synaptique (Tao-Cheng 2007). Ces agrégats seraient responsables de l'apport protéique à la zone active au lieu d'un type unique de vésicule PTV. Ces agrégats ne seraient cependant présents qu'à des stades post-natals précoces (jusqu'à P6).

La formation des terminaisons axonale n'est pas encore totalement comprise et il existe plusieurs théories. L'une propose une régulation précise et organisée de chaque contact synaptique, orchestré par un ensemble de molécules de guidages et de liaison. Une autre, moins déterministe, suggère la formation de ces synapses suivant un modèle stochastique déterminé par un ensemble de forces mécaniques déstabilisantes, agissant à n'importe quel moment et profitant de la présence appropriée de molécules de surface pouvant stabiliser le contact, et de la présence de « paquets de transport » nécessaires, sous entendu de matériel synaptique comme les PTV ou les organelles tubulo-vésiculaires (Ziv & Garner 2004). Ces « paquets » de transport de matériels pré-synaptiques seraient activement transportés le long de l'axone et stabilisés aux sites de contacts synaptiques (Ahmari et al. 2000). Il reste cependant de nombreuses questions quant aux mécanismes de formation synaptique pour comprendre ce phénomène complexe.

### **I.4.3. Activité synaptique et trafic vésiculaire**

Les terminaisons neuronales sont des machines de sécrétion dédiées à la libération consécutive et répétée de neurotransmetteurs. Lors d'un potentiel d'action, les canaux calciques sont ouverts, ce qui provoque l'exocytose des vésicules chargées en neurotransmetteur. Après exocytose, les vésicules synaptiques sont endocytées, recyclées et rechargées en neurotransmetteurs pour un nouveau tour. Ce cycle, les vésicules synaptiques l'effectuent en plusieurs phases séquentielles (Sudhof 2004). Premièrement, les neurotransmetteurs sont activement transportés dans les vésicules grâce à des transporteurs

spécifiques, comme VGLUT1 ou 2 (pour *Vesicular Glutamate Transporter*) pour le glutamate, ou VGAT (pour *Vesicular GABA Transporter*) pour le GABA. Les vésicules s'agrègent à la zone active, puis y stationnent. Là, elles deviennent compétentes à réagir à l'ouverture des canaux calciques. Après la fusion membranaire et l'ouverture du pore, la vésicule relâche les neurotransmetteurs et peut être recyclée. Les vésicules peuvent être rapidement réacidifiées et rechargées sans se décrocher de la zone active, elles constituent alors le pool de vésicules rapidement libérables, un processus dénommé le « kiss and stay ». Les vésicules synaptiques peuvent également être recyclées localement, le « kiss and run », ou par les voies d'endocytose dépendante de la clathrine.

## **I.5. Hypothèses de travail et objectifs**

### **I.5.1. Hypothèses**

D'après les études recensées ci-dessus, les Eph seraient impliqués directement dans le fonctionnement des synapses, que ce soit dans la modulation morphologique des épines dendritiques, ou dans les processus de synaptogenèse et de plasticité synaptique.

Cependant, les caractéristiques mêmes des Eph et de leurs interactions avec les éphrines rendent complexe l'interprétation des observations rapportées ci-dessus et la compréhension de leurs mécanismes. En effet, la forte homologie entre les Eph et les éphrines, respectivement, est vraisemblablement responsable de la grande difficulté d'obtenir des anticorps spécifiques pour chacune de ces molécules. Par exemple, nous

avons nous-mêmes testé plusieurs anticorps sur des souris knockouts, et constaté que la majorité était non spécifique. Aussi, l'utilisation de protéines de fusion, Eph-Fc ou éphrine-Fc, qui peuvent agir respectivement sur plusieurs ligands ou récepteurs (phénomène de promiscuité des affinités de liaison), de manière agoniste ou antagoniste (selon leur état d'agrégation), ne facilite pas l'interprétation des données. Enfin, il faut ajouter à cela le phénomène de la signalisation bidirectionnelle, où les effets observés peuvent être attribuables à la cellule qui porte le « ligand » autant qu'à celle portant le « récepteur ». D'où le besoin aigu de mieux connaître la localisation précise de chacune de ces molécules, au niveau cellulaire et subcellulaire de ces molécules, dans le SNC adulte, autant que pendant le développement.

Notre hypothèse générale est donc que la localisation devrait refléter la fonction de ces molécules. Par exemple, au niveau synaptique dans le SNC adulte, cette connaissance devrait permettre de mieux comprendre le rôle des molécules localisées en pré-synaptique ou en post-synaptique, de même que de celles qui sont situées dans des organelles ou compartiments particuliers (vésicules de divers types, zones actives pré-synaptiques, densités post-synaptiques, ou membranes plasmiques des dendrites, épines ou terminaisons axonales).

### **I.5.2. Objectifs de recherche**

Nous avons ciblé notre recherche sur deux des récepteurs les plus étudiés chez l'adulte, EphA4 et EphB2. À cette fin nous avons, à notre disposition, des anticorps caractérisés et spécifiques, un atout indispensable à l'étude de ces molécules. En effet, nous avons obtenu plusieurs souches de souris transgéniques qui nous ont permis de tester plusieurs anticorps anti-Eph ou anti-éphrines. Ce travail nous a permis de démontrer la spécificité de certains anticorps anti-EphA4. Nous avons aussi pu disposer d'un anticorps anti-EphB2 dont la spécificité avait été démontrée dans le laboratoire de la Dre Elena Pasquale, sur des lignées cellulaires.

Notre objectif initial était donc de définir précisément la localisation des récepteurs EphA4 et EphB2 au niveau subcellulaire et synaptique, dans le SNC mature, en utilisant l'immunocytochimie en microscopie électronique et le fractionnement cellulaire et synaptique conjugués au transfert western.

Au vu de nos premiers résultats, nos objectifs subséquents ont ensuite été d'étudier le trafic et la distribution vésiculaires du récepteur EphA4 au niveau des terminaisons axonales. Nous avons pour cela utilisé l'immunocytochimie en microscopie électronique et confocale, le fractionnement cellulaire, l'immunoisolation de vésicules synaptiques et la stimulation de l'activité de neurones en culture.

**Chapitre II**  
**Presynaptic and postsynaptic localization of EphA4 and  
EphB2 in adult mouse forebrain**

**Journal of Neurochemistry, 2008 Apr 12; sous presse.**

Ma contribution à cette étude a été la réalisation de l'intégralité des expériences de fractionnement, l'analyse quantitative des micrographies de microscopie électronique, la rédaction de la première version du manuscrit et des figures, et la collaboration aux versions subséquentes.

## **Presynaptic and postsynaptic localization of EphA4 and EphB2 in adult mouse forebrain**

David Bouvier<sup>1</sup>, Amadou T. Corera<sup>2</sup>, Marie-Ève Tremblay<sup>1</sup>, Mustapha Riad<sup>1</sup>, Miguel Chagnon<sup>5</sup>, Keith K. Murai<sup>3</sup>, Elena B. Pasquale<sup>4</sup>, Edward A. Fon<sup>2†</sup>, Guy Doucet<sup>1†\*</sup>


<sup>1</sup> Département de pathologie et biologie cellulaire and Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC), Université de Montréal, Montréal, QC

<sup>2</sup> Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, and Montreal Neurological Institute, Montréal, QC

<sup>3</sup> Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, and Centre for Research in Neuroscience, Montreal General Hospital, Montréal, QC

<sup>4</sup> The Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, CA

<sup>5</sup> Département de mathématiques et de statistiques, Université de Montréal, Montréal, QC

\**Corresponding author*, Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7. E-mail: , Telephone: 514-343-6255, Fax: 514-343-5755.

<sup>†</sup>EAF and GD contributed equally to the supervision of this study



## **Abbreviations**

AMPA, alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate; CA1/CA3, Cornu ammonis sectors of hippocampus; CNS, central nervous system; CtxD, deep layers, v-vi, of primary motor cortex; EEA1, early endosome antigen-1; GluR2/3, subunits of AMPA-type glutamate receptors; GM130, Golgi membrane-130; GST, glutathione-s-transferase; NR1, NMDA receptor subunit; PMSF, phenylmethanesulphonylfluoride; PSD, postsynaptic density; SIGP, silver-intensified immunogold particle; VP, virtual particles.

## **Abstract**

The ephrin receptors EphA4 and EphB2 have been implicated in synaptogenesis and long-term potentiation in the cerebral cortex and hippocampus, where they are generally viewed as postsynaptic receptors. To determine the precise distribution of EphA4 and EphB2 in mature brain synapses, we used subcellular fractionation and electron microscopy to examine the adult mouse forebrain/midbrain. EphA4 and EphB2 were both enriched in microsomes and synaptosomes. In synaptosomes, they were present in the membrane and the synaptic vesicle fractions. While EphA4 was tightly associated with PSD-95-enriched postsynaptic density fractions, EphB2 was easily extracted with detergents. In contrast, both receptors were found in the presynaptic active zone fraction. By electron microscopy, EphA4 was mainly detected in axon terminals, whereas EphB2 was more frequently detected in large dendritic shafts, in the hippocampus and cerebral cortex. However, in the ventrobasal thalamus EphB2 was detected most frequently in axon terminals and thin dendritic shafts. The localization of EphA4 and EphB2 in multiple compartments of neurons and synaptic junctions suggests that they interact with several distinct scaffolding proteins and play diverse roles at synapses.

**Keywords:** Cerebral cortex, hippocampus, thalamus, synaptogenesis, ephrin receptors, cell fractionation, electron microscopy, immunohistochemistry

**Running title:** EphA4 and EphB2 at mature CNS synapses

## Introduction

The Eph receptor family has 14 members in mammals and is divided into two classes, EphA receptors (A1-8, and A10) and EphB receptors (B1-4, and B6), based on their sequence homologies and their binding affinities for ephrinA (A1-A5) or ephrinB (B1-B3) ligands (Himanen & Nikolov 2003). EphA receptors interact with ephrinA ligands, and EphB receptors with ephrinB ligands, with two known exceptions: EphA4 is also activated by ephrinB2 and ephrinB3 (Gale *et al.* 1996), and EphB2 by ephrinA5 (Himanen *et al.* 2004). Reciprocal trans-activation of Eph receptors and ephrins on adjacent cells leads to their clustering and induces bidirectional signaling, notably through cytoskeletal proteins involved in cell motility. Eph-ephrin interactions can activate both repulsive and attractive forces between cells (Klein 2001) and have been implicated in cell migration, axon guidance, and topographic mapping in the developing nervous system (Klein 2004). Several Eph receptors and ephrins are also widely expressed in the adult central nervous system (CNS), where they appear to regulate synaptic function and plasticity (Martinez & Soriano 2005, Yamaguchi & Pasquale 2004).

EphA4 and EphB2 are the Eph receptors most intensively studied in the adult CNS. By *in situ* hybridization and immunohistochemistry, they have been detected in many regions and cell types, notably in the neocortex and hippocampus (Liebl *et al.* 2003, Moreno-Flores & Wandosell 1999, Grunwald *et al.* 2001, Goldshmit *et al.* 2006, Henderson *et al.* 2001, Tremblay *et al.* 2007). At the subcellular level, these receptors are believed to be mainly associated with dendritic spines and postsynaptic densities (PSDs)

(Martone *et al.* 1997, Buchert *et al.* 1999, Murai *et al.* 2003, Torres *et al.* 1998, Grunwald *et al.* 2004) and have been implicated in dendritic spine morphogenesis and LTP (Murai *et al.* 2003, Armstrong *et al.* 2006, Contractor *et al.* 2002, Grunwald *et al.* 2004, Grunwald *et al.* 2001, Henderson *et al.* 2001). However, a qualitative and quantitative overall assessment of the distributions of EphA and EphB receptors in discrete neuronal compartments has not been performed. Accurate knowledge of their precise localization will help clarify their functions in the mature CNS.

In the present study, we have examined the subsynaptic distribution of EphA4 and EphB2 by cell and synaptosome fractionation, and by pre-embedding immunohistochemistry (immunoperoxidase and immunogold with silver intensification) in conjunction with electron microscopy. Our results shed new light on the precise synaptic localization of the EphA4 and EphB2 receptors in the adult mouse forebrain and will help to define their respective roles in synaptogenesis and synaptic plasticity, particularly in the hippocampus where they have been most extensively characterized.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

All procedures were conducted in strict accordance with the *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (Ed2) of the Canadian Council on Animal Care. The experimental protocols were approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal. The animals were housed at constant temperature (21°C) and humidity (60%), under a fixed 12 h light/dark cycle and with free access to food and water.

Cell fractionation experiments were conducted on 36 adult male C57BL/6 mice (4 for each fractionation). These animals were decapitated under deep halothane anesthesia.

The electron microscopic analysis was carried out on brain tissue from one EphA4 KO (EphA4<sup>-/-</sup>), one wild-type littermate (EphA4<sup>+/+</sup>) (Dottori *et al.* 1998) and 4 C57BL/6 adult male mice. These animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) and perfused through the aortic arch with a solution of 3.5 % acrolein, followed by 4 % paraformaldehyde (PFA), both in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were further fixed by immersion in 4% PFA for 1 h at 4°C, washed in sodium phosphate-buffered saline (PBS; 0.9% NaCl in 50 mM PB, pH 7.4). Transverse sections, 50 µm thick, were cut in cooled PBS with a vibratome.

### **Antibodies**

The anti-EphA4 antibody (Ab11), raised in rabbit against the last 11 carboxyterminal amino acids of EphA4, has been shown to recognize EphA4 in rat, mouse and human (Soans *et al.* 1994, Martone *et al.* 1997, Murai *et al.* 2003). The specificity of this antibody has been previously demonstrated by the absence of labeling in EphA4<sup>-/-</sup> mice (Tremblay *et al.* 2007).

The anti-EphB2 antibody was made using a glutathione-s-transferase- (GST) fusion protein containing the 99 carboxy-terminal amino acids of chicken EphB2 as the antigen, as described (Holash & Pasquale 1995). The antibody was affinity purified using the antigen and adsorbed on a GST fusion protein of the equivalent region of EphB4 to eliminate possible cross-reacting antibodies and anti-GST antibodies. This antibody was shown to

recognize mouse and human EphB2 (91 of the 99 carboxyterminal amino acids are identical between chicken and mouse): it has also been used to immunoprecipitate EphB2 from mouse hippocampal neurons (Henkemeyer *et al.* 2003), and produces no staining in Western blots of human cancer cells known to lack EphB2, but expressing EphB3 and EphB4 (N. Noren and E. B. Pasquale, unpublished results). It also recognizes EphB2, and not the closely related EphB4, in Western blots of transfected HEK293 cells (Supplementary Fig. S1). Labelling of the mouse hippocampus with the anti-EphB2 antibody (Fig. S2) is similar to that previously published using a different anti-EphB2 antibody (Grunwald *et al.* 2001, Fig. 1I). The staining with the anti-EphB2 antibody is also consistent with *in situ* hybridization results for EphB2 (Grunwald *et al.* 2001, Fig. 1C), but not for EphB1 or EphB3 (Grunwald *et al.* 2001, Fig. 1A,E), and with  $\beta$ -galactosidase staining in knock-in mice expressing EphB2 fused to  $\beta$ -galactosidase in place of wild-type EphB2 (Grunwald *et al.* 2001, Fig. 1H).

The rabbit polyclonal anti-synaptosome-associated protein-25 (SNAP-25) antibody was a gift from Dr. Peter McPherson (Montreal Neurological Institute, Montréal, QC, Canada). The monoclonal anti-synaptophysin antibody was purchased from Sigma, the monoclonal anti-GluR2/3 from Chemicon, and the monoclonal anti-postsynaptic density protein-95 (PSD95), anti-NR1, anti-early endosome antigen-1 (EEA1) and anti-Golgi membrane-130 (GM130) antibodies, from BD Transduction Laboratories (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada).

## **Subcellular fractionation, purification of PSD fractions, and separation of pre- and postsynaptic fractions**

All the following fractionation procedures were reproduced at least 3 times in separate experiments. Subcellular fractions were prepared from mouse forebrain/midbrain, as described by Huttner et al (1983, see supplementary material in Zhou *et al.* 2007, for details). Briefly, the forebrain/midbrain was dissected on ice, following a transverse cut between the occipital cortex and cerebellum. The whole forebrain/midbrain was used for fractionation experiments in order to obtain sufficient amount of proteins in the end fractions. All subsequent procedures were done at 0-4°C. Brain tissues were homogenized in ice-cold sucrose/HEPES buffer (0.32 M sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.4) containing protease inhibitors. The nuclear material (P1) was discarded following centrifugation at 1 000 x g, and the supernatant (S1) was centrifuged again at 17 500 x g. The resulting supernatant (S2) was used to prepare the cytosolic (S3) and microsomal (P3) fractions. The pellet, containing the crude synaptosomal fraction (P2), was re-suspended in sucrose/HEPES buffer, layered on top of a discontinuous sucrose gradient and ultra-centrifuged. Six milliliters of the fraction collected at the 0.8 / 1.2 M interface were washed with sucrose/HEPES buffer and centrifuged at 20 000 x g. The resulting pellet, constituting the purified synaptosomal fraction (P2'), was re-suspended in approximately 2 ml of sucrose/HEPES buffer. One to 1.5 ml of this P2' fraction was lysed osmotically in 10 mM HEPES buffer containing protease inhibitors, homogenized, and centrifuged at 33,000 x g. The pellet, representing the total synaptosomal membrane fraction (LP1), was re-suspended

in sucrose/HEPES buffer. The supernatant (LS1) and the S2 fraction were ultra-centrifuged at 260 000 x g, to obtain, respectively, the crude vesicle fraction (LP2) and the cytosolic (S3) and microsomal (P3) fractions.

Postsynaptic density (PSD) fractions were obtained as described (Cho *et al.* 1992 , see supplementary material, in Zhou *et al.* 2007). The P2' fraction was incubated in 50 mM Tris buffer containing 0.5% Triton X-100, followed by centrifugation (32 000 x g, 20 min). The resulting pellet (PSD-I) was re-suspended in Tris buffer. The PSD-II and PSD-III fractions were obtained by treating aliquots of PSD-I fraction with 0.5% Triton X-100 in 50 mM Tris buffer (pH 7.4), or with 3% Sarcosyl in 50 mM Tris buffer containing 1 mM EDTA, respectively. The suspensions were centrifuged at 200 000 x g. The resulting PSD-II and PSD-III fractions were solubilized in 5% SDS.

Presynaptic, postsynaptic and extra-junctional synaptic proteins were separated according to a method previously described (Phillips *et al.* 2001, Pinheiro *et al.* 2005, Rebola *et al.* 2005, Rebola *et al.* 2003), with some modifications (see Zhou *et al.* 2007, supplementary material). Briefly, purified synaptosomes (P2') were suspended in ice-cold CaCl<sub>2</sub>, before adding a solubilization buffer (2% Triton X-100 in 40 mM Tris, pH 6.0). They were incubated on ice with gentle agitation, and the insoluble synaptic junctions were pelleted (40 000 x g). At this pH, the junctional synaptic complexes are isolated at high yield and purity. The supernatant (extra-junctional membranes fraction, including plasma and vesicle membranes) was decanted, and its proteins were precipitated with acetone, at -20°C, and recovered by centrifugation at 18 000 x g. The pellet of the 40 000 x g



centrifugation, above (synaptic junctions), was washed in pH 6.0 solubilization buffer, re-suspended in pH 8.0 solubilization buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris, pH 8.0), incubated on ice, and centrifuged at 40 000 x g. This pH increase (6 to 8) released presynaptic active zones (supernatant) from the PSDs, which remained in the pellet. The latter was subjected to a further extraction with pH 8.0 solubilization buffer and centrifuged as above for maximal recovery of the presynaptic active zone proteins. The two supernatants were combined, precipitated with acetone and spun down at 18 000 x g. These sub-synaptic fractions (extra-junctional membranes, presynaptic active zones and PSDs) were solubilized in 5% SDS.

Protein concentration was assessed in every fraction with the BCA protein assay kit (Pierce; Rockford, IL), using bovine serum albumins as a standard. Aliquots of all brain fractions were used for Western blotting. Equal amounts (10 µg) of protein from every fraction were separated on SDS-PAGE, blotted following standard procedures, and revealed with enhanced luminol-based chemiluminescence (ECL Western Blotting Substrate; Pierce).

### **Immunohistochemistry**

Sections were processed free-floating by pre-embedding immunoperoxidase and immunogold protocols (see Tremblay et al. 2007) using 1 µg/ml of the primary rabbit anti-EphA4 or anti-EphB2 antibodies, without Triton X-100. For electron microscopy, sections were post-fixed flat in 1% osmium tetroxide, embedded in resin (Durcupan ACM; Sigma), and mounted onto ACLAR embedding film (EMS, Hatfield, PA). Small pieces of the

latero-ventral hippocampus (CA1 radiatum and CA3 lucidum-radiatum), the deep layers (V-VI) of the primary motor cortex, and the ventrobasal thalamus were excised from the embedding film, re-embedded at the tip of resin blocks, sectioned (70-80 nm-thick) with an ultramicrotome (Ultracut S, Leica), collected on bare square-mesh copper grids, stained with lead citrate, and examined at 60 kV with a Philips CM100 electron microscope.

### **Data analysis**

Electron microscopic examination was carried out on material from 4 C57BL/6 mice, as well as from the EphA4<sup>-/-</sup> and EphA4<sup>+/+</sup> adult male mice (the latter two processed together, in the same vials). The immunoperoxidase labeling was first examined to identify the types of cellular profiles (dendrites, axons, dendritic spines, axon terminals, glial processes, etc.) that were immunoreactive with the EphA4 and EphB2 antibodies. Six pictures per region randomly taken at 8 900 X, covering ~300  $\mu\text{m}^2$ , were used to assess the relative proportions of each type of profiles labeled.

To refine the subcellular localization (plasma membranes, synaptic vesicles, PSDs, etc.), we used the pre-embedding silver-intensified immunogold procedure (attempts with a post-embedding approach were unsuccessful). To analyze the distribution of the silver-intensified immunogold particles (SIGP), 10 pictures per region (CA1 radiatum, CA3 lucidum-radiatum, deep layers of primary motor cortex, ventrobasal thalamus), covering ~500  $\mu\text{m}^2$ , were randomly taken at 8 900 X, in one animal (except for CA3 lucidum-radiatum, which was analyzed in 3 mice), for each of EphA4 and EphB2. Film negatives were scanned (Epson, Perfection 3200) and converted into positive pictures at a final

magnification of 28 500. Images were adjusted for brightness and contrast with Adobe Photoshop (CS) software.

The identification of neuronal or glial cell bodies or processes (axons, dendrites, dendritic spines, axon terminals, glial processes) was made using criteria defined in Peters *et al.* (1991), as in Tremblay *et al.* (2007). Compared to abundant proteins, such as neurotransmitter receptors (e.g., see Riad *et al.* 2001), the relatively low labeling for EphA4 or EphB2 yielded few SIGP per small cellular profile in the electron microscope images. A statistical analysis of the distribution of SIGP was thus required to determine the labeled structures. SIGP were scored in separate compartments: perikarya; astrocytes (the latter two were eventually pooled with “other”, with unidentified processes); pre-synaptic active zones, vesicles, plasma membrane and “others” (unidentifiable organelles) of axon terminals; plasma membrane and core of dendrites; and PSD, plasma membrane and “others” of dendritic spines.

In order to estimate the relative area covered by each type of cellular element, as well as the relative probability of each cellular element of being labeled by randomly attached particles, the distribution of a comparable number of virtual particles (VP) of the same size was also scored. To this end, patterns of uniformly distributed VP, made with Photoshop, were overlaid onto the same EM pictures. Indeed, a regular array of particles becomes random in relation to the irregular distribution of the various types of cellular profiles such as dendrites, axon terminals axons dendritic spines, glial processes and so forth, as they

appear in EM pictures (see Descarries *et al.* 1982 and Figure S3 in Supplementary Material).

The distributions of SIGPs vs VPs were compared using the Pearson's chi-square test (FREQ procedure, SAS Program, version 8.0, The SAS Institute, [www.sas.com](http://www.sas.com)). In addition, comparing the numbers of EphA4-SIGPs in area CA3 of the hippocampus in EphA4<sup>-/-</sup> and EphA4<sup>wt</sup> mice and the distributions of SIGPs and VPs in EphA4<sup>-/-</sup> mice, served to assess the ratios and distribution of background particles.

Pearson's chi-square analysis was first used to compare the distribution of the particles among neuropil cellular profiles in the thin sections (axons, axon terminals, dendrites, and dendritic spines, see Table 1: for each type of profile, we used the summation of the particles scored on their various organelles). In a second step, we analyzed the distribution of the particles among the different organelles or compartments of each type of neuronal profiles (membrane vs core of dendrites; pre-synaptic active zone, synaptic vesicles, plasma membrane or "others" of axon terminals; and PSD, plasma membrane or "others" of dendritic spines). We used the calculation of the exact chi-square distribution, for organelles, to take into account the small size of some samples. To account for the multiple comparisons made on the same data set, differences were considered significant only when  $p < 0.01$ . Results where  $p$  was between 0.01 and 0.05 are described as trends.

## Results

### **EphA4 and EphB2 are detected in microsomes and various synaptosomal compartments**

Only limited data exist that address the subcellular distribution of Eph receptors in neurons and glia of the adult rodent brain (Torres et al. 1998, Grunwald et al. 2004). We used differential centrifugation to compare the distribution of Eph receptors from each subclass, EphA4 and EphB2, in the adult mouse forebrain/midbrain. A fractionation protocol (Huttner et al. 1983) was used to separate non-synaptic fractions (cytosol and microsomes) from synaptosomes (P2') (Fig. 1). Synaptosomes were further separated into synaptosomal membranes (LP1, enriched in plasma membrane, large internal membranes and mitochondria) and synaptosomal vesicles (LP2). Several markers were used to characterize the various fractions: NR1 and GluR2/3 for synaptosomal and PSD fractions, PSD95 for PSDs, synaptophysin for synaptic vesicles and presynaptic active zones, SNAP25 for presynaptic active zones, and EEA1 and GM130, respectively, for early endosomes and Golgi membranes.

The two Eph receptors had a similar distribution in these fractions, which represent different cellular compartments. They were abundant in the microsomal fraction, which was enriched in the Golgi membrane marker, GM130, and the endosomal marker, EEA1. The detection of synaptophysin in this fraction is likely due to its presence in transport vesicles. Furthermore, both EphA4 and EphB2 were present at high levels in the purified synaptosomal fraction, which was also enriched in the AMPA and NMDA glutamate

receptor subunits, GluR2/3 and NR1 respectively, as well as the synaptic vesicle protein, synaptophysin. The absence of the transmembrane glutamate receptors in the cytosolic fraction further confirmed the purity of the fractions. Separation of membranes (LP1) and synaptic vesicles (LP2) from the synaptosomal fraction showed that EphA4 and EphB2 were enriched in the synaptosomal membranes marked by GluR2/3 and NR1, which are associated with postsynaptic membranes. The two Eph receptors were also detectable in the synaptic vesicle fraction, which was enriched in synaptophysin and devoid of the glutamate receptor markers.

These results indicate that EphA4 and EphB2 are associated with intracellular organelles, such as microsomes and synaptic vesicles, as well as with the synaptosomal membranes, which contain both pre- and postsynaptic membranes.

#### **Strong association of EphA4, but not EphB2, with the postsynaptic density**

Since Eph receptors had previously been reported to be localized in postsynaptic structures, we used a second protocol to purify PSDs in order to examine the association of Eph receptors with postsynaptic elements. Different PSD protein fractions were prepared from purified synaptosomes using sequential Triton X-100 and Sarcosyl extractions (Cho et al. 1992) (Fig. 2). Treatment of purified synaptosomes with Triton X-100 resulted in a relative enrichment of EphA4 in the PSD-I pellet, although not as strongly as that of NR1, GluR2/3 or PSD-95, which are known to be concentrated in PSDs. In contrast, the Triton X-100 treatment almost totally extracted EphB2 from the PSDs.

To further purify postsynaptic density components, the PSD-I fraction was extracted again with Triton X-100, which slightly enriched GluR2/3, NR1 and PSD-95 in the PSD-II fraction. EphA4 was also slightly further enriched following this second extraction with Triton X-100, but EphB2 was not. Extraction of the PSD-I fraction with Sarcosyl reduced the concentration of EphA4 in the resulting PSD-III fraction, in a fashion similar to NR1 and GluR2/3, whereas PSD-95 was further enriched. EphB2 was not detected in PSD-III. Thus, EphA4 is associated with PSD fractions and behaves similarly to glutamate receptor subunits in this extraction protocol. A substantial amount of EphA4 was resistant to extraction with Triton X100 and Sarcosyl, suggesting a strong association with the core (or junctional lattice) proteins of the PSDs. Surprisingly, EphB2 was only weakly associated with the PSD fraction, as it was extracted with Triton X-100 and Sarcosyl.

#### **EphA4 and EphB2 are present in the presynaptic active zone**

The subcellular fractionation experiments described above show that EphA4 and EphB2 are associated with synaptic membranes, but do not provide information as to the possible presynaptic localization of the two receptors. Therefore, we used a different synaptic fractionation protocol to separate the pre- and postsynaptic junctional densities from the “*extra-junctional*” membranes (pre- and postsynaptic plasma and vesicle membranes of synaptosomes) and the pre- and postsynaptic *junctional* elements (presynaptic active zones and PSDs) from each other (Phillips et al. 2001, Pinheiro et al. 2005, Rebola et al. 2005, Rebola et al. 2003) (Fig. 3).

Purified synaptosomes were first extracted with 1% Triton X-100 at pH 6, which solubilizes the plasma membrane and vesicle membranes, yielding a soluble extra-junctional fraction and an insoluble pellet consisting of pre- and postsynaptic junctional lattices. Treatment of these synaptic junctions with 1% Triton X-100 at pH 8 detached the presynaptic web from the insoluble PSDs, yielding the presynaptic active zone and PSD fractions. This protocol yielded the expected distributions of markers for the presynaptic active zone (SNAP-25, a protein of the SNARE complex responsible for the fusion of vesicles with the presynaptic active zone) and of markers for synaptic vesicles (synaptophysin) and for the PSDs (PSD-95, NR1 and GluR2/3). A portion of the synaptophysin remained in the presynaptic active zone fraction and likely represents synaptophysin associated with docked or fused vesicles, as recently shown by immunogold labeling (Tao-Cheng 2006). On the other hand, some SNAP-25 was detected in the PSD fraction, suggesting that some presynaptic active zone proteins remained associated with the PSDs (Phillips et al. 2001).

EphA4 and EphB2 were both detected in the extra-junctional membrane fraction and in the junctional lattices. EphB2 was again only weakly detectable in PSDs, whereas EphA4 was abundant in this compartment. Both receptors were abundant in the presynaptic active zone fraction. These results demonstrate that EphA4 and EphB2 can be both found presynaptically, associated with synaptic vesicles and the presynaptic active zone, whereas perhaps only EphA4 is present in the PSDs.



### **EphA4 and EphB2 have distinct distributions in dendrites versus axon terminals in the adult mouse hippocampus and frontal cortex**

To complement the cell fractionation results, we examined the ultrastructural localization of EphA4 and EphB2 in major regions of the forebrain, i.e., the hippocampus and cerebral cortex.

The subcellular distribution of EphA4 in the adult rat hippocampus, as detected by electron microscopy, was recently reported (Tremblay et al. 2007). We show here that EphA4 immunoperoxidase labeling has a similar distribution in the adult mouse hippocampus, with axon terminals, dendritic spines, astrocytic processes (not shown), and axon shafts (not shown) being the most frequently labeled elements (Fig. 4A). Furthermore, some dendritic shafts were occasionally labeled in the mouse hippocampus (Fig. 4A). We also examined the deep layers of the mouse and rat cerebral cortex, where the relative proportion of labeled profiles was similar (not shown). No immunoperoxidase staining was found in EphA4<sup>-/-</sup> mice.

EphB2 immunoperoxidase labeling was detected mainly associated with relatively large dendritic shafts and dendritic spines in the hippocampus and deep layers of the primary motor cortex, by electron microscopy, while relatively few nerve terminals were labeled (Fig. 4B-D). Dendritic shafts, spines and nerve terminals represented respectively 44, 49 and 3 % of the labeled neuronal profiles in area CA1; 56, 29 and 7 % in area CA3; and 70, 22 and 0 % in the deep layers of the primary motor cortex. Occasionally, some fine, usually perisynaptic astrocytic processes were labeled for EphB2, but less frequently than

for EphA4. Thus, EphB2 appears to have a mostly dendritic rather than axonal localization in the regions of hippocampus and cerebral cortex examined.

### **EphA4 and EphB2 are also distributed differently at the organelle level**

The immunoperoxidase reaction product can diffuse locally inside the labelled processes and therefore does not allow precise determination of subcellular localization. Hence, we used a pre-embedding immunogold protocol combined with silver intensification to examine the association of the EphA4 and EphB2 receptors with the plasma membrane, synaptic vesicles, presynaptic active zones and the PSDs. The silver-intensified immunogold particles (SIGPs) labeled the same neuronal processes that were also positive by immunoperoxidase labeling (Figs. 5,6). However, the number of SIGPs in small individual processes such as axons, dendritic spines, and axon terminals was small. We therefore performed a statistical analysis of the distribution of the SIGPs and comparable numbers of randomly distributed virtual particles (VPs; Pearson's chi-square analysis; see Materials and Methods and supplementary Fig. S3). The results are shown in Table 1.

As a control, we also analyzed the distribution of the SIGP labeling for EphA4 in the hippocampus of an EphA4<sup>-/-</sup> mouse. This analysis did not reveal significant differences between the distributions of SIGPs and VPs among the profiles of neuronal process or at the organelle level, in the knockout mouse. Background labeling thus appeared uniform and the various neuronal compartments were labeled according to their surface area in the ultrathin sections. The number of SIGPs in the CA3 region of hippocampus of the EphA4<sup>-/-</sup>

mouse were 27% of those found in the same region of the hippocampus of a EphA4+/+ littermate that was processed in parallel (Table 1). This feature therefore represents an estimate of the background labeling. Subtracting this background to obtain the specific labeling for EphA4 had only a small impact on the calculation of the relative EphA4 labeling in different subcellular structures and did not change the conclusions of the analyses (not shown). Therefore, we expressed the results and conducted the chi-square statistical analyses for both EphA4 and EphB2 without background subtraction (Fig. 6).

In all regions examined, and for both EphA4 and EphB2, there was a significant difference between the distributions of the SIGPs and VPs among the various types of neuronal profiles ( $p < 0.0005$ , except for EphA4 in CA3, where  $p < 0.02$ , 0.005 and 0.0001, respectively in the 3 animals; Table 1, last column; glial processes were excluded from this analysis). These differences between SIGPs and VPs were attributable to EphA4-associated SIGPs, which were more concentrated than the VPs in axon terminals, and to EphB2-associated SIGPs, which were strongly concentrated in dendritic shafts in all hippocampal and cortical areas examined. The distribution of SIGPs (Fig. 6) was consistent with the immunoperoxidase labeling for both EphA4 and EphB2, except for a somewhat lower number of EphB2 SIGPs in dendritic spines. There was no significant difference in the distributions of EphA4 or EphB2 SIGPs, respectively, between the 3 animals examined in CA3, confirming the reproducibility of these results.

Since the fractionation experiments indicated higher EphB2 levels in axon terminals of the forebrain/midbrain than detected in electron microscopy in terminals of the

hippocampus and parietal cortex, we also examined the distribution of EphB2 in the ventrobasal thalamus. In this region, EphB2-associated SIGPs were more frequently found in axon terminals and also in small dendritic shafts (Fig. 6).

These results demonstrate that EphA4 and EphB2 are localized in overlapping yet distinct patterns in the hippocampus and cerebral cortex. EphA4 is more frequently localized in axon terminals, while EphB2 predominates in dendrites. Moreover, the subcellular localization of EphB2 appears to vary regionally, since this receptor is frequently found in axon terminals in the thalamus but not in the hippocampus and cortex.

#### **EphB2 is more associated with the plasma membrane than EphA4**

The distribution of SIGPs was then analyzed at the organelle level (i.e. in the plasma membrane, synaptic vesicles, pre-synaptic active zone, and PSDs; Figs. 7,8). In this analysis, EphA4-associated SIGPs were found to be distributed rather uniformly and similarly to the VPs, with one exception (Table 1). In the CA1 region, they were more frequently associated with the plasma membrane and vesicles of the axon terminals ( $p < 0.003$ ). This pattern of distribution was not observed in the CA3 region.

EphB2-associated SIGPs were more heterogeneously distributed, at the sub-profile level, in the hippocampus and motor cortex. They were more concentrated on the plasma membrane of dendritic shafts than the VPs ( $p < 0.0001$ ). This was confirmed in 3 animals, in the CA3 region of the hippocampus ( $p < 0.0001$  in every case). The EphB2-associated SIGPs also appeared concentrated on the plasma membrane of axon terminals in CA1 ( $p < 0.0001$ ).

In the ventrobasal thalamus, EphB2-associated SIGPs were uniformly distributed at the plasma membrane and the core of nerve terminals and small dendrites. Thus, their distribution in the ventrobasal thalamus was more similar to that of EphA4-associated SIGPs in the hippocampus and cortex, with a major location in axon terminals and no clear preference for the plasma membrane versus the core of the profiles.

Chi-square analyses of the distributions of SIGPs associated with EphA4 and EphB2 showed that they were significantly different from each other in all brain regions where both receptors were examined (CA1, CA3, and deep layers of motor cortex - or CtxD;  $p < 0.0001$ ). This was also true in the 3 animals where the analysis was performed in CA3.

Overall, the biochemical and immunohistochemical observations are in agreement. Both EphA4 and EphB2 were detected in pre-synaptic elements (nerve terminals) as well as postsynaptic elements (dendritic shafts and spines). EphA4 was detected on vesicles and plasma membranes of synaptic terminals, in both the hippocampus and the cerebral cortex. EphB2 was also detected on vesicles in axon terminals, with higher frequency in the ventrobasal thalamus. In electron microscopy, both receptors were also detected in small astrocytic processes, as previously reported for EphA4 by Tremblay *et al.* (2007). Several Eph receptors, including EphA4 and EphB2, have also been detected by RT-PCR in freshly isolated astrocytes (Nestor *et al.* 2007). However, EphA4 labelling on PSDs, in electron microscopy, did not appear as abundant as expected from fractionation results, presumably because of a limited access to the epitopes in these dense structures.

## Discussion

The functions of the Eph receptors in the adult brain are beginning to be elucidated, and information on the precise localization of these receptors at the subcellular level is needed to fully interpret the functional data. To date, most reports have emphasized a postsynaptic localization and function for the Eph receptors. This is largely based on limited electron microscopy analyses in the adult brain (Buchert et al. 1999, Martone et al. 1997) and biochemical demonstrations of interactions between some Eph receptors and postsynaptic proteins (see below).

We have investigated the subcellular and sub-synaptic distributions of EphA4 and EphB2 by cell fractionation and electron microscopy. Cell fractionation showed many similarities, but also some major differences in the distribution of the two receptors in different subcellular compartments. Both receptors were abundant in the microsomal fraction; findings that will require further investigation to identify the precise organelles with which they are associated. They might be present in transport vesicles, as synaptophysin which was also detected in this fraction (Morin *et al.* 1991). Interestingly, EphB2 has been previously localized in the Golgi apparatus and associated with peri-Golgi vesicles (Hoogenraad *et al.* 2005). In the synaptosomal fractions, EphA4 and EphB2 were associated with membranes, synaptic vesicles and presynaptic active zones. Previous cell fractionation studies of adult rat brain also detected EphB2 in the synaptosomal fraction (Torres et al. 1998), and detected EphB2 and EphA4 in PSD as well as non PSD fractions (Grunwald et al. 2004). We found that the two receptors differ markedly in their association

with PSDs. Surprisingly, EphB2 was easily extracted from PSDs with Triton X-100, whereas a subpopulation of EphA4 remained tightly associated with PSDs, even following further treatment with Sarcosyl. Our finding of an association of both Eph receptors with the presynaptic active zone and synaptic vesicles in the adult brain raises new questions about their synaptic roles and may warrant reconsideration of previous functional models based on an exclusively postsynaptic localization.

Electron microscopic examination also showed that EphA4 and EphB2 have rather different locations in the hippocampus and cerebral cortex, with EphA4 being associated more with axon terminals, and EphB2 with dendritic shafts, while both appear similarly associated with dendritic spines. At the organelle level, the statistical analyses of the distributions of SIGPs versus VPs demonstrated that EphB2 is more concentrated at the plasma membrane of relatively large dendritic shafts in the hippocampus and cerebral cortex. The fractionation results indicate that EphA4 and EphB2 are also more concentrated in other types of organelles, such as synaptic vesicles. However, the limited resolution of the electron microscopy approach used, which combines pre-embedding immunogold labeling with statistical analysis of the distribution of the resulting SIGPs, did not allow conclusive demonstration of a more precise localization of the two receptors in the smaller processes.

### **EphA4 is more tightly associated with the PSDs than EphB2**

EphA4 was previously detected by confocal microscopy in dendritic spines of pyramidal neurons of area CA1 in the adult mouse hippocampus, where it appears to

regulate spine morphology and density through interactions with astroglial ephrinA3 (Murai et al. 2003). The present demonstration of its association with the extra-junctional plasma membrane of spines fits nicely with such interactions with astrocytic processes, whereas the EphA4 located in the PSDs most likely plays a distinct role at the synaptic junction. Therefore, the localization of EphA4 suggests that this receptor plays multiple roles in dendritic spines. To date, no direct interaction with other receptors or scaffolding proteins has been demonstrated for EphA4, but its cytoplasmic domain contains a sterile alpha motif (SAM) and a PDZ- (postsynaptic density-95, disc large, zonula occludens-) binding motif that could mediate an interaction with such proteins, as already demonstrated for EphA7 (Torres et al. 1998).

It was surprising to find that EphB2 is weakly associated with the PSDs. Moreover, the detection of EphB2 in the PSD fraction might even be due to contamination by presynaptic proteins, as indicated by the presence of SNAP-25 in this fraction. EphB2 has been implicated in functions thought to depend on its postsynaptic location in excitatory synapses (Buchert et al. 1999, Grunwald et al. 2001, Dalva *et al.* 2000, Henderson et al. 2001). The present fractionation and electron microscopic results suggest that the EphB2 localized in the extrajunctional plasma membranes of dendritic shafts or spines (or in astrocytes), rather than the PSDs, might be fulfilling these functions.

The expression of EphA4 overlaps with that of EphB receptors in the hippocampus (Liebl et al. 2003, Grunwald et al. 2001), and EphA4 has a high affinity for ephrinB2 and ephrinB3 (Gale et al. 1996). Therefore, EphA4 might also contribute to ephrinB-regulated



spine maturation in concert with EphB receptors (Henkemeyer et al. 2003). Considering that EphA4 is tightly associated with the PSDs, and that it does not seem to interact with the same proteins as EphB2 (Dalva et al. 2000, Ethell *et al.* 2001), its role may be complementary rather than redundant with that of EphB2.

### **EphA4 and EphB2 are also presynaptic**

The EphA4 and EphB2 receptors were both detected in the synaptic vesicles and the presynaptic active zone fraction. Since synaptophysin was also detected in the presynaptic active zone fraction, it is possible that some vesicle membrane remained in this fraction. Indeed, synaptophysin has recently been detected in the active zone by immunogold electron microscopy, following vesicle fusion with the plasma membrane during transmitter release (Tao-Cheng 2006). Therefore, these results demonstrate that both receptors are present in axon terminals. Their presence in these presynaptic fractions suggests that they follow vesicles to the active zone. Moreover, immunoperoxidase staining showed that EphA4 and EphB2 antibodies often, but not always, labeled only subsets of the vesicles in axon terminals (see also Tremblay et al. 2007). This suggests that they are then localized in special types of vesicles, perhaps transport, or recycled vesicles with internalized receptors. In such cases, it is possible that EphB2 localized in presynaptic terminals represents the internalized receptor that was trans-endocytosed on its ephrinB ligand side following activation in its postsynaptic localization (Zimmer *et al.* 2003). Nevertheless, in view of its possible absence from PSDs, suggested by its weak association with the PSD fractions, this possibility appears improbable.

EphB2 has been reported to use GRIP-1 as an adaptor for kinesin-dependent transport into dendrites, using the motor protein KIF5 (Hoogenraad et al. 2005). KIF5 is also involved in the transport of newly synthesized membrane proteins into axons (Munakata *et al.* 2003). In addition, synaptojanin-1, a nerve terminal protein involved in the recycling of synaptic vesicles, is a phosphorylation substrate for EphB2 (Harris *et al.* 2000, McPherson *et al.* 1996), which could thus influence clathrin-mediated endocytosis (Irie *et al.* 2005, Schuske *et al.* 2003). Synaptojanin-null drosophila mutants also display increased amounts of presynaptic active zone per unit of surface area, at the neuromuscular junction (Dickman *et al.* 2006). Eph receptors could thus participate in the presynaptic cycling of synaptic vesicles and regulation of the active zone.

Defining the roles and molecular associations of EphA4 and EphB2 on the presynaptic side of mature synapses will be important to fully understand their functions in the adult CNS.

### **Roles of EphA4 and EphB2 in LTP**

The mechanisms of LTP differ between the CA3 and CA1 regions of hippocampus, and EphA4 and EphB2 are thought to play distinct roles in these mechanisms (Contractor et al. 2002, Henderson et al. 2001, Grunwald et al. 2001, Grunwald et al. 2004). Electrophysiological data suggest that EphB2 is involved postsynaptically in mossy fiber-CA3 LTP (Contractor et al. 2002). Our observations indicate that this receptor is indeed localized preferentially in dendritic shafts and spines, but not strongly associated with the PSDs. Its role in LTP must therefore involve the “*extrajunctional*” pool of this receptor (or

the small pool present in astrocytes). On the other hand, EphA4 is present both in mossy fibers and in the spines of the CA3 pyramidal neurons (Tremblay et al. 2007). It would thus be well situated to play a dual role in mossy fiber-CA3 LTP. Currently, there is only functional evidence for a role of EphA4 in regulating LTP at the Shaffer collateral-CA1 synapses, where it could serve as a presynaptic ligand for postsynaptic ephrin-B2 and ephrin-B3 localized in dendritic spines of CA1 pyramidal neurons (Grunwald et al. 2004, Rodenas-Ruano *et al.* 2006, Liebl et al. 2003). The data presented here and our previous results (Tremblay et al. 2007), which localized EphA4 in the Schaffer collateral terminals, are consistent with a presynaptic role of EphA4 in synapses of area CA1 of the hippocampus. However, further work is necessary to clarify the respective roles of pre- and postsynaptic (or glial) EphA4 and EphB2 in LTP mechanisms in the CA3 versus CA1 sectors of hippocampus.

## **Conclusions**

The present results show that EphA4 and EphB2 are both localized in several pre- and postsynaptic compartments of synapses in the adult forebrain/midbrain: synaptic vesicles, presynaptic active zones, PSDS, and extrajunctional membranes. However, their relative distributions among these compartments differ in cortical structures (hippocampus and cerebral cortex), where EphA4 is more abundant in axon terminals and EphB2 in dendritic shafts (and particularly in the plasma membrane of the latter). At the synaptic level, the major difference between the two receptors concerns the PSDs, where EphA4 appears tightly linked to the junctional lattice, whereas EphB2 was easily extracted with

detergents. It will be interesting to associate each of these locations with specific functions, such as regulation of dendritic spine maturation or of different types of LTP.

## Acknowledgements

The authors thank Dr. Tim Kennedy for his comments on this manuscript. We also gratefully acknowledge the contribution of Mr. Morgan Silldorf in testing the specificity of the anti-EphB2 antibody in transfected cell lines. This study was supported by an infrastructure grant from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FRSQ) and by a grant to G.D. and E.A.F. from the National Science and Engineering Council of Canada (NSERC). D.B. was supported by a studentship from the *Groupe de recherche sur le système nerveux central* (GRSNC). M.È.T. was supported by a studentship from the FRSQ and the *Faculté des études supérieures* of the *Université de Montréal*. E.A.F. was supported by a Clinician-Scientist Award from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and a *Chercheur-boursier* Award from the FRSQ.

- Armstrong, J. N., Saganich, M. J., Xu, N. J., Henkemeyer, M., Heinemann, S. F. and Contractor, A. (2006) B-ephrin reverse signaling is required for NMDA-independent long-term potentiation of mossy fibers in the hippocampus. *J Neurosci*, **26**, 3474-3481.
- Buchert, M., Schneider, S., Meskenaite, V., Adams, M. T., Canaani, E., Baechi, T., Moelling, K. and 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.
- Cho, K. O., Hunt, C. A. and Kennedy, M. B. (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, **9**, 929-942.
- Contractor, A., Rogers, C., Maron, C., Henkemeyer, M., Swanson, G. T. and Heinemann, S. F. (2002) Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science*, **296**, 1864-1869.
- Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W. and Greenberg, M. E. (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell*, **103**, 945-956.
- Descarries, L., Watkins, K. C., Garcia, S. and Beaudet, A. (1982) The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol*, **207**, 239-254.

- Dickman, D. K., Lu, Z., Meinertzhagen, I. A. and Schwarz, T. L. (2006) Altered synaptic development and active zone spacing in endocytosis mutants. *Curr Biol*, **16**, 591-598.
- Dottori, M., Hartley, L., Galea, M. et al. (1998) EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 13248-13253.
- Ethell, I. M., Irie, F., Kalo, M. S., Couchman, J. R., Pasquale, E. B. and Yamaguchi, Y. (2001) EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, **31**, 1001-1013.
- Gale, N. W., Holland, S. J., Valenzuela, D. M. et al. (1996) Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron*, **17**, 9-19.
- Goldshmit, Y., McLenachan, S. and Turnley, A. (2006) Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS. *Brain Res Brain Res Rev*.
- Grunwald, I. C., Korte, M., Adelmann, G., Plueck, A., Kullander, K., Adams, R. H., Frotscher, M., Bonhoeffer, T. and 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. and Klein, R. (2001) Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **32**, 1027-1040.
- Harris, T. W., Hartweg, E., Horvitz, H. R. and Jorgensen, E. M. (2000) Mutations in synaptojanin disrupt synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol*, **150**, 589-600.

- Henderson, J. T., Georgiou, J., Jia, Z., Robertson, J., Elowe, S., Roder, J. C. and Pawson, T. (2001) The Receptor Tyrosine Kinase EphB2 Regulates NMDA-Dependent Synaptic Function. *Neuron*, **32**, 1041-1056.
- Henkemeyer, M., Itkis, O. S., Ngo, M., Hickmott, P. W. and Ethell, I. M. (2003) Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol*, **163**, 1313-1326.
- Himanen, J. P., Chumley, M. J., Lackmann, M. et al. (2004) Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci*, **7**, 501-509.
- Himanen, J. P. and Nikolov, D. B. (2003) Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 130-134.
- Holash, J. A. and Pasquale, E. B. (1995) Polarized expression of the receptor protein tyrosine kinase Cck5 in the developing avian visual system. *Dev Biol*, **172**, 683-693.
- Hoogenraad, C. C., Milstein, A. D., Ethell, I. M., Henkemeyer, M. and Sheng, M. (2005) GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat Neurosci*, **8**, 906-915.
- Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P. and De Camilli, P. (1983) Synapsin I (protein D), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol*, **96**, 1374-1388.
- Irie, F., Okuno, M., Pasquale, E. B. and Yamaguchi, Y. (2005) EphrinB-EphB signalling regulates clathrin-mediated endocytosis through tyrosine phosphorylation of synaptojanin 1. *Nat Cell Biol*, **7**, 501-509.



- 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.
- Liebl, D. J., Morris, C. J., Henkemeyer, M. and 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.
- Martinez, A. and Soriano, E. (2005) Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev*, **49**, 211-226.
- Martone, M. E., Holash, J. A., Bayardo, A., Pasquale, E. B. and Ellisman, M. H. (1997) Immunolocalization of the receptor tyrosine kinase EphA4 in the adult rat central nervous system. *Brain Res*, **771**, 238-250.
- McPherson, P. S., Garcia, E. P., Slepnev, V. I. et al. (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, **379**, 353-357.
- Moreno-Flores, M. T. and Wandosell, F. (1999) Up-regulation of Eph tyrosine kinase receptors after excitotoxic injury in adult hippocampus. *Neuroscience*, **91**, 193-201.
- Morin, P. J., Liu, N. G., Johnson, R. J., Leeman, S. E. and Fine, R. E. (1991) Isolation and characterization of rapid transport vesicle subtypes from rabbit optic nerve. *J. Neurochem.*, **56**, 415-427.

- Munakata, H., Nakamura, Y., Matsumoto-Miyai, K., Itoh, K., Yamasaki, H. and Shiosaka, S. (2003) Distribution and densitometry mapping of L1-CAM Immunoreactivity in the adult mouse brain - light microscopic observation. *BMC Neuroscience*, **4**, 7.
- Murai, K. K., Nguyen, L. N., Irie, F., Yamaguchi, Y. and Pasquale, E. B. (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci*, **6**, 153-160.
- Nestor, M. W., Mok, L. P., Tulapurkar, M. E. and Thompson, S. M. (2007) Plasticity of neuron-glia interactions mediated by astrocytic EphARs. *J. Neurosci.*, **27**, 12817-12828.
- Peters, A., Palay, S. L. and Webster, H. d. (1991) *The Fine Structure of the Nervous System*. Oxford University Press, New York.
- Phillips, G. R., Huang, J. K., Wang, Y. et al. (2001) The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. *Neuron*, **32**, 63-77.
- Pinheiro, P. S., Rodrigues, R. J., Rebola, N., Xapelli, S., Oliveira, C. R. and Malva, J. O. (2005) Presynaptic kainate receptors are localized close to release sites in rat hippocampal synapses. *Neurochem Int*, **47**, 309-316.
- Rebola, N., Canas, P. M., Oliveira, C. R. and Cunha, R. A. (2005) Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience*, **132**, 893-903.
- Rebola, N., Pinheiro, P. C., Oliveira, C. R., Malva, J. O. and Cunha, R. A. (2003) Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res*, **987**, 49-58.

- Riad, M., Watkins, K. C., Doucet, E., Hamon, M. and Descarries, L. (2001) Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci*, **21**, 8378-8386.
- Rodenas-Ruano, A., Perez-Pinzon, M. A., Green, E. J., Henkemeyer, M. and Liebl, D. J. (2006) Distinct roles for ephrinB3 in the formation and function of hippocampal synapses. *Dev Biol*, **292**, 34-45.
- Schuske, K. R., Richmond, J. E., Matthies, D. S., Davis, W. S., Runz, S., Rube, D. A., van der Blik, A. M. and Jorgensen, E. M. (2003) Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron*, **40**, 749-762.
- Soans, C., Holash, J. A. and Pasquale, E. B. (1994) Characterization of the expression of the Cck8 receptor-type tyrosine kinase during development and in tumor cell lines. *Oncogene*, **9**, 3353-3361.
- Tao-Cheng, J. H. (2006) Activity-related redistribution of presynaptic proteins at the active zone. *Neuroscience*, **141**, 1217-1224.
- Torres, R., Firestein, B. L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E. N., Huganir, R. L., Brecht, D. S., Gale, N. W. and Yancopoulos, G. D. (1998) PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron*, **21**, 1453-1463.
- Tremblay, M.-È., Riad, M., Murai, K. K., Bouvier, D., Pasquale, E. B., Descarries, L. and Doucet, G. (2007) Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, **501**, 691-702.

- Yamaguchi, Y. and Pasquale, E. B. (2004) Eph receptors in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*, **14**, 288-296.
- Zhou, L., Martinez, S. J., Haber, M. et al. (2007) EphA4 signaling regulates phospholipase C-gamma-1 activation, cofilin membrane association, and dendritic spine morphology. *The Journal of Neuroscience*, **27**, 5127-5138.
- Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J. and Klein, R. (2003) EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat. Cell Biol.*, **5**, 869-878.

Table 1. Neuropil distribution of the silver-intensified immunogold particles for EphA4 and EphB2.

Silver intensified immunogold particles (SIGPs) were scored in axons, axon terminals, dendritic spines, and dendritic shafts (those in neuronal perikarya, astrocytic processes and unidentifiable profiles were pooled as “Others”, after the statistical analyses). A similar number of virtual particles (VPs) of the same size was then overlaid onto the same micrographs and scored in the same manner (see Fig. S3, in supplementary material). The distributions among neuronal processes were then compared, using the Pearson’s chi-square test (last column). In a second step, chi-square test analyses compared the distribution of SIGPs and VPs among the organelles (plasma membrane, vesicles, PSDs, active zones, etc) of each type of process. The results of the latter comparisons are indicated by an asterisk and bold type (\*, when  $p < 0.003$ ). Since the number of VPs is proportional to the area of the various elements in the pictures, a significantly higher proportion of SIGPs than VPs scored over a given type of structure signifies that this structure is more strongly labelled than others. An absence of specific labelling can be concluded when the number of SIGPs is inferior to the background, i.e., less than 27% of the VPs counted in the same type of process or organelle. <sup>a</sup> In area CA3, the analysis was done in 3 animals, and means  $\pm$  SEM are reported, to verify the reproducibility of the analyses. No significant difference was found in the distribution of SIGPs between the 3 animals. <sup>b</sup> For EphA4 in CA3, the resulting “p” differed among animals. It was smaller than 0.02 (considered as a tendency), 0.005 and 0.0001 (significant), respectively in each

animal. It was thus considered as significant overall. AZ, presynaptic active zone; CtxD, deep layers of primary motor cortex; KO, EphA4<sup>-/-</sup> mouse; mb, plasma membrane; PSD, postsynaptic density; TOT, total; Vs, vesicles.

### A) EphA4 immunolabeling

Region	Labeling	axons			AZ	axon terminals			dendritic spines			dendrites		Other	TOT	$\chi^2$
		mb	core	myelin		Vs	mb	other	PSD	mb	other	mb	other			
CA1	SIGP	16	2	0	3	60*	48*	38*	8	24	44	32	69	66	410	p<0.0002
CA1	VP	19	17	1	2	40	22	55	6	16	38	15	76	92	400	
CA3 <sup>a</sup>	SIGP	32 ± 8	20 ± 6	0	3 ± 1	48 ± 3	25 ± 1	33 ± 2	2 ± 1	9 ± 1	24 ± 3	23 ± 1	67 ± 10	41 ± 2	326 ± 20	p<0.02 <sup>b</sup>
CA3 <sup>a</sup>	VP	26 ± 5	29 ± 9	5 ± 2	1 ± 1	31 ± 2	15 ± 2	29 ± 3	2 ± 1	9 ± 2	15 ± 2	13 ± 1	76 ± 12	72 ± 3	323 ± 23	
CA3 KO	SIGP	0	3	2	0	10	2	5	2	1	5	8	34	15	87	NS
CA3 KO	VP	7	7	2	0	11	4	5	1	2	6	7	20	15	87	
CtxD	SIGP	10	12	2	2	35	15	17	7	14	25	17	32	32	220	p<0.0001
CtxD	VP	3	19	8	0	27	13	15	3	3	9	18	38	44	200	

### B) EphB2 immunolabeling

Region	Labeling	axons			AZ	axon terminals			dendritic spines			dendrites		Other	TOT	$\chi^2$
		mb	core	myelin		Vs	mb	other	PSD	mb	other	mb	other			
CA1	SIGP	4	3	1	1	11*	34*	20*	13	26	28	135*	121*	87	484	p<0.0001
CA1	VP	9	1	2	2	25	14	40	7	6	12	81	212	89	500	
CA3 <sup>a</sup>	SIGP	9 ± 2	4 ± 3	0	2 ± 1	26 ± 3	22 ± 6	23 ± 3	6 ± 2	20 ± 2	27 ± 4	167 ± 13*	140 ± 10	65 ± 4	510 ± 20	p<0.0001
CA3 <sup>a</sup>	VP	21 ± 3	17 ± 4	5 ± 2	1 ± 1	27 ± 1	25 ± 5	56 ± 4	4 ± 1	12 ± 2	21 ± 3	42 ± 3	140 ± 10	95 ± 7	467 ± 20	
CtxD	SIGP	8	6	2	0	7	19	8	3	3	2	109*	39	31	237	p<0.0001
CtxD	VP	10	16	12	2	21	19	15	1	6	7	12	32	46	200	
Thal	SIGP	22*	16*	1*	4	35	27	40				37	77	42	301	p<0.0001
Thal	VP	11	23	28	0	19	15	28				22	65	89	300	

Figure 1: Representative examples of Western blots following cell fractionation of the adult mouse forebrain/midbrain.

In this and the next 2 figures, the reported fractionation experiments were repeated entirely at least 3 times. The same amount of proteins (10  $\mu$ g) was loaded in every lane. EphA4 and EphB2 show similar distributions in microsome and synaptosome fractions. Both are detected in non-synaptic (microsomes) and in synaptic membrane (LP1) and vesicle (LP2) fractions in the adult mouse brain. GluR2/3 and NR1 are subunits of NMDA and AMPA glutamate receptors; EEA1 and GM130 are, respectively, the “early endosome antigen-1” and the “golgi membrane-130” markers.



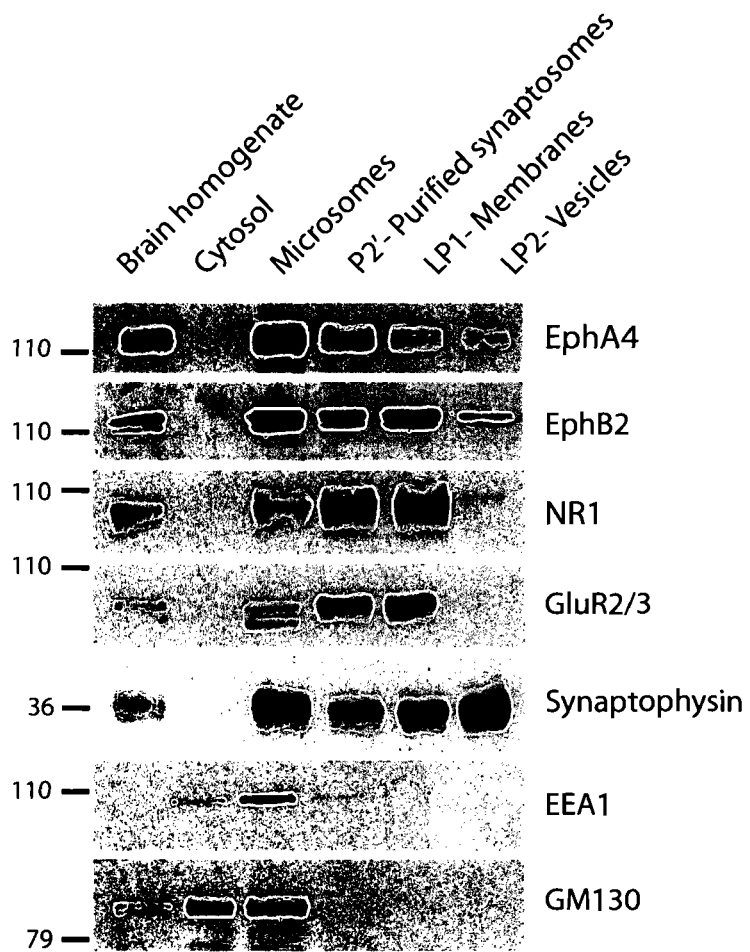


Figure 2: Extraction of postsynaptic densities (PSDs) from purified synaptosomes.

EphA4 is strongly associated with PSD-I and PSD-II, after TritonX-100 extraction, and partly resists extraction with Sarcosyl (PSD-III), as do the NR1 and GluR2/3 subunits of glutamate receptors, known as PSD-associated proteins. In contrast, EphB2 was easily extracted with Triton X- 100 and detected at very low levels only in PSD-I and PSD-II. PSD-95 is a core protein of PSDs, and synaptophysin is a marker for synaptic vesicles. Although not apparent in this figure, PSD-95 and NR1 were detectable in the P2' fraction, as in Fig. 1, but only with longer exposure of the autoradiographic film. Since the film rapidly reached saturation for these proteins in the PSD fractions, where they are highly concentrated, we had to shorten the exposure so as to be able to detect the differences in density between the three PSD fractions.

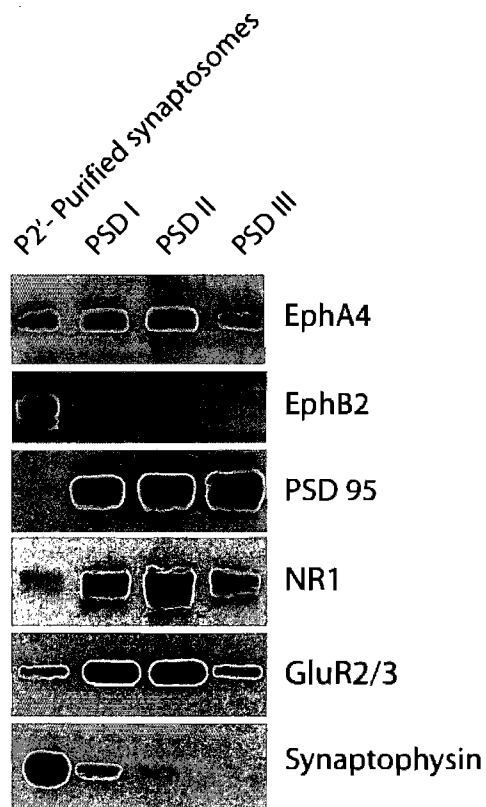


Figure 3: Separation of pre- and post-synaptic densities from purified synaptosomes shows that EphA4, but maybe not EphB2, is associated with both sides of synapses.

EphA4 and EphB2 are found in the presynaptic active zones and *extra-junctional* membrane fractions (pre- and postsynaptic plasma and vesicle membranes), but only EphA4 is abundant in PSDs. SNAP-25 is a marker for presynaptic active zones. It was still detected in the PSD fraction, indicating that some presynaptic proteins remained in this fraction. GluR2/3 was detected rapidly in the PSD fraction, before it became apparent in the purified synaptosomal fraction. With longer exposure (not shown), it was also detected in the latter fraction, as in Figs. 1 and 2, where the same amount of proteins were loaded (10  $\mu\text{g}$  per lane).

P2'- Purified synaptosomes  
Presynaptic active zones  
Postsynaptic densities  
Extra-junctional

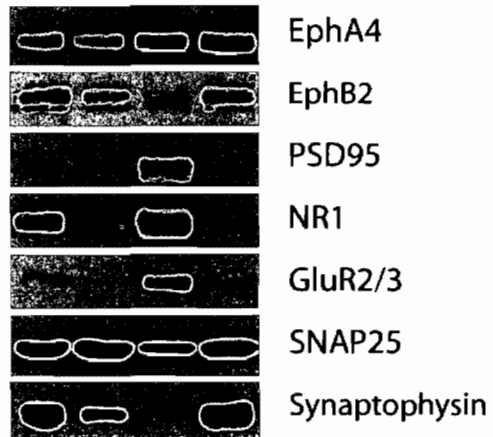


Figure 4 : A) EphA4 is preferentially expressed in axon terminals and dendritic spines in area CA3 of the hippocampus.

EphA4 immunoperoxidase in electron microscopy shows labelled axon terminals (t+) and dendritic spines (s+). In addition, a dendritic shaft (d+) and an axon terminal display spots of labelling (arrows) while the rest of these profiles appear unlabelled. B) EphB2 immunoperoxidase labeling in area CA3 of the hippocampus is found primarily in dendritic shafts (d+), but dendritic spines (s+) and rare axon terminals (t+) are also labelled. t-, unlabeled terminals. C and D show examples of such labelled dendritic spines (s+). Scale bars: 0.5  $\mu\text{m}$ .

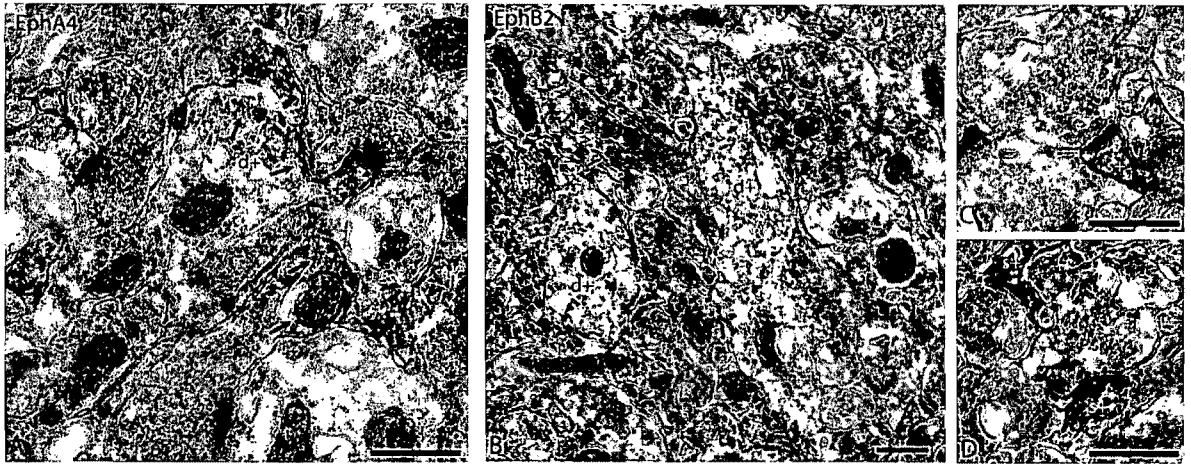


Figure 5: Pre-embedding immunogold labeling of the hippocampus showing the distributions of EphA4 and EphB2.

A) In area CA1, EphA4-associated silver-enhanced immunogold particles (SIGPs, arrows) are frequent in axon terminals. B) In area CA3, EphB2-associated SIGPs predominate in dendritic shafts. Arrows show examples of SIGPs on the plasma membrane of dendritic shafts. Scale bars: 0.5  $\mu\text{m}$ .



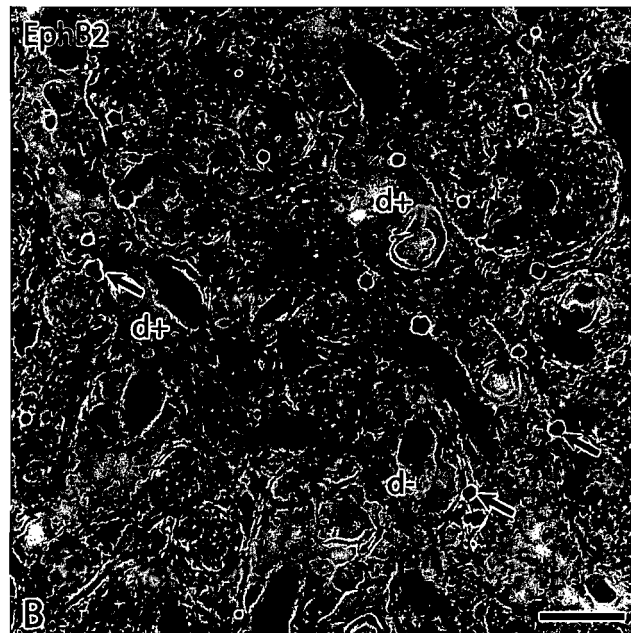
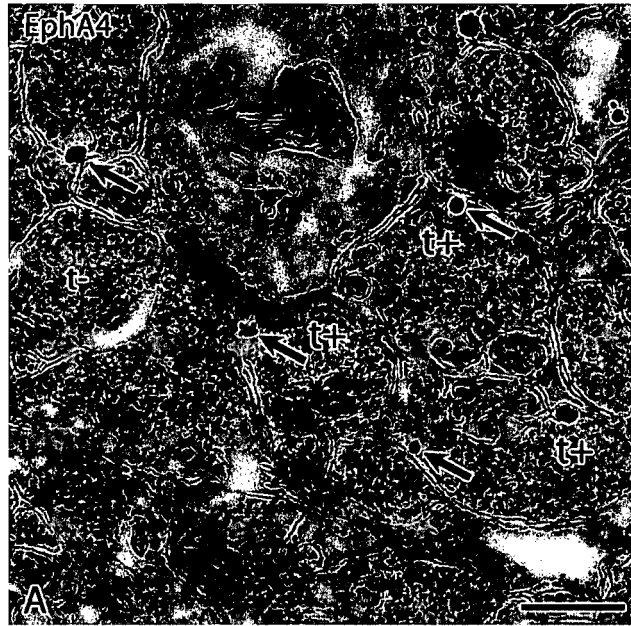


Figure 6 : Distribution of A) EphA4-associated SIGPs in areas CA1 and CA3 of the hippocampus and deep layers of the primary motor cortex (CtxD), and B) EphB2-associated SIGPs in the same regions and in the ventrobasal thalamus (Thal).

The small numbers of SIGPs scored in perikarya, glia, or unidentified profiles are not represented. Pearson's chi-square analyses showed that the distributions of both EphA4 and EphB2 SIGPs differed significantly from those of random VPs and that the distributions of EphA4 SIGPs differed from those of EphB2 in every analyzed hippocampal and cortical region. This was also true in the 3 animals analysed in the CA3 region (see text and Table 1).

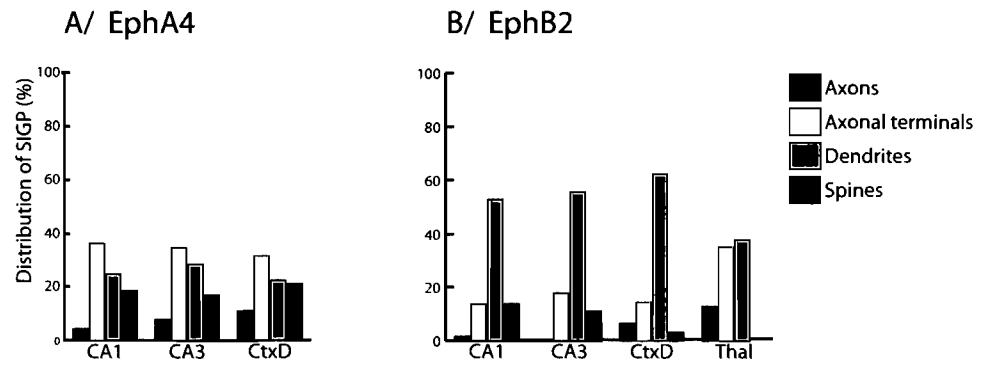


Figure 7 : Localisation of SIGPs at the organelle level.

A-C: EphA4 SIGPs touching A) the plasma membrane of axon terminals in area CA3 of the hippocampus (arrows), B) the core of a dendritic spine in CA1 (arrow, spine apparatus), C) the PSD of a dendritic spine in the parietal cortex. D-F: EphB2 SIGPs touching D) synaptic vesicles of axon terminals in the ventrobasal thalamus (arrows), E) the presynaptic active zone of a nerve terminal in the ventrobasal thalamus (arrow), or F) the plasma membrane of a dendritic spine in CA1 (arrow). Scale bars: 0.25  $\mu\text{m}$ .

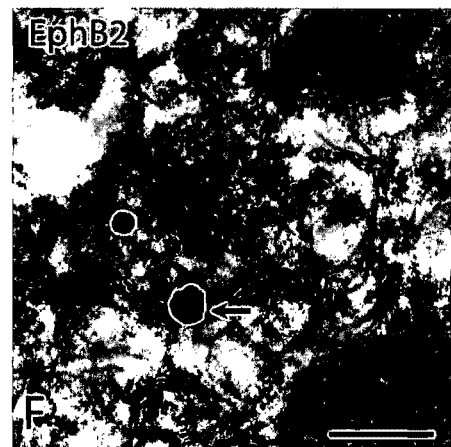
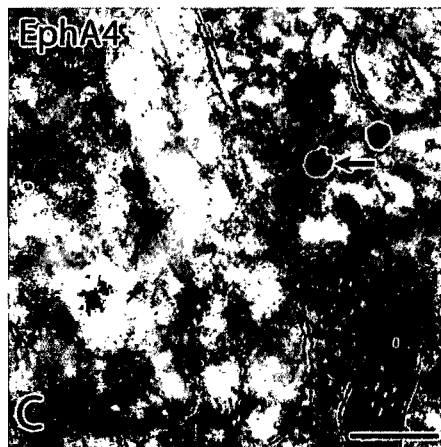
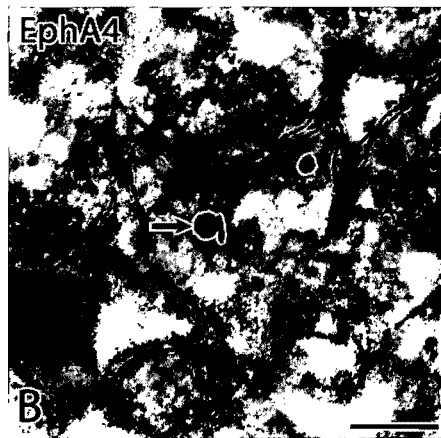
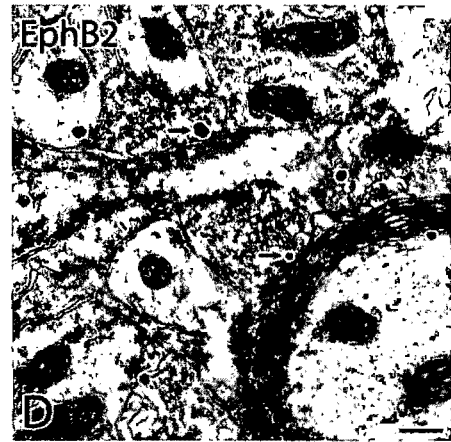
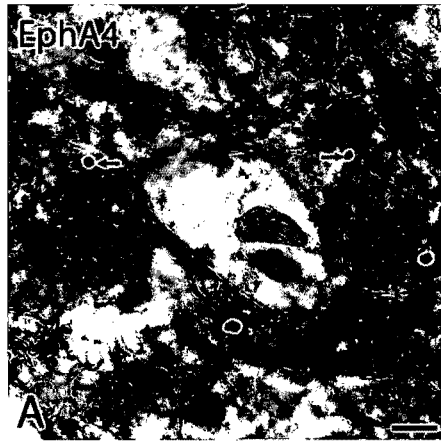
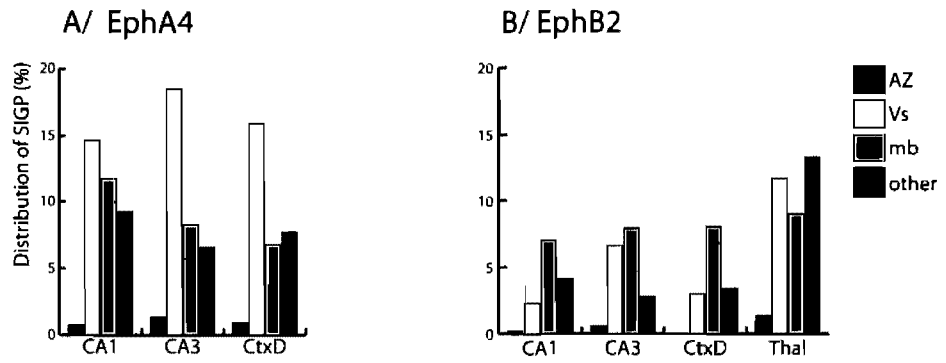


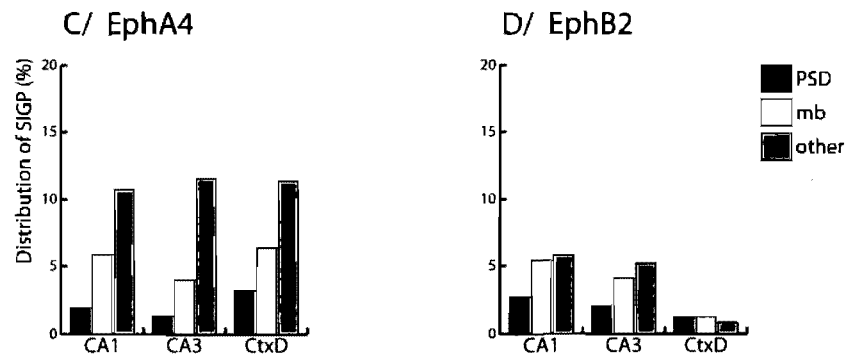
Figure 8 : Distribution of SIGPs in axon terminals (A,B) or dendritic spines (C,D), for EphA4 (A,C) and EphB2 (B,D).

AZ, presynaptic active zones; mb, plasma membrane; PSDS, postsynaptic densities ; Vs, synaptic vesicles; “other” indicate SIGPs present in the core of the profiles, but not clearly attributable to specific organelles.

### Axon terminals



### Dendritic spines



## **Supplementary Material**

Figure S1: Western blots from lysates of HEK293 human embryonal epithelial cells transfected with EphB2 or EphB4 and probed with anti-EphB2 or anti-EphB4 antibodies demonstrate the specificity of the anti-EphB2 antibody used in the present study.



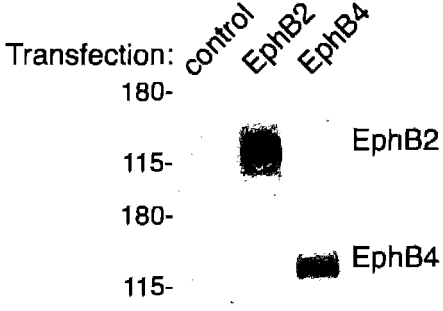


Figure S 2: EphB2 immunoperoxidase staining of the hippocampus and dentate gyrus (DG) in light microscopy.

l-m, stratum lacunosum moleculare; l/r, strata lucidum radiatum; o, stratum oriens; p, stratum pyramidale; po, polymorph layer; r, stratum radiatum. Scale bar: 500  $\mu$ m.

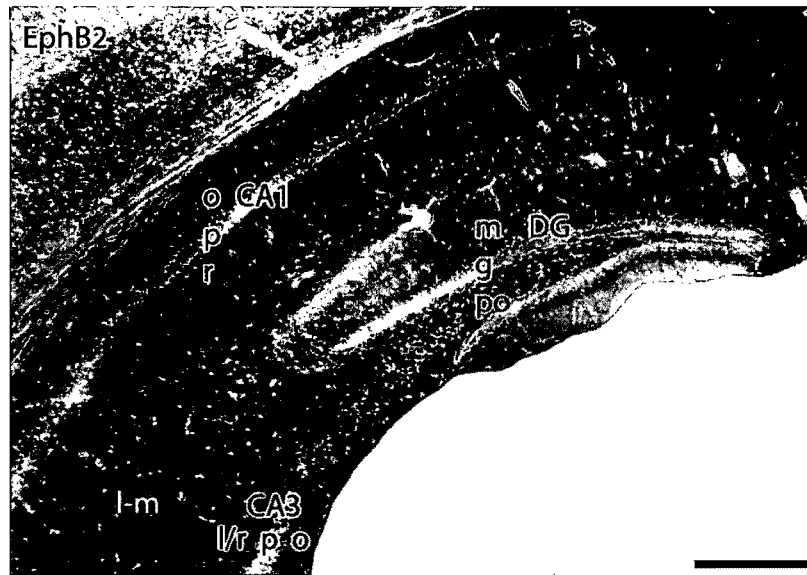
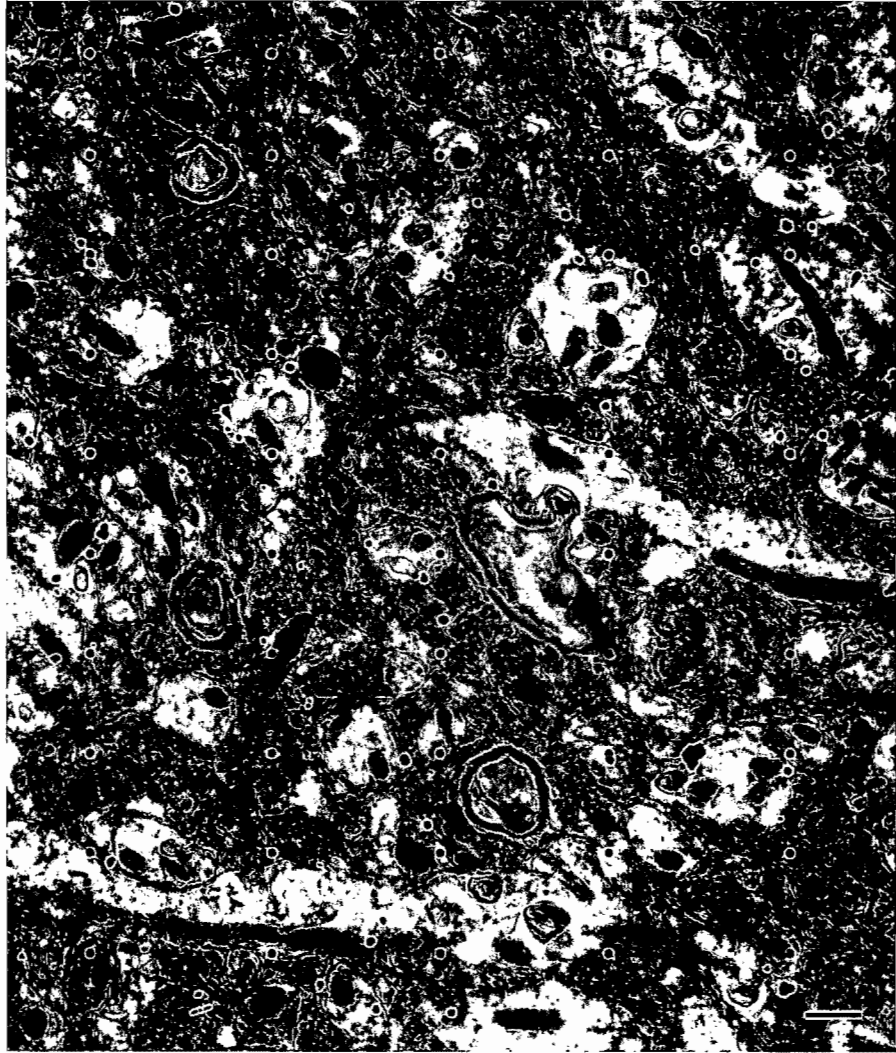


Figure S 3. Distribution of EphB2-associated SIGPs (black particles) compared to a similar number of virtual particles, or VPs (red) of a comparable size, overlaid on the same electron micrograph.

The VP were drawn in Photoshop, as a regular grid of dots, and were thus distributed at random relative to the profiles in the pictures. Scale bar: 0.5  $\mu\text{m}$ . This method is based on a stereological approach used by Descarries et al. (1982). Other basic stereological references discussing this approach are cited in this paper.

Indeed, stereological studies had previously been performed to assess the distribution of autoradiographic silver grains in electron micrographs; a situation very similar to the one in this manuscript. A recognized approach to assess the area covered by a given type of profile in electron microscopy (or its chance of being hit by random particles), is to use virtual grains randomly distributed in relation to the structure of the tissue. In the cerebral cortex or hippocampus, EM pictures from the neuropil of brain tissue contain profiles of various types and sizes (dendrites, axons, terminals, spines, glial processes, mitochondria, cell membrane and so forth) that are irregularly distributed. Using an overlay of a regular array of grains of similar size and numbers constitutes an easy means to produce a random distribution of grains relative to these EM pictures, since the tissue itself does not follow such a regular organization.



## **Chapitre III**

# **EphA4 is associated with synaptic and clathrin-coated vesicles in synapses of adult mouse brain**

**Article en préparation**

Ma contribution à cette étude a été la réalisation des expériences de fractionnement, d'immunoisolation, d'immunocytochimie et de stimulation de neurones en culture, la rédaction de la première version du manuscrit et de la majorité des figures, et la collaboration aux versions subséquentes.

## **EphA4 is associated with synaptic and clathrin-coated vesicles in synapses of adult mouse brain**

**David Bouvier<sup>1</sup>, Marie-Ève Tremblay<sup>1</sup>, Mustapha Riad<sup>1</sup>, Amadou T. Corera<sup>2</sup>, Keith K. Murai<sup>3</sup>, Timothy Kennedy<sup>2</sup>, Peter McPherson<sup>2</sup>, Edward A. Fon<sup>2</sup>, Guy Doucet<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Département de pathologie et biologie cellulaire, Groupe de recherche sur le système nerveux central, Université de Montréal, Montréal, QC

<sup>2</sup> Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, and Montreal Neurological Institute, Montréal, QC

<sup>3</sup> Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, and Centre for Research in Neuroscience, Montreal General Hospital, Montréal, QC

*\*Corresponding author, Guy Doucet, Département de pathologie et biologie cellulaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7. E-mail: [REDACTED], Telephone: 514-343-6255, Fax: 514-343-5755.*

**Running title:** EphA4 in synaptic and clathrin-coated vesicles

**Key Words:** EphA4, synaptic vesicles, clathrin-coated vesicles, trafficking, immunoisolation, electronic microscopy, hippocampus.

## **Abstract**

We recently showed that EphA4 is frequently associated with axonal terminals, where it is distributed in different functional compartments, such as subpopulations of vesicles and active zones. The present study aimed at determining the association of EphA4 with the various types of transport, synaptic and clathrin-coated vesicles, using cell fractionation, immunoisolation of vesicles in the forebrain-midbrain and immunocytochemistry in electron microscopy in region CA1 of the hippocampus. EphA4 was detected in vesicles isolated with antibodies anti-synaptophysin, anti-VGLUT1 and anti-VGAT; demonstrating its presence in synaptic vesicles. However, it was not detected in Piccolo-Bassoon transport vesicles, immunisolated with an anti-piccolo antibody. EphA4 was also found in a fraction enriched in clathrin-coated vesicles, suggesting it is recycling together with synaptic vesicles. In CA1 of hippocampus, EphA4 was localized on VGLUT1-positive, but not on VGAT positive terminals. Nevertheless, it was colocalized with both VGLUT1 and VGAT vesicular markers in hippocampal neurons in culture. When such cultures were stimulated with KCl, there was an increase in cell surface EphA4 expression, as detected by immunocytochemistry with an antibody directed against its extracellular domain, in the absence of detergent. These observations constitute strong evidence that EphA4 is present in synaptic vesicles, a novel observation for a tyrosine kinase receptor raising new questions about its functional role in this compartment.



## **Introduction**

Eph receptors, the largest family of tyrosine kinase receptors, count 14 members in mammals, divided in two subclasses EphA (A1-8, and A10) and EphB (B1-4, and B6) (Himanen and Nikolov, 2003). Their functions have been mostly studied in the development of the central nervous system (CNS), where they participate in various processes as such cell migration, segmentation patterning, and axonal growth cone guidance (Klein, 2004; Pasquale, 2005).

Most Eph receptors are still expressed in the mature CNS (Goldshmit et al., 2006), where they have been implicated in synaptogenesis and synaptic plasticity (Murai and Pasquale, 2004; Yamaguchi and Pasquale, 2004). Eph receptors have been generally viewed as postsynaptic receptors of the mature synapse (Buchert et al., 1999; Martone et al., 1997; Murai et al., 2003; Torres et al., 1998), implicated in the modulation of the morphology of dendritic spines (Ethell et al., 2001; Henkemeyer et al., 2003; Murai and Pasquale, 2004; Penzes et al., 2003).

Defects have also been described in synaptic plasticity, such as in LTP or LTD, in EphA4 or EphB2 null mice, but their precise roles in these processes are still not well understood (Armstrong et al., 2006; Contractor et al., 2002; Grunwald et al., 2004; Henkemeyer et al., 2003; Murai et al., 2003). Again, the role of these Eph receptors in synapse activity and plasticity has generally been interpreted with the view of a postsynaptic localization of the receptor, although EphA4 was suggested to act as a

presynaptic partner for postsynaptic ephrin-B2 and -B3 in the modulation of CA3-CA1 LTP (Grunwald et al., 2004).

We recently demonstrated that EphA4 and EphB2 are localized in axon terminals in the mature CNS (Bouvier et al., 2008; Tremblay et al., 2007). The two molecules were found to have different subcellular distributions in the hippocampus and cerebral cortex, where EphA4 was mainly detected in axon terminals, while EphB2 was found predominantly in dendritic shafts and rarely in axon terminals. However, EphB2 was also frequently detected in axon terminals in the ventrobasal thalamus. Both receptors were localized in various compartments of the presynaptic terminals, by cell fractionation and electron microscopy, such as the plasma membrane, the presynaptic active zone and subpopulations of vesicles. The association of these Eph receptors with vesicles and presynaptic active zones suggests a role in the activity of the mature synapse and needs to be fully characterized.

The presence of Eph receptors in vesicles of axonal terminals could reflect multiple sorting steps in their cellular trafficking, but could also represent a specific function in the vesicle cycle. To address these questions, we examined the association of EphA4 with presynaptic vesicles, including piccolo-bassoon transport (PTVs), synaptic, and clathrin-coated vesicles (CCVs), as a first step to understand how EphA4 could reach the presynaptic active zone and be retrieved.

Analysis of vesicle-enriched fractions on a linear sucrose gradient showed that the receptor is associated with various types of vesicles. Since the receptor might transit

through various types of vesicles to reach the presynaptic active zone, such as synaptic vesicles, or Piccolo-Bassoon transport vesicles (Dresbach et al., 2006; Shapira et al., 2003; Tao-Cheng, 2007), we have proceeded to the immunoisolation of synaptic vesicles and PTVs, using anti-synaptophysin and anti-piccolo antibodies, respectively. EphA4 was associated with synaptic vesicles but not with PTVs. We further characterized the association of EphA4 with subpopulations of glutamatergic and gabaergic synaptic vesicles, respectively using anti-VGLUT1 and anti-VGAT antibodies.

Electronic microscope observations with double immunolabeling for EphA4 with VGLUT1 or VGAT in the CA1 sector of the hippocampus revealed that EphA4 was frequently associated with glutamatergic but not with gabaergic axon terminals. However, double immunocytochemistry, on cultured hippocampal neurons showed frequent colocalizations of EphA4 with VGLUT 1 and VGAT in the neurites, at 15 days in vitro (DIV15). Since EphA4 might reach the presynaptic active zone through synaptic vesicles, we detected the presence of the receptor on CCVs, through which it might be endocytosed with synaptic vesicles components (Bonanomi et al., 2006). Finally, we found an increase in the cell surface expression of EphA4 following intense electrical activity in hippocampal cultures.

These observations unveil new possibilities of trafficking and role of Eph receptors in association with synaptic vesicles and CCVs at excitatory and inhibitory synapses and lead to new questions on their actions on axon terminals in the mature synapse.

## Results

### EphA4 in multiple subpopulations of vesicles

We recently reported that EphA4 is present in 25 to 40% of the axon terminals in adult murine hippocampus (Tremblay et al., 2007). We also reported that it is distributed in plasma membrane, presynaptic active zone and in vesicles of axon terminals (Bouvier et al., 2008). The EphA4 immunolabeling sometimes decorated all the vesicles of a terminal profile, but sometimes also it was restricted to only a small group of vesicles, usually near the plasma membrane (Fig. 1). These observations suggest that EphA4 is present in different types of vesicles in the axon terminals.

To further characterize the types of EphA4 positive vesicles, we used a cell fraction enriched in vesicles, LP2, from adult mouse forebrain/midbrain, on a linear sucrose density gradient (10-35% sucrose, Fig. 2). The low density organelles, present in fractions 1 to 3, were nearly devoid of synaptic vesicle markers, except for traces of VMAT2 in fraction 2, but contained Rab7, a late endosome marker, starting in fraction 2. The subpopulation of vesicles in fractions 4 to 9 was enriched in the synaptic vesicle markers synaptophysin, VGLUT1 and synaptotagmin. The higher density fractions (11-16) contained a variety of synaptic and endosomal vesicle proteins in lower quantity. All fractions were negative for the early endosome marker, EEA1, consistent with our previous result that LP2 was devoid of this marker (see also Bouvier et al., 2008, Fig.1). EphA4 was absent from fractions 1 to 4, but progressively appeared in fractions 5 to 15. Its distribution appeared bimodal, with peaks in fractions 7-8 and 10-11, suggesting two different pools of vesicles. Thus EphA4

did not follow exactly the distribution of synaptic vesicle markers, but their distributions overlapped to some extent.

### **EphA4 is present in various subpopulations of immunisolated vesicles**

The above EM and cell fractionation results support the presence of EphA4 in synaptic, as well as other types of vesicles. Since EphA4 has previously been detected in fractions of presynaptic active zones (PAZ) (Bouvier et al., 2008), the question arise as to whether this receptor is transported to this specialized region by synaptic vesicles or by Piccolo-Bassoon transport vesicles (PTVs) (Dresbach et al., 2006; Shapira et al., 2003; Tao-Cheng, 2007), which are known to transport the PAZ material. To examine these possibilities, we isolated subpopulations of synaptic vesicles and PTVs from the LS1 supernatant (see Bouvier et al., 2008), which is enriched in vesicles and deprived of synaptosomal membranes..

Antibodies directed against the cytoplasmic part of synaptophysin or piccolo, were used to immunisolate synaptic vesicles and PTVS, respectively (Fig.3.A, B). Labelling for EphA4 was observed in synaptophysin vesicles, but absent from piccolo vesicles.

To further characterize the association of EphA4 with synaptic vesicles, we immunisolated distinct subpopulations of specific neurotransmitter vesicles, using anti-VGLUT1 and anti-VGAT antibodies (Fig.3.C, D). Both immunisolates were enriched in synaptophysin, confirming the integrity of the immunisolated vesicles. Control isolations done with non specific IgGs showed faint spots of reactivity for synaptophysin, and larger ones for VGLUT1 or VGAT, but were negative for EphA4. The presence of IgG around 50

kDa may explain in part the spots of VGLUT1 or VGAT in the controls. Nevertheless, there was a clear enrichment in synaptophysin, VLUT1 and VGAT in the specific immunisolates, which confirmed the efficiency of the immunisolations. EphA4 was detected in both populations of VGLUT 1 and VGAT vesicles in comparable amounts.

Importantly, EphA4 did not co-immunoprecipitate with VGLUT1 or VGAT after treatment of the LS1 fraction with 0.5 % Triton X-100. The use of detergent disrupted lipid membranes in the vesicle-enriched preparations and, thus, only the proteins recognized by the antibodies and their direct interacting partners were precipitated. This suggests that EphA4 is present in synaptic vesicles, but not in a direct physical interaction with the vesicular transporters.

#### **EphA4 is also associated with clathrin-coated vesicles**

The presence of EphA4 in synaptic vesicles as well as in other types of vesicles moved us to examine its presence in a preparation of purified CCVs (Allaire et al., 2006; Girard et al., 2005a). Indeed, clathrin-mediated endocytosis is critical for the reuptake of synaptic material and the reformation of synaptic vesicles (Jung and Haucke, 2007). As shown in Figure 4, EphA4 showed a similar enrichment as the clathrin heavy chain protein in this fractionation protocol (in Pellet 2 (P2), in the Sucrose Gradient pellet or SGp, and in the Sucrose Gradient supernatant, or SGs). Compared to the clathrin heavy chain, it was less enriched, but still quite abundant in the CCVs fraction.

This pattern of EphA4 distribution is similar to that of synaptotagmin and synaptophysin, described previously (Allaire et al., 2006).

### **EphA4 is present in axon terminals expressing VGLUT1, but not VGAT in hippocampal CA1 adult**

Double EM immunocytochemistry, in region CA1 of the hippocampus showed a frequent co-localization of EphA4 with VGLUT1 (Fig. 5 A,B) but never with VGAT-positive terminals (Fig. 5 C, D). Thus, these results suggest that EphA4 is present in glutamatergic terminal, but not in gabaergic ones, at least in CA1 of the hippocampus.

### **EphA4 is co-localized with VGLUT1 and VGAT in cultured hippocampal neurons**

A dual immunocytochemical labeling was performed for EphA4 with either VGLUT1 or VGAT, on hippocampal neurons at DIV15. Immunostaining for EphA4 with the ab11 antibody, directed against its cytoplasmic part, gave a granular staining along neurites, with a more diffuse staining over cell bodies (Fig.6 A, D, G, J). This staining is consistent with that reported from other studies at DIV15 (Fu et al., 2007). Immunostaining for VGLUT1 or VGAT also gave granules of different sizes all along neurites and around cell bodies, consistent with the known synaptic localization of these vesicular proteins (Fig. 6 B, E, H, K). Double immuno-labeling for either VGAT or VGLUT1, together with EphA4, showed frequent spots of co-localization (Fig. 6 C, F, I, L). EphA4 co-localized with both VGLUT1 and VGAT, suggesting an association with both subpopulations of synaptic vesicle, *in vitro*.

### **The surface expression of EphA4 is regulated by neuronal activity in hippocampal culture**

The above observations constitute strong evidence that EphA4 is present in synaptic vesicles, as well as in endocytotic CCVs, in nerve terminals. This transit through these types of vesicle suggests a role for this tyrosine kinase receptor in association with neuronal activity in the presynaptic terminals. In this context, we tested if cell surface expression of EphA4 changed during neuronal activity. Immunostaining was done with an antibody raised against the extracellular domain of the receptor, on cultured hippocampal neurons, in a non stimulated condition and after 2 min of KCl depolarization (Fig. 7). The extracellular immunostaining appeared as small intense spots, or granules, on the cell bodies and neurites. We measured only the granules on neurites. Following the KCl treatment, there was a significant increase in the mean optical density of EphA4 staining, the mean surface area covered by the granules, and the numbers of EphA4 granules detected on the neurites in each of three experiments (Fig.7B-D).



## **Discussion**

We previously demonstrated that EphA4 is associated with presynaptic compartments including the active zone and vesicles, in addition to being in postsynaptic elements such as spines and PSD (Bouvier et al., 2008). In the present study, we have further investigated the association of EphA4 with synaptic and endocytotic vesicles by cell fractionation, immunoisolation, confocal and EM dual immunocytochemistry. The results provide strong evidence for the presence of EphA4 in synaptic vesicles, a novel observation for a tyrosine kinase receptor, as well as with CCVs.

### **EphA4 may be transiting to the active zone through neurotransmitter synaptic vesicles**

The EM observations and the linear sucrose density gradient indicated that EphA4 was attached to various subpopulations of vesicles. In EM, the EphA4 immunoreaction product often decorated only small subpopulations of vesicles in axon terminal profiles, while, in fractionation, EphA4 only partly overlapped the distribution of synaptic vesicle markers (VGLUT1, synaptophysin, synaptotagmin) indicating that it is also present in other types of vesicles. Two points have to be considered to read this fractionation. EphA4 is not expressed in all nerve terminals, while it is also located in several other types of organelles. Therefore, its distribution in the fractions is expected to differ from that of synaptic vesicle markers.

According to the immunoisolation and immunocytochemistry on cultured hippocampal neurons, at least two distinct populations of synaptic vesicles, VGLUT1- and

VGAT-positive, were carrying EphA4. Indeed, the glutamate and GABA transporters have been demonstrated to reside on separate vesicles which are functionally distinct subpopulation of synaptic vesicles (Takamori et al., 2000). In contrast, the PTVs immunoisolated with an anti-piccolo antibody, were EphA4-negative, indicating that the receptor is not transported to the presynaptic active zone in these transport vesicles. Indeed, PTVs are clearly distinct from the synaptic vesicle and have been described as the transport vesicles which carry the cytomatrix material composed of piccolo, bassoon, Rim, Munc13, Munc18, and SNAP25 to the active zone (Shapira et al., 2003). Thus, one hypothesis that should be tested is that EphA4 is transported to the axon terminals and presynaptic active zones by synaptic vesicles.

It may seem contradictory that EphA4 was detected only in VGLUT1-positive axon terminals in CA1 of the hippocampus. This result is consistent with our previous EM analysis of EphA4 in the mature rat hippocampus (Tremblay et al., 2007), where it was concluded that most, if not all, of the labelled nerve terminals were excitatory (mostly axo-spinous and asymmetric). However, the LS1 supernatant, the starting material for immunoisolation, was extracted from total forebrain/midbrain of adult mouse. Examination of other forebrain regions where EphA4 is expressed, such as the thalamus, might therefore reveal EphA4-containing GABA terminals. On the other hand, the co-localization of EphA4 and VGAT *in vitro* in hippocampal neurons at DIV15 could be due to the embryonic state of the neurons in culture.

### **A role for EphA4 in endocytosis?**

The localization of EphA4 in CCVs is also a novel observation and raises some questions about the endocytosis of the receptor and its recycling. In the CCVs fractionation, EphA4 showed a distribution similar to that of the synaptic vesicle markers, synaptophysin and synaptotagmin (Allaire et al., 2006). It has been estimated that approximately 90 % of all CCVs isolated from rat brain lysate are involved in SV retrieval (Girard et al., 2005b). Thus this tyrosine kinase receptor could be recycled together with the synaptic vesicle material and its association with CCVs might be considered as further evidence of an association of EphA4 with synaptic vesicles.

Other receptor tyrosine kinases, like RET (Richardson et al., 2006), the insulin growth factor receptor (Monami et al., 2008), the epidermal growth factor receptor (Carter and Sorkin, 1998; Jiang et al., 2003; Sorkina et al., 2002), p75 and Trk receptors (Bronfman et al., 2003; Zheng et al., 2008) have already been described using the clathrin-mediated endocytosis. Internalized TrkA and TrkB have also been shown to be still competent, functional and signaling in the endocytotic vesicles (Grimes et al., 1997; Grimes et al., 1996) while transported from synapses to cell body in a still phosphorylated state (McPherson et al., 2001; Watson et al., 1999). In analogy, Eph receptors might also remain functional in the endocytotic vesicles. Indeed, the ephrin ligand and the Eph receptor have been shown to be endocytosed as complexes. Two different mechanisms have been proposed, cleavage of ephrin-As by a metalloprotease, for EphA-ephrin-A complexes (Hattori et al., 2000; Janes et al., 2005) and trans-endocytosis for EphB-Ephrin-B

complexes (Marston et al., 2003; Zimmer et al., 2003), but neither type of endocytosis had been characterised or associated with clathrin-mediated endocytosis.

Although EphA4 had never been directly associated with CCVs, another Eph receptor, EphB2, has previously been implicated in the molecular modulation of the clathrin-dependant endocytosis by influencing the tyrosine phosphorylation of synaptojanin-1 (Hopper and O'Connor, 2005; Irie et al., 2005). Interestingly, the activation of EphA4 has also been shown to result in the recruitment of cyclin-dependent kinase-5 (Cdk5) leading to its phosphorylation (Fu et al., 2007). This interaction has been described in spines, however Cdk5 is also a key component of presynaptic vesicle endocytosis in the clathrin machinery (Nguyen and Bibb, 2003), where it seems to modulate the phosphorylation of the endocytic proteins, dynamin, amphiphysin, and also synaptojanin-1 (Graham et al., 2007; Lee et al., 2004; Tan et al., 2003; Tomizawa et al., 2003).

Furthermore activated EphA4 also recruits and activates PLC $\gamma$ 1 (Zhou et al., 2007), which then generates the ubiquitous second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol (Rebecchi and Pentylala, 2000). These phosphoinositides are known to play a critical role in clathrin-mediated endocytosis (Gaidarov and Keen, 1999). Likewise, PLC $\gamma$ 1 has the same cellular distribution as EphA4 in cell fractionation experiments and is also associated with synaptic vesicles (Zhou et al., 2007). Thus EphA4 could directly participate in the synaptic vesicle cycle.

### **A role for EphA4 in synaptic vesicles?**

Eph receptors could transit by synaptic vesicles to be delivered to the PAZ where they could play a role in the structural cohesion of synapses. Indeed EphA4 and EphB2 have been also localized in PAZ (Bouvier et al., 2008). Many adhesion molecules, including cadherins, neuroligins, neuexins, and SynCAM (synaptic cell adhesion molecule) are concentrated in PAZ and are essential for synapse formation and stabilization (Dalva, 2007; Rosenmund et al., 2003). Interestingly, EphA4 cell surface expression appeared directly modulated by neuronal activity. Thus, the increase in EphA4 surface expression of hippocampal neurons, after stimulation of neurotransmitters release with KCl, is likely associated with synaptic vesicle fusion with the PAZ.

Furthermore, EphB2 has been demonstrated to interact with GRIP1 and to be an essential partner for the kinesin-dependant transport of AMPA receptors to the postsynaptic part of the synapse (Hoogenraad et al., 2005). EphA4 might therefore play a similar role in the trafficking of synaptic vesicles to terminals.

### **Conclusion**

The present observations unveil potentially novel aspects in the trafficking and function of Eph receptors in axon terminals. The association of EphA4 with synaptic vesicles and CCVs suggest new possibilities for roles in the synaptic vesicle cycle and in endocytosis. Its cell surface expression seemed to be modulated by neuronal activity and is consistent with an implication of Eph receptors in synapse plasticity.

## Materials and Methods

### Animals

All procedures were conducted in strict accordance with the *Guide to the Care and Use of Experimental Animals* (Ed2) of the Canadian Council on Animal Care. The experimental protocols were approved by the Animal Care Committee of the Université de Montreal.

Cell fractionation and immunoisolation experiments were conducted on 14 adult male C57BL/6 mice. These animals were decapitated under deep CO<sub>2</sub> anaesthesia.

The electron microscopic analysis was carried out on brain tissue from four adult male C57BL/6 mice. These animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) and perfused through the aortic arch with a solution of 0.5 % acrolein diluted in 4 % paraformaldehyde (PFA), in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB) pH 7.4, followed by 4 % PFA. Brains were further fixed by immersion in 4% PFA for 1 h at 4°C, and washed in sodium phosphate-buffered saline (PBS; 0.9% NaCl in 50 mM PB, pH 7.4). Transverse sections, 50 µm thick, were cut in ice-cooled PBS with a vibratome.

For hippocampal cell culture, 12 litters of E18-19 rat fetuses were taken from pregnant dams, deeply anaesthetized with CO<sub>2</sub>.

### Antibodies

The polyclonal anti-EphA4 antibody (Ab11), a generous gift from Dr E.A. Pasquale (The Burnham Institute, La Jolla, CA), has been shown to recognize EphA4 in rat, mouse and human (Martone et al., 1997; Murai et al., 2003; Soans et al., 1994). We also tested its

specificity for EM immunocytochemistry with EphA4<sup>-/-</sup> mice (Tremblay et al., 2007). The monoclonal EphA4 antibody, raised against peptides 279-472 of the extracellular domain of EphA4, was purchased from BD Transduction Laboratories (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) and its specificity tested by Western blotting from brain homogenate of EphA4<sup>-/-</sup> mice (Helmbacher et al., 2000).

The anti-VGLUT1 and anti-VGAT monoclonal antibodies, respectively raised against a synthetic peptides corresponding to residues 456-560 of rat VGLUT1, or residues 75-87 of rat VGAT, were purchased from Synaptic systems (Goettingen, Germany). The polyclonal antibody anti-Piccolo, raised against residues 4439-4776 of the rat protein, and the monoclonal anti-synaptophysin antibody were purchased from Synaptic system. The anti-clathrin heavy chain (CHC) antibody was purchased from BD Biosciences.

### **LS1 and LP2 subcellular fractionation of mouse forebrain/midbrain**

Subcellular fractions were prepared from adult mouse forebrain/midbrain (2 for each of 3 experiment), as described (see supplementary material in Zhou et al., 2007). Briefly, the forebrain/midbrain was dissected out on ice, following a transverse cut between the occipital cortex and cerebellum. All subsequent steps were done at 0-4°C. Brain tissues were homogenized by 9 up-and-down strokes at 900 rpm in 20 ml of ice-cold sucrose/HEPES buffer (0.32 M sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.4) containing protease inhibitors (Roche complete). The nuclear material (P1) was discarded following centrifugation at 1 000 x g during 10 min, and the supernatant (S1) was centrifuged again at 12 000 x g for 15 min. The new supernatant was discarded and the pellet was homogenized

again in 20 ml of ice-cold sucrose/HEPES buffer and centrifuged again at 13 000 x g for 15 min. The resulting pellet, constituting the synaptosomal fraction (P2) was re-suspended in approximately 2 ml of sucrose/HEPES buffer.

Two milliliters of this P2 fraction were lysed osmotically in 20 ml of 10 mM HEPES buffer containing the protease inhibitors, and then homogenized by 3 up-and-down strokes at 2 000 rpm and centrifuged at 33,000 x g for 20 min. The pellet, representing the synaptosomal membrane fraction (LP1) was discarded, while the supernatant (LS1) was used for immunoisolation of vesicles, or centrifuged again at 260 000 x g during 2 h, to obtain the crude vesicle fraction (LP2).

#### **Linear sucrose density gradient (SDG) of crude vesicle fraction**

The crude vesicle fraction, LP2, was re-suspended in 3 ml of sucrose/HEPES buffer (0,04 M sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.4). The fraction was homogenized (3 strokes at 900 rpm) followed by repeated extrusion through 22 ½ and 27 ½ gauge needles and layered on a top of a 37 ml linear sucrose density gradient ranging from 10 to 35% of sucrose solution. The gradient was centrifuged at 120 000 x g during 4h using a SW 28 rotor (Beckmann). Sixteen 2,5 ml aliquot fractions were collected from the top (fraction 1) to the bottom of the tube (fraction 16). Equal volumes of each fraction (80 µl) were added to 2X loading buffer and loaded on a SDS gel for Western blotting.

#### **Immunoisolation of vesicles**

Magnetic beads ( $\sim 10^7$ ) with pre-coupled immunoglobulins (Dynabeads M-280 sheep anti-rabbit or anti-mouse IgG; Dynal, Invitrogen, Oslo, Norway), were washed 3



times with PBS and incubated overnight with the primary polyclonal or monoclonal antibodies (3  $\mu$ g of each), or rabbit or mouse control immunoglobulins (Chromopur rabbit or mouse IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), in PBS containing 1 % bovine serum albumin (BSA). The LS1 supernatant (0.4  $\mu$ g of protein per  $\mu$ l) was used as an immunoisolation buffer (Ii buffer) consisting of LS1 fraction, 50 mM Tris HCl at pH 7,4, 50 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 M sucrose, and protease inhibitors (Complete EDTA-free, Roche, Manheim, Germany). The antibody-coupled beads were washed 3 times with PBS/BSA 1%. One milliliter of the Ii buffer/ BSA 1% was added to the pre-coupled beads for each immunoisolation and incubated for 1h45. The beads were then washed 4 times with PBS and resuspended in 25  $\mu$ l of loading buffer (Biorad, Hercules, CA, USA), heated at 95 °C for 5 min, for standard SDS PAGE and Western blotting.

#### **Isolation of clathrin-coated vesicles**

The isolation of clathrin-coated vesicles (CCVs) from rat adult brain was performed as described (Girard et al., 2005a).

#### **Hippocampal cell culture**

Primary neuronal cultures were prepared from the hippocampi of 18-19 days old foetal mice, as described by Banker (Banker and Cowan, 1977). For each experiment (n=3), two litters of C57BL/6 mice were used. Briefly, the hippocampi were dissociated by treatment with trypsin (0.25% for 15 min at 37°C, Sigma), followed by trituration with fire-polished Pasteur pipettes. Dissociated cells were plated at densities of 100 000 to 200 000

on poly-L-lysine-treated coverslips (Fisher, Nepean, Ontario, Canada) in minimum essential medium (MEM, Invitrogen) containing 10 mM pyruvic acid, 0,6% glucose and 10 % heat-inactivated horse serum. After 3 h of incubation at 37°C, cultures were fed with Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 0,5 mM L-glutamine and 2 % B27 (Gibco, Invitrogen). Cultures were fixed after 15 days *in vitro* (DIV15) with 4% paraformaldehyde.

### **Immunofluorescence and confocal microscopy**

Coverslips were treated for 5 min with 3% Triton X-100 in PBS, rinsed 3 times with PBS, and blocked during 1h with a solution of 5% BSA in PBS, at room temperature. They were incubated overnight with the primary antibodies, at room temperature, in a humid chamber, in 5% BSA in PBS. After 3 rinses in PBS, coverslips were incubated for 1h with FITC-labeled anti rabbit and TRITC-labeled anti-mouse antibodies in PBS/BSA. The coverslips were rinsed 4 times with PBS and mounted with Mowiol. Immunofluorescence was viewed and captured by a Leica DM IRBE confocal microscope. High-resolution pictures were acquired as composites of eight confocal optical sections.

### **KCl depolarization of hippocampal neurons**

Hippocampal neurons at DIV15 were incubated for 2 min with 90 mM KCl in Neurobasal medium supplemented with glutamine, and B27. They were then washed twice with ice-cold PBS, before fixation in 4% PFA. Triton X-100 was omitted to restrict the immunodetection of EphA4 to the cell surface by using an antibody directed against the extracellular domain of the receptor. Immunofluorescence was viewed and captured by a

fluorescence microscope (Karl Zeiss, Axiophot, Germany) equipped with a numeric camera (qimaging, Canada). The measurements of cell surface EphA4 was carried out with the Northern Eclipse Imaging V.6 software (Empix Imaging, Mississauga, ON, Canada), on 25 frames covering each 21 000  $\mu\text{m}^2$  for each condition (control vs KCl treatment). Unstimulated and KCl-treated cultures were analyzed under the same image exposure, with the same threshold values. The analysis was performed in 3 cultures for each condition. All granular spots of labeling were treated as individual objects for the following measurements: object count, selected area, total object area, percent object area, and total gray. Measurements were automatically transferred in an Excel document. Optical density was the result of the gray value of the spot multiplied by its area and divided by the total area of the frame.

### **Electron microscope immunocytochemistry**

Sections were processed free-floating by pre-embedding immunoperoxidase and immunogold protocols. The protocol of double-EphA4 and -VGLUT1 or -VGAT immunolabeling for electron microscopy was slightly modified from the single labeling protocol described previously (Tremblay et al., 2007). After simultaneous incubation with both primary antibodies for 48h, VGLUT1 (monoclonal, 1:200 dilution; Synaptic Systems, Goettingen, Germany) or VGAT (monoclonal, 1:200 dilution; Synaptic Systems) was labeled with immunogold and then EphA4 (Ab11; 1:500 dilution) with immunoperoxidase. For immunogold labeling, sections were incubated overnight at room temperature (RT) in goat anti-mouse IgGs conjugated to 1-nm colloidal gold particles (AuroProbe One;

Amersham Biosciences, Oakville, Ontario, Canada) in a blocking solution of PBS containing 5% normal goat serum and 0.5% gelatin. The diameter of the immunogold particles was increased with a silver enhancement kit (IntenSE, Amersham Biosciences) for 12-15 minutes at RT. For immunoperoxidase labeling, the sections were incubated for 2 hours at RT in goat anti-rabbit IgGs conjugated to biotin (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and with streptavidin-horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch) for 1 hour in blocking solution. Afterwards, labeling was revealed with 0.05% diaminobenzidine (DAB) and 0.01% hydrogen peroxide in Tris/HCl-buffered saline (50 mM, pH 7.4).

Sections were post-fixed flat in 1% osmium tetroxide, embedded in resin (Durcupan ACM; Sigma), and mounted onto ACLAR embedding film (EMS, Hatfield, PA). Small pieces of the latero-ventral hippocampus (CA1 pyramidal cell layer and stratum radiatum) were excised from the embedding film, re-embedded at the tip of resin blocks, sectioned (70-80 nm-thick) with an ultramicrotome (Ultracut S, Leica Canada, St-Laurent, Québec, Canada), collected on bare square-mesh copper grids, stained with lead citrate, and examined at 60 kV with a Philips CM100 electron microscope.

## **Acknowledgements**

This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and by an Infrastructure Grant from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ, grant to the GRSNC). D.B. was supported by a studentship from the GRSNC, and M.-È. Tremblay by studentships from the FRSQ, GRSNC and Université de Montréal. The authors thank Dr. Miguel Chagnon for the statistical analyses.

## **Abbreviations**

CA1, Cornus ammonis sectors of hippocampus; CCVs, clathrin-coated vesicles; Cdk5, cyclin-dependent kinase-5; CNS, central nervous system; EEA1, early endosome antigen-1; LTD, long term depression; LTP, long term potentiation; PAZ, presynaptic active zone; PLC $\gamma$ , Phospholipase-C gamma; PSD, postsynaptic density; PTVs, Piccolo-bassoon transport vesicles; SynCAMs, synaptic cell adhesion molecule; VGAT, vesicular GABA transporter ; VGLUT, vesicular Glutamate transporter; VMAT2, vesicular monoamine transporter.

## References

- Allaire, P.D., B. Ritter, S. Thomas, J.L. Burman, A.Y. Denisov, V. Legendre-Guillemain, S.Q. Harper, B.L. Davidson, K. Gehring, and P.S. McPherson. 2006. Connecdenn, a novel DENN domain-containing protein of neuronal clathrin-coated vesicles functioning in synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci.* 26:13202-12.
- Armstrong, J.N., M.J. Saganich, N.J. Xu, M. Henkemeyer, S.F. Heinemann, and A. Contractor. 2006. B-ephrin reverse signaling is required for NMDA-independent long-term potentiation of mossy fibers in the hippocampus. *J Neurosci.* 26:3474-81.
- Banker, G.A., and W.M. Cowan. 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 126:397-42.
- Bonanomi, D., F. Benfenati, and F. Valtorta. 2006. Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Prog Neurobiol.* 80:177-217.
- Bouvier, D., A.T. Corera, M.E. Tremblay, M. Riad, M. Chagnon, K.K. Murai, E.B. Pasquale, E.A. Fon, and G. Doucet. 2008. Presynaptic and postsynaptic localization of EphA4 and EphB2 in adult mouse forebrain. *J Neurochem.*
- Bronfman, F.C., M. Tcherpakov, T.M. Jovin, and M. Fainzilber. 2003. Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome. *J Neurosci.* 23:3209-20.
- Buchert, M., S. Schneider, V. Meskenaite, M.T. Adams, E. Canaani, T. Baechi, K. Moelling, and C.M. Hovens. 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.* 144:361-71.
- Carter, R.E., and A. Sorokin. 1998. Endocytosis of functional epidermal growth factor receptor-green fluorescent protein chimera. *J Biol Chem.* 273:35000-7.
- Contractor, A., C. Rogers, C. Maron, M. Henkemeyer, G.T. Swanson, and S.F. Heinemann. 2002. Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science.* 296:1864-9.
- Dalva, M.B. 2007. There's more than one way to skin a chimaerin. *Neuron.* 55:681-4.
- Dresbach, T., V. Torres, N. Wittenmayer, W.D. Altmann, P. Zamorano, W. Zuschratter, R. Nawrothki, N.E. Ziv, C.C. Garner, and E.D. Gundelfinger. 2006. Assembly of active zone precursor vesicles: obligatory trafficking of presynaptic cytomatrix proteins Bassoon and Piccolo via a trans-Golgi compartment. *J Biol Chem.* 281:6038-47.
- Ethell, I.M., F. Irie, M.S. Kalo, J.R. Couchman, E.B. Pasquale, and Y. Yamaguchi. 2001. EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. *Neuron.* 31:1001-13.
- Fu, W.Y., Y. Chen, M. Sahin, X.S. Zhao, L. Shi, J.B. Bikoff, K.O. Lai, W.H. Yung, A.K. Fu, M.E. Greenberg, and N.Y. Ip. 2007. Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism. *Nat Neurosci.* 10:67-76.
- Gaidarov, I., and J.H. Keen. 1999. Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol.* 146:755-64.



- Girard, M., P.D. Allaire, F. Blondeau, and P.S. McPherson. 2005a. Isolation of clathrin-coated vesicles by differential and density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol.* Chapter 3:Unit 3 13.
- Girard, M., P.D. Allaire, P.S. McPherson, and F. Blondeau. 2005b. Non-stoichiometric relationship between clathrin heavy and light chains revealed by quantitative comparative proteomics of clathrin-coated vesicles from brain and liver. *Mol Cell Proteomics.* 4:1145-54.
- Goldshmit, Y., S. McLenachan, and A. Turnley. 2006. Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS. *Brain Res Rev.* 52:327-45.
- Graham, M.E., V. Anggono, N. Bache, M.R. Larsen, G.E. Craft, and P.J. Robinson. 2007. The in vivo phosphorylation sites of rat brain dynamin I. *J Biol Chem.* 282:14695-707.
- Grimes, M.L., E. Beattie, and W.C. Mobley. 1997. A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9909-14.
- Grimes, M.L., J. Zhou, E.C. Beattie, E.C. Yuen, D.E. Hall, J.S. Valletta, K.S. Topp, J.H. LaVail, N.W. Bunnett, and W.C. Mobley. 1996. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci.* 16:7950-64.

- Grunwald, I.C., M. Korte, G. Adelman, A. Plueck, K. Kullander, R.H. Adams, M. Frotscher, T. Bonhoeffer, and R. Klein. 2004. Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nat Neurosci.* 7:33-40.
- Hattori, M., M. Osterfield, and J.G. Flanagan. 2000. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science.* 289:1360-5.
- Helmbacher, F., S. Schneider-Maunoury, P. Topilko, L. Tiret, and P. Charnay. 2000. Targeting of the EphA4 tyrosine kinase receptor affects dorsal/ventral pathfinding of limb motor axons. *Development.* 127:3313-24.
- Henkemeyer, M., O.S. Itkis, M. Ngo, P.W. Hickmott, and I.M. Ethell. 2003. Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol.* 163:1313-26.
- Himanen, J.P., and D.B. Nikolov. 2003. Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem Cell Biol.* 35:130-4.
- Hoogenraad, C.C., A.D. Milstein, I.M. Ethell, M. Henkemeyer, and M. Sheng. 2005. GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat Neurosci.* 8:906-15.
- Hopper, N.A., and V. O'Connor. 2005. Ephrin tempers two-faced synaptojanin 1. *Nat Cell Biol.* 7:454-6.
- Irie, F., M. Okuno, E.B. Pasquale, and Y. Yamaguchi. 2005. EphrinB-EphB signalling regulates clathrin-mediated endocytosis through tyrosine phosphorylation of synaptojanin 1. *Nat Cell Biol.* 7:501-9.

- Janes, P.W., N. Saha, W.A. Barton, M.V. Kolev, S.H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C.P. Blobel, J.P. Himanen, M. Lackmann, and D.B. Nikolov. 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*. 123:291-304.
- Jiang, X., F. Huang, A. Marusyk, and A. Sorkin. 2003. Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell*. 14:858-70.
- Jung, N., and V. Haucke. 2007. Clathrin-mediated endocytosis at synapses. *Traffic*. 8:1129-36.
- Klein, R. 2004. Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol*. 16:580-9.
- Lee, S.Y., M.R. Wenk, Y. Kim, A.C. Nairn, and P. De Camilli. 2004. Regulation of synaptojanin 1 by cyclin-dependent kinase 5 at synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:546-51.
- Marston, D.J., S. Dickinson, and C.D. Nobes. 2003. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol*. 5:879-88.
- Martone, M.E., J.A. Holash, A. Bayardo, E.B. Pasquale, and M.H. Ellisman. 1997. Immunolocalization of the receptor tyrosine kinase EphA4 in the adult rat central nervous system. *Brain Res*. 771:238-50.
- McPherson, P.S., B.K. Kay, and N.K. Hussain. 2001. Signaling on the endocytic pathway. *Traffic*. 2:375-84.

- Monami, G., V. Emiliozzi, and A. Morrione. 2008. Grb10/Nedd4-mediated multiubiquitination of the insulin-like growth factor receptor regulates receptor internalization. *J Cell Physiol.*
- Murai, K.K., L.N. Nguyen, F. Irie, Y. Yamaguchi, and E.B. Pasquale. 2003. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci.* 6:153-60.
- Murai, K.K., and E.B. Pasquale. 2004. Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *Neuroscientist.* 10:304-14.
- Nguyen, C., and J.A. Bibb. 2003. Cdk5 and the mystery of synaptic vesicle endocytosis. *J Cell Biol.* 163:697-9.
- Pasquale, E.B. 2005. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:462-75.
- Penzes, P., A. Beeser, J. Chernoff, M.R. Schiller, B.A. Eipper, R.E. Mains, and R.L. Huganir. 2003. Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron.* 37:263-74.
- Rebecchi, M.J., and S.N. Pentylala. 2000. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.* 80:1291-335.
- Richardson, D.S., A.Z. Lai, and L.M. Mulligan. 2006. RET ligand-induced internalization and its consequences for downstream signaling. *Oncogene.* 25:3206-11.
- Rosenmund, C., J. Rettig, and N. Brose. 2003. Molecular mechanisms of active zone function. *Curr Opin Neurobiol.* 13:509-19.

- Shapira, M., R.G. Zhai, T. Dresbach, T. Bresler, V.I. Torres, E.D. Gundelfinger, N.E. Ziv, and C.C. Garner. 2003. Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. *Neuron*. 38:237-52.
- Soans, C., J.A. Holash, and E.B. Pasquale. 1994. Characterization of the expression of the Cck8 receptor-type tyrosine kinase during development and in tumor cell lines. *Oncogene*. 9:3353-61.
- Sorkina, T., F. Huang, L. Beguinot, and A. Sorkin. 2002. Effect of tyrosine kinase inhibitors on clathrin-coated pit recruitment and internalization of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. 277:27433-41.
- Takamori, S., D. Riedel, and R. Jahn. 2000. Immunoprecipitation of GABA-specific synaptic vesicles defines a functionally distinct subset of synaptic vesicles. *J Neurosci*. 20:4904-11.
- Tan, T.C., V.A. Valova, C.S. Malladi, M.E. Graham, L.A. Berven, O.J. Jupp, G. Hansra, S.J. McClure, B. Sarcevic, R.A. Boadle, M.R. Larsen, M.A. Cousin, and P.J. Robinson. 2003. Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol*. 5:701-10.
- Tao-Cheng, J.H. 2007. Ultrastructural localization of active zone and synaptic vesicle proteins in a preassembled multi-vesicle transport aggregate. *Neuroscience*. 150:575-84.
- Tomizawa, K., S. Sunada, Y.F. Lu, Y. Oda, M. Kinuta, T. Ohshima, T. Saito, F.Y. Wei, M. Matsushita, S.T. Li, K. Tsutsui, S. Hisanaga, K. Mikoshiba, K. Takei, and H.

- Matsui. 2003. Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Biol.* 163:813-24.
- Torres, R., B.L. Firestein, H. Dong, J. Staudinger, E.N. Olson, R.L. Huganir, D.S. Bredt, N.W. Gale, and G.D. Yancopoulos. 1998. PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron.* 21:1453-63.
- Tremblay, M.E., M. Riad, D. Bouvier, K.K. Murai, E.B. Pasquale, L. Descarries, and G. Doucet. 2007. Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *J Comp Neurol.* 501:691-702.
- Watson, F.L., H.M. Heerssen, D.B. Moheban, M.Z. Lin, C.M. Sauvageot, A. Bhattacharyya, S.L. Pomeroy, and R.A. Segal. 1999. Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J Neurosci.* 19:7889-900.
- Yamaguchi, Y., and E.B. Pasquale. 2004. Eph receptors in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol.* 14:288-96.
- Zheng, J., W.H. Shen, T.J. Lu, Y. Zhou, Q. Chen, Z. Wang, T. Xiang, Y.C. Zhu, C. Zhang, S. Duan, and Z.Q. Xiong. 2008. Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. *J Biol Chem.*

- Zhou, L., S.J. Martinez, M. Haber, E.V. Jones, D. Bouvier, G. Doucet, A.T. Corera, E.A. Fon, A.H. Zisch, and K.K. Murai. 2007. EphA4 signaling regulates phospholipase Cgamma1 activation, cofilin membrane association, and dendritic spine morphology. *J Neurosci.* 27:5127-38.
- Zimmer, M., A. Palmer, J. Kohler, and R. Klein. 2003. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol.* 5:869-78.

Figure 1 : Electron microscope immunocytochemistry for EphA4 in the CA1 region of adult mouse hippocampus showing that the immunostaining sometimes decorates all synaptic vesicles in an axon terminal profile (A) and sometimes is restricted to only a subgroup of such vesicles (B, C).

t: axonal terminal, s: spine. Scale bars: 250 nm.



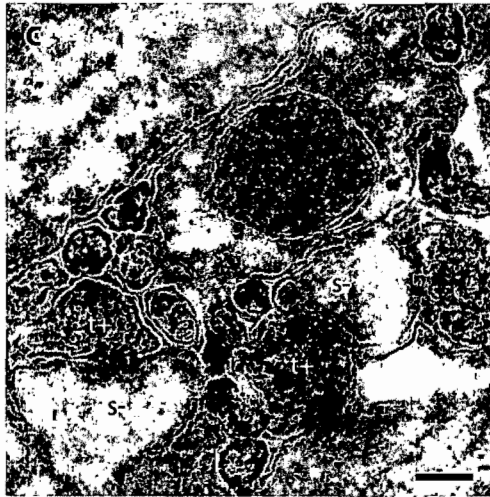
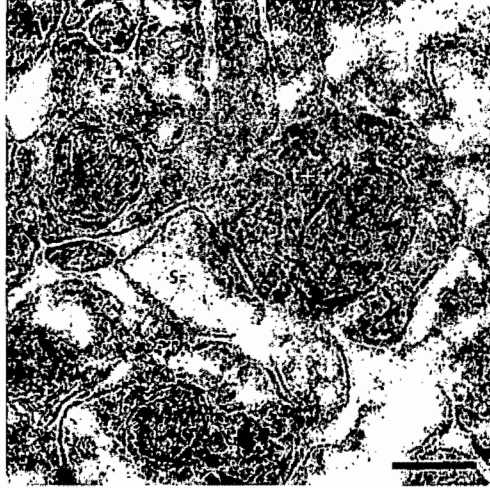


Figure 2 : Distribution of EphA4 in an LP2 fraction layered on a linear 10-35% sucrose density gradient.

EphA4 distribution overlapped partially with that of synaptic vesicle markers (synaptophysin, VGLUT1, synaptotagmin, but not with the vesicular monoamine transporter, VMAT2). However, EphA4 did not follow the distribution of the late endosome marker, Rab7.

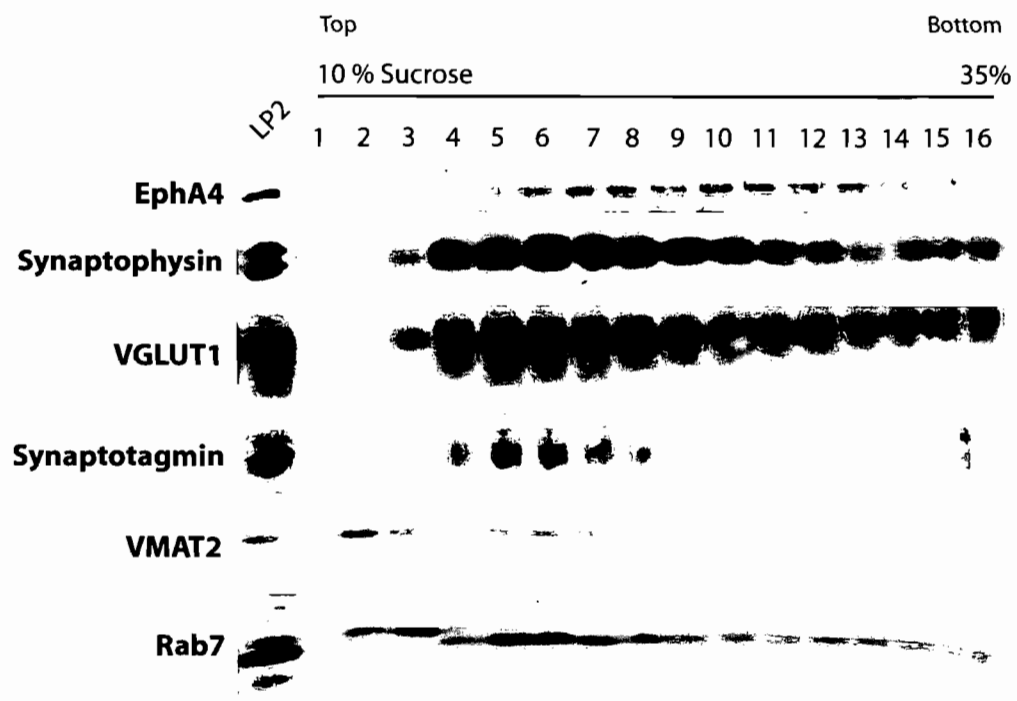


Figure 3 : Immunoisolation of synaptic and piccolo-bassoon transport vesicles from the LS1 cell fraction.

A) Synaptic vesicles were immunoisolated with an anti-synaptophysin antibody (Syn). Immunoisolation with control immunoglobulins (Ctl IgG) was negative for EphA4 and showed only traces of synaptophysin staining, whereas the immunoisolation with synaptophysin was positive for both EphA4 and synaptophysin. B) Piccolo-bassoon transport vesicles (PTVs) were immunoisolated with an anti-piccolo antibody (Pic). The immunoisolation of PTVs was negative for EphA4. C) Immunoisolation of glutamatergic synaptic vesicles (VGLUT1-Ii) and immunoprecipitation of VGLUT1 (VGLUT1-IP) using an anti-VGLUT1 antibody. The immunoisolation with the control IgGs was negative for EphA4 and synaptophysin, but showed a spot at the level of VGLUT1 (~50 KDa) that is probably attributable to the IgGs. The immunoisolation with the VGLUT antibody was positive for EphA4 and synaptophysin (confirming the success of the immunoisolation of synaptic vesicles), while the spot corresponding to VGLUT1 was strongly increased, also confirming the success of the immunoisolation. The immunoprecipitation of VGLUT1 was negative for EphA4, indicating that the co-localisation in the same vesicles is not through direct interactions between the two molecules. D) Immunoisolation of gabaergic synaptic vesicles (VGAT-Ii) and immunoprecipitation of VGAT (VGAT-IP): results similar to VGLUT1, showing that EphA4 is present in these vesicles but does not interact directly with VGAT.

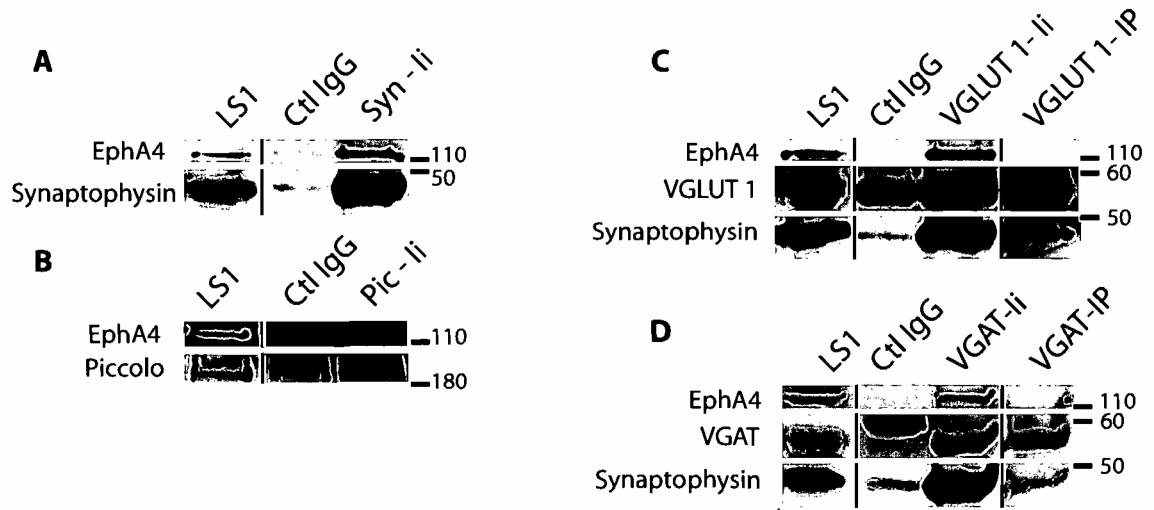


Figure 4 : Isolation of clathrin-coated vesicles by cell fractionation.

EphA4 follows a similar enrichment as the clathrin heavy chain, except in the CCV fraction, where it remained nevertheless quite abundant, showing its presence in the CCV-enriched fraction from adult rat brain [H, Homogenate; P1, pellet-1; P2, pellet-2 S2; supernatant-2; SGp, pellet of the sucrose gradient; SGs, supernatant of the sucrose gradient, from (Girard et al., 2005a)].

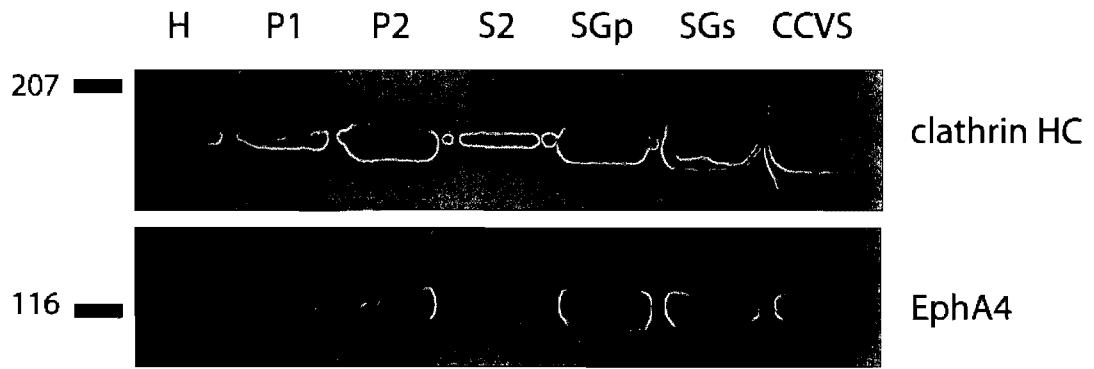


Figure 5: Double immunocytochemistry for EphA4 (immunoperoxidase) with VGLUT or VGAT (immunogold) in the CA1 region of adult mouse hippocampus show that EphA4 is co-localized with VGLUT1 (A, B) in glutamatergic axon terminals, but appears absent from gabaergic terminals labeled for VGAT (C, D).

Scale bars: 250 nm.



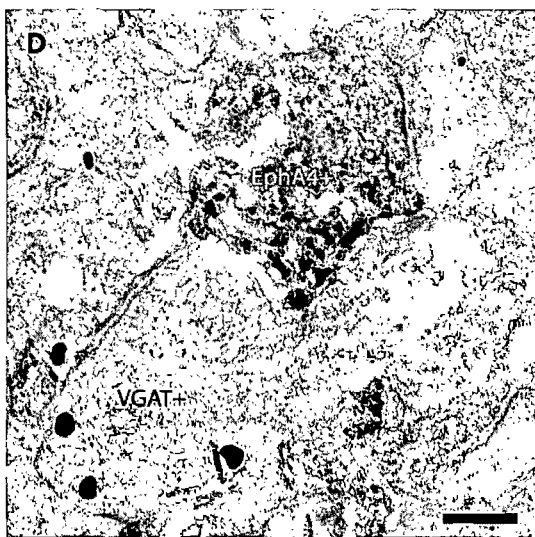
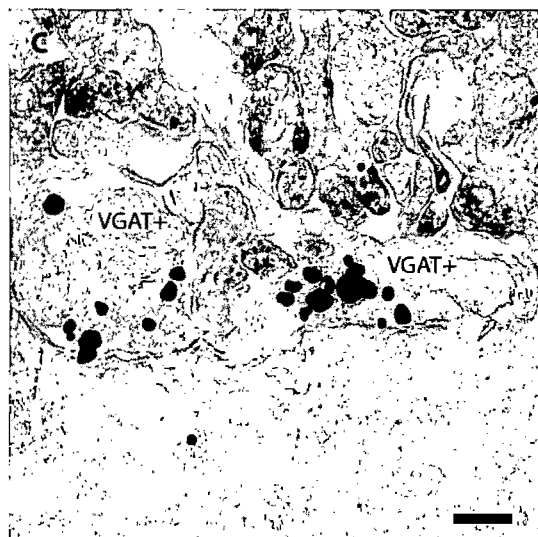
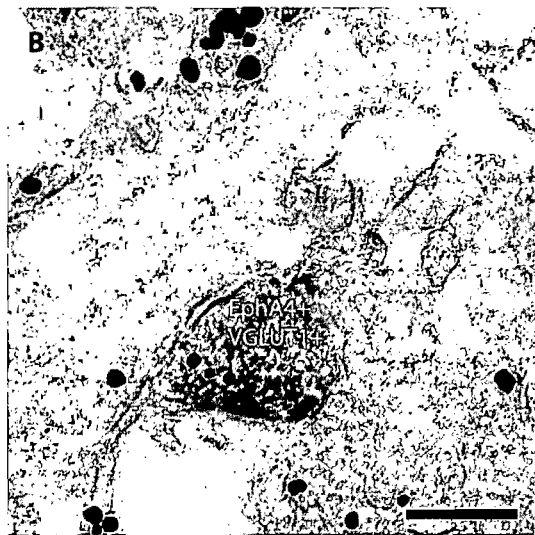
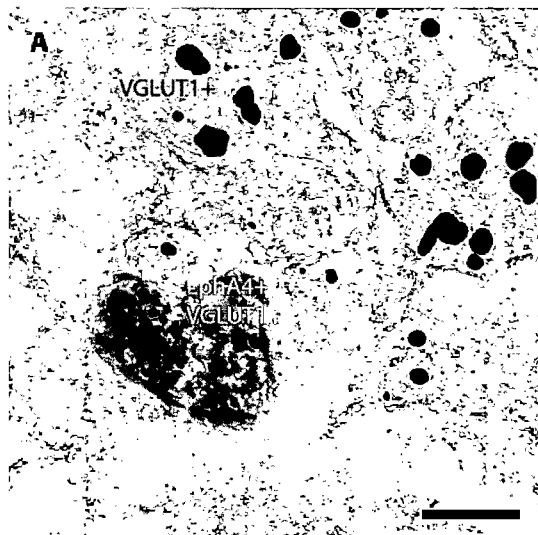


Figure 6: Double immunocytochemistry for EphA4 with VGLUT1 or VGAT on hippocampal neurons at DIV15 in culture.

Anti-EphA4 (green in A, D, G, J), anti-VGLUT1 (B, E, red), and anti-VGAT (H, K, red).

Co-localization of EphA4 with VGLUT1 (C, F) or VGAT (I, L) appear in yellow on the overlay. Scale bars: 5  $\mu$ m.

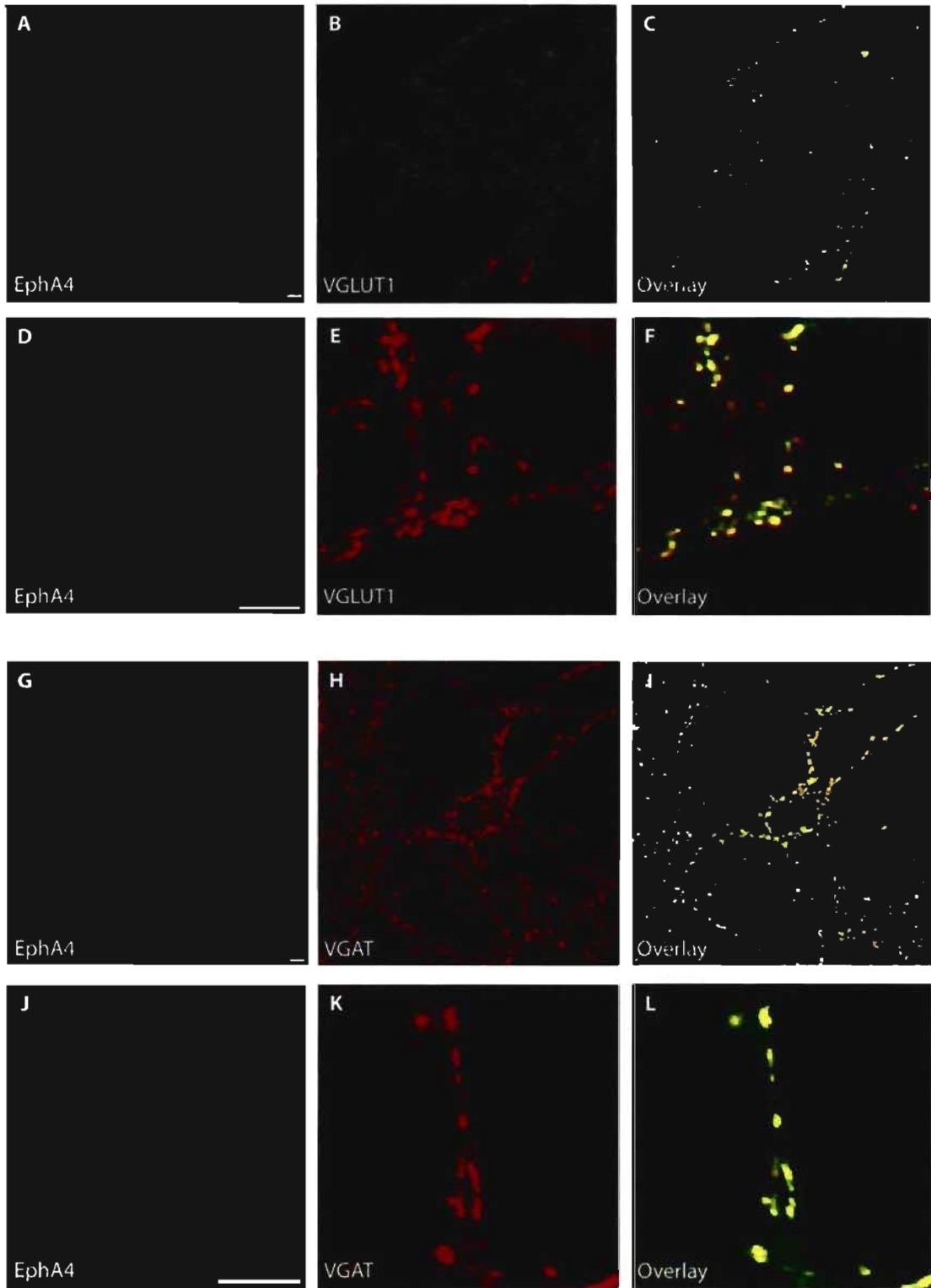
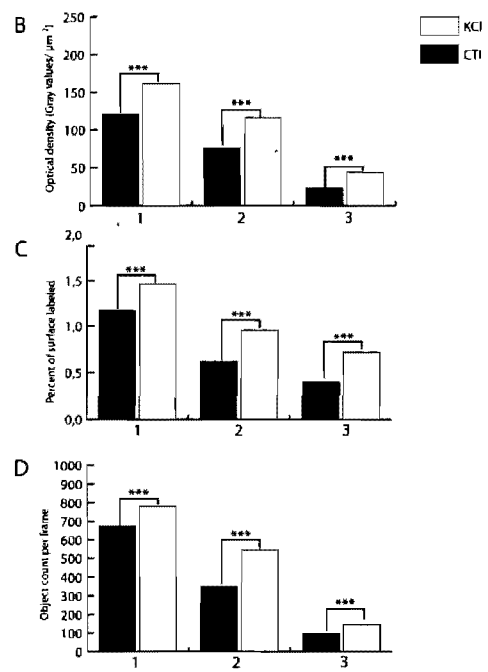
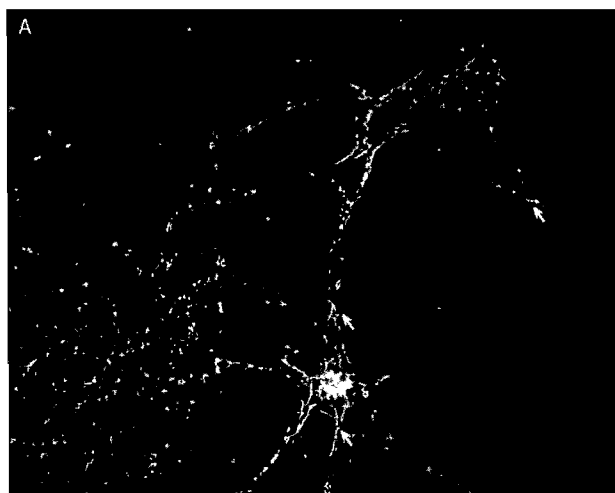


Figure 7 : Cell surface expression EphA4 is modulated by neuronal activity in DIV 15 hippocampal cultures.

A) Representative picture of cell surface EphA4 immunolabeling of non stimulated neurons. The labeling is distributed in granules along neurites and on the cell bodies (arrows). B-D) Quantitative analysis of the labeling was performed on 25 frames (each  $21\,000\ \mu\text{m}^2$ ) in each condition (control or CTI; 2 min of 90 mM KCl treatment or KCl) and in each of 3 different experiments (1, 2, 3). Labeling on cell bodies was excluded from the analysis. KCl depolarization increased the mean optical density of the EphA4 labeling (B), the mean percent surface (C), and the mean number of granules (D). Two-ways ANOVA (condition) was performed, and differences between control and KCl treatment were significant for B, C and D and for the 3 experiments (condition, \*\*\*=  $p < 0,001$ ). Comparisons of the mean difference between control and KCl showed no significant difference between the 3 experiments for any type of measurement (Two-ways ANOVA (experiment\*condition), B,  $p=0,576$ ; C,  $p=0,978$ ; D,  $p=0,368$ ).



## **Chapitre IV**

### **Discussion**

## **IV.1. Résumé de la recherche**

Nous avons présenté deux études visant à mieux définir la distribution subcellulaire de EphA4 et EphB2 dans le SNC adulte, et plus particulièrement au niveau de la synapse.

### **IV.1.1. EphA4 et EphB2: distribution pré- et post-synaptique**

Nous avons d'abord utilisé deux approches complémentaires, soient le fractionnement cellulaire et l'immunocytochimie en microscopie électronique, pour préciser la répartition subcellulaire de EphA4 et EphB2. Des différences importantes de distribution subcellulaire ont été observées entre ces deux récepteurs dans l'hippocampe et le cortex. En effet, EphA4 est majoritairement associé aux terminaisons axonales, alors que EphB2 est principalement associé aux membranes des dendrites. Néanmoins, les deux récepteurs ont été retrouvés fréquemment dans les épines. D'autre part, EphB2 a une distribution différente dans le thalamus ventro-basal, où il a été fréquemment observé dans des terminaisons axonales ; démontrant ainsi des répartitions subcellulaires variables selon les régions cérébrales pour un même récepteur de cette famille.

Le fractionnement cellulaire a permis de constater que EphA4 et EphB2 résident en quantité similaire dans différents compartiments du neurone, notamment dans les microsomes et les synaptosomes. Au niveau synaptique, les deux récepteurs se retrouvent sur les membranes extra-jonctionnelles ainsi que jonctionnelles, ces dernières étant constituées des PSD et des zones actives pré-synaptiques. Cependant, les deux récepteurs

ont montré des associations différentes avec les PSD. EphB2 en a été facilement extrait, contrairement à EphA4 ; ce qui suggère une interaction de EphA4 avec les protéines formant le coeur des PSD alors que EphB2 ne serait associé qu'à la périphérie de celles-ci. Nous avons aussi pu démontrer la présence des deux récepteurs dans la zone active et les vésicules synaptiques des terminaisons axonales ; dévoilant ainsi pour la première fois directement la localisation pré-synaptique de ces molécules. Les observations immunocytochimiques en microscopie électronique concordent également avec ces conclusions.

C'est la première fois que des récepteurs Eph sont clairement associés avec des compartiments de la terminaisons axonale, tels que les vésicules ou la zone active pré-synaptiques, celle-ci étant l'élément spécialisé de la membrane pré-synaptique où fusionnent les vésicules synaptiques pour libérer les neurotransmetteurs.

#### **IV.1.2. Association de EphA4 avec les vésicules synaptiques et vésicules à manteau de clathrine**

L'association des récepteurs EphA4 et EphB2 avec plusieurs compartiments fonctionnels des terminaisons axonales n'a jamais encore été étudiée. Nous avons ainsi choisi d'examiner plus précisément l'association de EphA4 avec les différents types de vésicules, dont les vésicules synaptiques et endocytaires, au niveau des terminaisons axonales.



L'immunocytochimie en microscopie électronique et un fractionnement, sur gradient continu de sucrose, de vésicules extraites de synaptosomes ont d'abord révélé que EphA4 apparaissait associé à différentes populations de vésicules, dont des vésicules synaptiques. Nous avons ensuite réalisé l'immunoisolation de sous-populations de vésicules synaptiques et de vésicules de transport des protéines pré-synaptiques piccolo et bassoon. Les résultats ont démontré que EphA4 était porté par des vésicules synaptiques, immunoisolées avec des anticorps anti-synaptophysine, anti-VGLUT1 ou anti-VGAT, mais absent des vésicules isolées avec un anti-Piccolo. Il apparaît ainsi que le récepteur EphA4 transite vraisemblablement par les vésicules synaptiques, et non via les PTVs, pour atteindre la zone active. Il est à noter que EphA4 n'a pas été co-immunoprécipité avec VGLUT1 et VGAT, ce qui indique que son association avec les vésicules synaptiques ne se fait pas par une interaction moléculaire directe avec ces transporteurs vésiculaires.

Notre analyse en microscopie électronique après double marquage immunocytochimique d'EphA4 et de VGLUT1 ou VGAT, dans la région CA1 de l'hippocampe de souris adulte, a démontré une localisation de ce récepteur dans les terminaisons glutamatergiques mais non dans les gabaergiques. Par contre, EphA4 était amplement colocalisé avec les deux marqueurs vésiculaires dans des neurones d'hippocampe en culture, après 15 jours *in vitro*. Cette apparente contradiction entre les observations *in situ* et *in vitro* pourrait s'expliquer par l'origine embryonnaire des neurones en culture, qui n'ont pas le même profil de développement des synapses glutamatergiques et gabaergiques (Lardi-Studler & Fritschy 2007, Anderson *et al.* 2004).

Nous avons aussi isolé et purifié une autre population de vésicules, endocytaires cette fois, les vésicules à manteau de clathrine. Celles-ci sont majoritairement responsables du recyclage du matériel des vésicules synaptiques. Nos résultats ont démontré que EphA4 est abondant aussi dans ces vésicules. C'est la première fois qu'un récepteur Eph est associé à ce type de vésicules endocytaires.

Enfin, nous avons examiné l'effet d'une intense activité électrique neuronale sur l'expression de EphA4 à la surface cellulaire. Ainsi, des neurones d'hippocampe en culture ont montré une augmentation en surface de l'aire, de l'intensité et du nombre d'agrégats immunoréactifs, tels que détectés avec un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de EphA4, en absence de détergent. L'expression en surface du récepteur serait donc modulable par l'activité synaptique ; ce qui apparaît conséquent avec une présence sur les vésicules synaptiques.

Ces observations ont permis de révéler des aspects nouveaux sur le trafic et le rôle potentiel des récepteurs Eph dans le fonctionnement pré-synaptique du SNC adulte. Une question importante sera de comprendre le rôle de EphA4 dans ces différents types de vésicules.

## **IV.2. EphA4 et EphB2 dans le fonctionnement des synapses**

Sur la base de ces observations, nous pouvons maintenant réfléchir aux rôles potentiels de EphA4 et EphB2 au niveau de la synapse.

### **IV.2.1. Fonctions ou rôles post-synaptiques**

Il apparaît maintenant pertinent de tenter de préciser ou réinterpréter certaines des données présentées dans le chapitre I de cette thèse, notamment sur EphA4 ou EphB2 au niveau post-synaptique et, plus particulièrement, des épines dendritiques, à la lumière de nos propres résultats.

#### **IV.2.1.1. EphA4, un récepteur à plusieurs compétences**

Nous avons montré que EphA4 est fréquemment localisé dans les épines dendritiques, au niveau des membranes et des PSD. Notre analyse biochimique nous a aussi révélé qu'un pool de EphA4, très insoluble, semblait attaché au coeur même des PSD ; ce qui est conséquent avec un rôle dans le fonctionnement synaptique.

La première étude proposant EphA4 comme une molécule influençant la morphologie des épines dendritiques fut celle de l'équipe de la Dre Pasquale (Murai et al. 2003) (voir le chapitre I). Le modèle proposait une signalisation modulée au niveau des épines par EphA4 activé par l'éphrine-A3, exprimée à la surface des astrocytes. Notre observation d'un pool d'EphA4 dans les membranes non jonctionnelles des épines dendritiques, en dehors des PSD, correspondrait avec un tel rôle, impliquant des interactions membranaire non synaptiques entre les épines et les prolongements astrocytaires. EphA4 régulerait aussi la morphologie des épines en affectant la signalisation contrôlée via l'intégrine- $\beta$ -1 (Bourgin et al. 2007). L'intégrine- $\beta$ -1 a été décrite sur des épines dendritiques dans plusieurs régions de l'hippocampe par immunohistochimie en

microscopie électronique (Schuster *et al.* 2001) et dans des cultures de neurones *in vitro* (Shi & Ethell 2006) mais les données ne sont pas assez précises pour les associer aux PSD. Cette voie de signalisation pourrait donc aussi être induite dans le contexte d'interaction avec l'éphrine-A3 gliale.

L'équipe du Dr Murai a aussi récemment démontré que EphA4 activé peut induire la phosphorylation de la PLC $\gamma$ 1 et, par ce biais, celle de la cofiline et la polymérisation de l'actine (Zhou *et al.* 2007). Nous avons participé à cette étude et démontré, avec les mêmes techniques de fractionnement cellulaire, que la PLC $\gamma$ 1 était présente dans les synaptosomes au niveau des membranes non jonctionnelles et jonctionnelles, aux zones actives pré-synaptiques et aux PSD. Dans toutes ces fractions, la PLC $\gamma$ 1 suivait la distribution de EphA4, et était elle aussi associée au coeur des PSD. Une autre partenaire de EphA4, la Cdk5, est aussi enrichie dans les PSD et reste associée à celles-ci, même après les traitements avec le triton X-100 et le sarcosyl (Fu *et al.* 2007). Il serait intéressant de déterminer si EphA4 activé aux densités, pourrait employer une de ces deux, ou les deux cascades de signalisation pour jouer sur la rétractation des épines dendritiques. Il restera aussi à déterminer quels seraient les facteurs favorisant l'une ou l'autre voie, et s'il y aurait une compétition ou synergie entre elles.

EphA4 pourrait aussi avoir un rôle dans le maintien de la structure et agir comme une molécule d'adhérence dans le contact synaptique, tant comme récepteur, que comme ligand d'éphrine.

#### **IV.2.1.2. EphB2 associé aux dendrites**

Nous avons aussi examiné la distribution subcellulaire de EphB2. Nos conclusions montrent que EphB2 est majoritairement dendritique dans l'hippocampe et le cortex. Il est aussi associé aux épines dendritiques, au niveau des membranes et avec des organelles non identifiées, qui pourraient être des vésicules endocytaires ou de transport. La plus grande surprise à propos de ce récepteur nous a été révélée par l'analyse biochimique montrant qu'EphB2 ne serait pas associé avec le cœur mais plutôt avec la périphérie des PSD, qui représentent le compartiment actif, où se trouvent la majorité des récepteurs NMDA et AMPA. Or, EphB2 a généralement été décrit comme un récepteur post-synaptique, et en conséquence, fut associé au fonctionnement des PSD (Buchert et al. 1999). L'interaction, rapportée par certains avec les récepteurs NMDA en fut d'ailleurs le meilleur argument (Grunwald et al. 2001, Henderson et al. 2001, Dalva et al. 2000). Ceci dit, il a été démontré que EphB2 affecterait plutôt le trafic des récepteurs NMDA et non pas leur expression (Henderson et al. 2001). De plus, l'agrégation des récepteurs EphB2 et NMDA, sous stimulation par éphrine-Fc, a été démontrée à partir d'observations sur neurones en culture, et montre une dissociation temporelle, les EphB2 s'agrégant beaucoup plus rapidement. D'autre part, ces agrégats n'ont pas été associés à un marqueur des PSD comme PSD95. Il se pourrait donc que ces mécanismes aient bien lieu en périphérie des densités ou au niveau dendritique. En effet, EphB2 avait été majoritairement observé à la surface des membranes dendritiques que ce soit dans l'hippocampe ou le cortex. EphB2 pourrait donc avoir un rôle

complémentaire à EphA4 et sa distribution différentielle pourrait donc refléter une fonction spécifique.

### **IV.3. Rôle potentiel des Eph au niveau des terminaisons axonales**

Nos résultats démontrent la présence sans équivoque des Eph en pré-synaptique, dans les terminaisons axonales de l'hippocampe et du cortex adulte. Nous les avons décrits comme étant associés à divers compartiments : la membranes plasmique, aux vésicules synaptiques, aux vésicules endocytaires à manteau de clathrine, et à la zone active. Nous allons examiner dans ce chapitre les rôles potentiels des Eph au niveau des terminaisons axonales, en associant ces résultats aux études récentes sur EphA4 et EphB2.

#### **IV.3.1 Les Eph en transit sur les vésicules synaptiques**

Nous avons démontré par plusieurs techniques l'attachement du récepteur EphA4 aux vésicules synaptiques. Cependant, cette présence, à elle seule, ne démontre pas un état fonctionnel. Il est toutefois intéressant de noter que EphA4 semble transiter par les vésicules synaptiques, et non pas par les PTVs, pour être dirigé aux zones actives. Aucune liaison avec les protéines associées à la matrice de la zone active n'a d'ailleurs été démontrée pour un Eph, même si plusieurs de ces molécules possèdent des domaines PDZ ou SAM susceptibles d'interagir avec ces récepteurs (Zhen & Jin 2004). La présence de

EphA4 et EphB2 dans la zone active pourrait ainsi simplement refléter la fusion du matériel des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique.

EphB2 a aussi été associé aux vésicules dans le thalamus ventro-basal, où il est présent en plus fortes quantités au niveau des terminaisons axonales. Une étude plus complète reste à faire pour examiner le trafic de EphB2, qui pourrait être considérablement différent à celui de EphA4, du moins au niveau de l'hippocampe et du cortex, où il a une distribution essentiellement dendritique.

Il serait cependant indispensable d'étudier le rôle des Eph dans le trafic même des vésicules à la synapse. En effet, nous avons déjà vu que EphB2 est un acteur important dans le transport dépendant des kinésines des récepteurs AMPA vers les synapses (Hoogenraad et al. 2005) par son interaction avec GRIP1 et KIF5. EphA4 pourrait jouer un rôle similaire de protéine d'accrochage sur les kinésines et pourrait aider au transport des vésicules vers la synapse. En effet, les kinésines sont aussi responsables du trafic antérograde des vésicules synaptiques vers les terminaisons dans les axones (Sato-Yoshitake *et al.* 1992, Amaratunga *et al.* 1995). Cette hypothèse serait donc à vérifier.

#### **IV.3.2. Les Eph comme molécules d'adhérence pour le maintien des synapses**

Cependant, considérant le rôle des Eph et des éphrines dans le guidage axonal et leur importance dans l'établissement des connexions synaptiques, il est envisageable que cette famille de molécules ait aussi un rôle fonctionnel dans le maintien de la synapse.

Jusqu'à présent, ce rôle a été centré sur l'action des Eph post-synaptiques sur les épines dendritiques, au niveau des synapses excitatrices. Mais nous avons vu que les combinaisons d'Eph ou d'éphrines, de part et d'autre de la synapse, sont multiples, et seraient compatibles avec un rôle de maintien structurel de la morphologie pré-synaptique par les Eph. En effet, de nombreuses molécules d'adhérence ont été montrées concentrées dans les zones actives comme les cadhérines, les neuroligines, les neurexines et les synCAMs (Rosenmund *et al.* 2003). Elles participent au maintien de la cohésion des synapses (Lardi-Studler & Fritschy 2007, Dalva *et al.* 2007). Par exemple, les neurexines en pré-synaptique, liées aux neuroligines en post-synaptique, participent à la formation des synapses excitatrices et inhibitrices (Varoqueaux *et al.* 2004, Song *et al.* 1999). Leur suppression par délétion de leurs gènes changent ainsi le nombre de synapses et la densité des épines dendritiques (Lise & El-Husseini 2006), tout comme chez les souris knockouts pour EphA4 (Murai *et al.* 2003). La présence des Eph en zone active, ainsi que leur rôle originel de molécules d'adhérence, pourraient donc les associer à une fonction similaire et complémentaire, à celles d'autres molécules d'adhérence dans la formation et le maintien de la structure des synapses.

### **IV.3.3. Rôle potentiel des Eph dans l'endocytose dépendante de la clathrine**

Nos observations indiquent que EphA4 pourrait être endocyté avec le matériel des vésicules synaptiques par les vésicules à manteau de clathrine. Cette observation n'avait jamais été faite pour un récepteur Eph.



En effet, les modes respectifs d'endocytose des couples EphA-éphrine-A ou EphB-éphrine-B décrits dans la littérature n'ont jamais été réellement caractérisés. Le mécanisme de dissociation des complexes chez les EphA-éphrines-A, par clivage de l'éphrine-A au niveau de son ancrage GPI par la métalloprotéase ADAM10 (Janes et al. 2005, Himanen et al. 2001, Himanen et al. 2004, Hattori et al. 2000), permettrait l'endocytose du complexe du côté de la cellule portant les Eph. Cependant ce système n'a pas été clairement démontré dans les neurones (Hattori et al. 2000) et est essentiellement basé sur des observations sur des fibroblastes transfectés (Janes et al. 2005). Pour les EphB, nous avons vu que l'hypothèse de « trans-endocytose » a été établie suite à deux études complémentaires (Marston et al. 2003, Zimmer et al. 2003). Le complexe EphB-éphrine-B pourrait ainsi être endocyté de part de d'autre de la synapse indépendamment de la localisation en pré- ou en post-synaptique du récepteur. Cependant la trans-endocytose des EphB n'a jamais été observée *in vivo* et en particulier au niveau des synapses. La première étude qui a montré le phénomène d'endocytose bidirectionnelle s'est basée exclusivement sur des résultats issus de cultures cellulaires (Zimmer et al. 2003). Des cellules NIH3T3 exprimant constitutivement l'éphrine-B1 ou EphB2 ont montré la capacité d'endocyter les complexes Eph-éphrines à la suite d'une stimulation avec EphB2-Fc ou l'éphrine-B1-Fc, respectivement. Des neurones télencéphaliques ont également montré cette propriété, ainsi que des neurones corticaux co-cultivés avec des cellules Hela exprimant EphB2-YFP (*Yellow Fluorescent Protein*). La deuxième étude a également conclu avec cette hypothèse à partir d'observations de fibroblastes Swiss 3T3 transfectés avec EphB4 ou l'éphrine-B2

(Marston et al. 2003). Par contre, toutes ces études confortent l'idée que les couples Eph-éphrines sont endocytés sous forme de complexes.

Les Eph ne sont pas le premier exemple de récepteurs à tyrosine kinase utilisant la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. RET (*REarranged during Transfection*) (Richardson et al. 2006), l'IGF-R (*Insulin Growth Factor Receptor*) (Monami et al. 2008), l'EGF-R (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Carter & Sorkin 1998, Jiang et al. 2003, Sorkina et al. 2002), p75 et les Trk (Bronfman et al. 2003, Zheng et al. 2008) ont tous été associés aux vésicules à manteau de clathrine. La recherche sur les récepteurs Trk a aussi démontré que le complexe récepteur-ligand internalisé était toujours actif dans les vésicules endocytées (Grimes et al. 1997, Grimes et al. 1996). Les récepteurs seraient tout d'abord internalisés dans des vésicules à clathrine, qui deviennent ensuite des endosomes capables d'induire des voies de signalisation, pendant le transport rétrograde de la synapse, vers le corps cellulaire (McPherson et al. 2001). Un processus semblable d'internalisation serait envisageable pour les vésicules portant les complexes Eph-éphrines internalisés, il serait donc indispensable de vérifier cette hypothèse qui pourrait considérablement changer la vision du rôle des Eph et éphrines.

Nous avons démontré la présence d'EphA4 dans les CCVS, il restera à déterminer si il en est de même pour EphB2. Cependant si cette découverte est originale, elle peut être rattachée à certaines études existantes impliquant des interactions entre EphA4 et EphB2, avec la machinerie d'endocytose dépendante de la clathrine.

Nous avons vu que EphB2 lorsque activé provoquait la phosphorylation de la synaptojanine-1 et régula ainsi l'endocytose dépendante de la clathrine (Irie et al. 2005). Cette fonction peut être logiquement associée à la localisation pré-synaptique du récepteur EphB2. En fait, une vésicule fusionnée après libération des neurotransmetteurs récupère son statut de vésicule synaptique en quatre étapes d'endocytose : l'assemblage d'un manteau de clathrine autour de la vésicule fusionnée, l'invagination de la membrane plasmique, la fission et la séparation du manteau de la nouvelle vésicule (Cremona & De Camilli 1997). La synaptojanine-1 est une protéine qui est aussi enrichie dans les terminaisons axonales (Haffner *et al.* 1997). Sa phosphorylation stimule les phases précoces de l'endocytose mais sa déphosphorylation est nécessaire pour les phases plus tardives (Hopper & O'Connor 2005). Elle interagit avec l'endophiline par son domaine riche en proline (PRD pour *Proline Rich Domain*) (de Heuvel *et al.* 1997, Ringstad *et al.* 1997). Cette interaction stimule son activité polyinositide phosphatase qui convertit le PIP2 en PIP (phosphatidylinositol 4-phosphate), et par ce biais promeut une déplétion locale en PIP2, ce qui cause la libération de la clathrine de la vésicule (Schuske *et al.* 2003). L'interaction avec l'endophiline est inhibée lors de la phosphorylation de son PRD induite par EphB2. Des expériences chez la drosophile ont également démontré que les mutants knockouts pour la synaptojanine-1 ont plus de zones actives par unité de surface (Dickman *et al.* 2006). EphB2 par son interaction fonctionnelle avec la synaptojanine-1 et sa présence en zone active pourrait être donc un facteur important dans les mécanismes d'endocytose, et structuraux des terminaisons synaptiques.

EphA4 ne semble pas interagir directement avec la synaptojanine-1 mais la découverte de la régulation qu'il exerce sur la Cdk5 pourrait également avoir lieu dans un contexte d'endocytose. EphA4 activé recrute la Cdk5 et l'active en la phosphorylant comme nous l'avons déjà décrit, dans un contexte de régulation des épines dendritiques et de l'actine (Fu et al. 2007). Cependant la Cdk5 est décrite également comme une protéine directement impliquée dans l'endocytose des vésicules synaptiques (Nguyen & Bibb 2003). Elle joue sur la phosphorylation de la dynamine. En effet, l'endocytose est modulée par la famille de phosphoprotéines dénommées les déphosphines, qui incluent la dynamine-I et l'amphiphysine. Ces protéines sont constamment phosphorylées et déphosphorylées en fonction de l'activité de la calcineurine pré-synaptique, phosphatase dépendante du  $Ca^{2+}$  (Cousin & Robinson 2001). Cdk5 a été identifiée comme une kinase des déphosphines dans plusieurs études complémentaires (Tomizawa *et al.* 2003, Tan *et al.* 2003, Graham *et al.* 2007). Cdk5 interagit également avec la synaptojanine-1 en collaboration avec la calcineurine, ces deux protéines jouant sur le cycle de phosphorylation de la synaptojanine-1 et donc sur son activité (Lee *et al.* 2004). EphA4 pourrait donc virtuellement et indirectement interagir avec la synaptojanine 1 et influencer le cycle endocyttaire des vésicules synaptiques.

Les multiples liens des Eph avec les phosphoinositides sont des arguments supplémentaires à leur rôle potentiel dans l'endocytose. Les phosphoinositides, notamment le PIP2, sont impliqués dans la régulation de nombreux signaux de transduction et dans la production de messagers secondaires. Leur implication est des plus importantes dans les

mécanismes de la régulation et de l'organisation du cytosquelette ainsi que dans le trafic membranaire et l'endocytose (Takenawa & Itoh 2001). Par exemple, nous avons vu que EphA4 stimulé recrute et active la PLC $\gamma$ 1 (Zhou et al. 2007) et ainsi influence la régulation de la polymérisation de l'actine par la cofiline au niveau des épines dendritiques. L'interaction entre la cofiline et la PLC $\gamma$ 1 est dépendante des phosphoinositides. La liaison de la cofiline avec le PIP2 attache la cofiline à la membrane et empêche l'enzyme PLC $\gamma$ 1 de cliver le PIP2 lorsqu'elle n'est pas phosphorylée (DesMarais *et al.* 2005). Lorsque l'enzyme est activée par un récepteur à tyrosine kinase, comme EphA4, cela promeut l'hydrolyse du PIP2 en IP3 et DAG (Rebecchi & Pentylala 2000). L'endocytose par la clathrine est dépendante de la liaison de plusieurs protéines avec le PIP2. L'assemblage des membranes vésiculaires avec le manteau de clathrine est dépendant de l'AP-2, complexe tétramérique qui se lie à la clathrine. La liaison de AP-2 avec le PIP2 stabilise son interaction avec les membranes (Gaidarov & Keen 1999). Les phases d'invagination et de séparation de la membrane plasmique sont gérées par la dynamine, l'endophiline et la synaptojanine dont l'activité et la liaison dépendent aussi du PIP2, tout comme de nombreuses protéines accessoires. La PLC $\gamma$ 1 est également présente dans des compartiments pré-synaptiques aussi bien dans les fractions enrichies en vésicules synaptiques qu'en zone active pré-synaptique. La liaison EphA4-PLC $\gamma$ 1 pourrait donc influencer la balance de PIP2 dans ce compartiment et ainsi l'endocytose dépendante de la clathrine.

## **IV. 4. EphA4 et EphB2 dans l'activité synaptique**

Nous avons vu, en introduction, que plusieurs études concluaient à un rôle pour EphA4 ou EphB2 dans l'activité synaptique. Nos résultats permettent une relecture de ces études et permettent d'ouvrir d'autres hypothèses quant à leur interprétation.

### **IV.4.1. EphA4 aux synapses excitatrices et inhibitrices.**

Nos résultats ont montré une colocalisation de EphA4 avec VGLUT1 et VGAT dans les cultures de neurones et sur des vésicules immuno-isolées, associant pour la première fois le récepteur tant aux synapses inhibitrices qu'excitatrices. Toutefois, l'examen de EphA4 en microscopie électronique au niveau du CA1 de l'hippocampe de souris adulte n'a démontré sa présence que dans des terminaisons VGLUT1-positives. Ces données nous laissent penser que l'association de EphA4 avec les synapses excitatrices dépend du stade de développement, de l'environnement (*in vitro* contre *in vivo*) ou de la région étudiée.

Les synapses inhibitrices et excitatrices sont physiologiquement et morphologiquement différentes (Lardi-Studler & Fritschy 2007). Structurellement, les synapses excitatrices sont caractérisées par une densité post-synaptique proéminente, apparaissant dense en microscopie électronique, et sont dites asymétriques ou de type I contrairement aux synapses inhibitrices qui possèdent des PSD étroites et sont nommées symétriques de type II. Les synapses excitatrices et inhibitrices sont aussi localisées dans

des régions subcellulaires différentes des neurones, soient, respectivement, les épines d'une part, et les troncs dendritiques, le corps cellulaire et le fragment initial de l'axone, d'autre part. Il serait d'ailleurs intéressant, dans un rôle potentiel de la famille des Eph dans la synaptogenèse, d'associer les distributions subcellulaires des Eph et des éphrines aux distributions des différents types de synapses. Dans l'hypothèse d'une implication des Eph dans le trafic vésiculaire et l'endocytose, comme énoncé plus haut, la signalisation Eph-éphrines pourrait influencer l'activité des deux types de synapses et, en conséquence, leur plasticité.

#### **IV.4.2 Liens avec la LTP et la LTD revisités**

Le modèle de plasticité synaptique le plus étudié est celui de la LTP dépendante du récepteur NMDA dans le CA1 et le CA3 de l'hippocampe. La plasticité modulée par la partie pré-synaptique est dépendante de la libération des neurotransmetteurs, alors que la plasticité modulée par la partie post-synaptique est dépendante du changement du nombre et des propriétés des récepteurs aux PSD. Il est généralement accepté que la LTP NMDA soit d'origine post-synaptique.

Ainsi la présence des récepteurs Eph en pré- ou post-synaptique devrait être déterminante dans les effets observés dans certains types de LTP ou LTD.

L'étude menée par A. Contractor et coll. (Contractor et al. 2002) portait sur la LTP aux synapses des fibres moussues avec les cellules pyramidales en CA3. Cette forme de LTP est supposée être indépendante du NMDA et donc d'origine pré-synaptique. L'étude a,

entre autres, pris parti d'infuser des formes solubles d'éphrine-Fc ou d'Eph-Fc au niveau des fibres moussues, avec pour hypothèse de départ, une présence uniquement post-synaptique des récepteurs EphB et pré-synaptique des éphrines. L'expression de l'éphrine-B3 au niveau des fibres moussues a été confirmée (Armstrong et al. 2006, Rodenas-Ruano *et al.* 2006). Cependant, nous avons aussi démontré que EphA4, qui se lie à l'éphrine-B3, était fortement exprimé dans les fibres moussues (Tremblay et al. 2007), ce qui ajoute une complexité supplémentaire à l'interprétation de ces résultats. En effet, la localisation de EphA4 dans les fibres moussues rend la présence d'autres éphrines-A ou -B en post-synaptique probable. D'autre part, les éphrines-B2 et -B3 ont déjà été localisées dans les PSD au niveau du CA1 (Grunwald et al. 2004). Cette équipe a démontré des déficits de LTP et de LTD en CA1 chez des souris doubles knockouts pour ces deux éphrines, et de même que chez des souris EphA4<sup>-/-</sup>. Ces observations indiquent donc un rôle probable pour EphA4 au niveau des terminaisons pré-synaptiques, en partenariat avec les éphrines-B2 et -B3 post-synaptiques en CA1.

Il existe encore un paradoxe au niveau des fibres moussues (Gutierrez 2005). Celles ci ont été longtemps considérées comme glutamatergiques, leurs terminaisons exprimant une forte quantité de glutamate, et l'expression de VGLUT1 y étant démontrée (Fremeau *et al.* 2001). La stimulation des fibres moussues provoque une réponse induite par les récepteurs au glutamate, en post-synaptique. Cependant les fibres moussues contiennent également du GABA et la GAD (*Glutamic Acid Decarboxylase*) (Bergersen *et al.* 2003). Cette hypothèse a été appuyée par des preuves électrophysiologiques et pharmacologiques



(Gutierrez 2002, Vivar & Gutierrez 2005). Bien que le marquage VGAT n'ait pas encore été observé dans les fibres moussues, une expression de son ARNm y a été détecté (Lamas *et al.* 2001). Cependant il a été envisagé qu'un autre transporteur vésiculaire serait utilisé pour le remplissage du GABA dans les vésicules. EphA4 est aussi présent dans les fibres moussues, notamment dans les vésicules synaptiques, probablement VGLUT1 positives. Dans un cas de figure, où l'absence de EphA4 entraînerait des défauts au niveau du cycle vésiculaire glutamatergique, la libération de neurotransmetteurs pourrait être biaisée en faveur du GABA et provoquer des différences de signal. La relâche de GABA par les fibres moussues est aujourd'hui encore sujet à controverse (Uchigashima *et al.* 2007). De plus, Il a été démontré que VGLUT1 interagissait de façon directe avec l'endophiline (Voglmaier *et al.* 2006) et le blocage de cette interaction provoquerait un recyclage ralenti lors des stimulations à hautes fréquences. Dans l'hypothèse où EphA4 jouerait sur le trafic des vésicules synaptiques ou sur l'endocytose, les souris EphA4 *-/-* pourraient avoir des troubles de transmission provoqués par un cycle vésiculaire doublement perturbé.

Nous avons aussi démontré que l'expression de EphA4 à la surface membranaire pouvait être modulée par l'activité neuronale *in vitro*. L'augmentation du marquage de la partie extracellulaire de EphA4 en surface pourrait être la conséquence de la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. Ainsi une expression maintenue du récepteur à la zone active en période d'activité pourrait permettre à EphA4 de participer à la plasticité synaptique. Beaucoup de travail de recherche reste cependant à entreprendre

avant de comprendre la fonction exacte des récepteurs Eph dans les phénomènes de LTP et LTD.

## **IV. 5. Bilan et avenues de recherche**

### **IV.5.1. Les Eph en pré-synaptique : un travail de recherche pertinent à continuer**

Notre étude a ainsi permis de changer le point de vue général sur les Eph, en associant EphA4 et EphB2 aux terminaisons synaptiques et, notamment à des compartiments précis, comme la zone active et à des organelles fonctionnelles comme les vésicules synaptiques et les vésicules endocytaires à manteau de clathrine pour EphA4. Ces associations amènent de nouvelles questions quant à leur rôle précis dans l'activité et la plasticité synaptique.

Nous avons ainsi commencé à observer des changements d'expression en surface de EphA4 lors de l'activité neuronale en culture, avec une augmentation du marquage avec l'anticorps dirigé contre la partie extracellulaire de EphA4 après stimulation de la libération des neurotransmetteurs. Une collaboration avec l'équipe du Dr Timothy Kennedy devrait nous permettre de réaliser des expériences de biotinylation de EphA4 sur des cultures en conditions stimulées ou non stimulées. Dans ce principe, le récepteur en surface est biotinylé et ensuite précipité par des billes streptavidine. Il serait ainsi possible de comparer le ratio de EphA4 en surface dans ces deux conditions. L'analyse de la quantité de

récepteurs biotinylés dans chaque condition devrait concorder avec nos résultats précédents et privilégier une variation de l'expression de EphA4 dépendante de l'activité neuronale.

Il serait aussi envisageable d'étudier le rôle du récepteur sur la libération des neurotransmetteurs ou sur l'endocytose en jouant sur son expression, en le supprimant par des systèmes plasmidiques dans des neurones, ou dans des modèles de tranches hippocampiques en culture, ou en l'inhibant par l'utilisation d'ARN interférant.

L'étude des protéines interagissant avec EphA4 au niveau des vésicules synaptiques et endocytaires est primordiale. Ainsi nous avons commencé à séparer les différents complexes protéiques associés à EphA4 par des techniques d'électrophorèse en « Blue Native » sur gels non dénaturants. Nous avons ainsi pu observer l'apparition de plusieurs complexes de hauts poids moléculaires dans la fraction LP2. Notre équipe cherchera par la suite à isoler ces complexes en les découpant du gel et en les envoyant en spectrométrie de masse. Cette technique nous permettra d'isoler des candidats potentiels. Il nous faudra ensuite réaliser des séries de co-immunoprécipitations pour analyser la présence ou non des candidats dans les complexes EphA4.

#### **IV.5.2. Perspectives pathologiques**

Les Eph et les éphrines ne sont pas seulement exprimés dans le SNC, mais aussi dans de nombreux tissus. Ils participent, par exemple, à l'angiogenèse (Kuijper *et al.* 2007). Ces molécules sont également très étudiées dans les thématiques de recherche contre le cancer (Surawska *et al.* 2004).

De par nos connaissances actuelles il est aisé de considérer le rôle potentiel des Eph dans certaines neuropathologies. Les Eph sont impliqués dans l'établissement et l'organisation du SNC, et, chez l'adulte, dans la formation des synapses et leur maintien. Une expression défectueuse des Eph dans l'organisme garantirait donc de nombreuses dysfonctions qui pourraient conduire à des maladies cognitives et psychiatriques. De plus, de nombreux gènes codant pour les Eph et les éphrines sont situés dans des régions chromosomiques qui ont été elles mêmes associées à des susceptibilités de nombreux désordres mentaux comme l'autisme, la schizophrénie, l'épilepsie, la dyslexie et les désordres bipolaires (Cowan *et al.* 2002, Fisher & DeFries 2002, Grigorenko *et al.* 2001, Noebels 2003). Plusieurs de ces troubles neurologiques sont d'ailleurs associés à des anomalies au niveau de la forme des épines dendritiques ou à la libération anormale de neurotransmetteur (Fiala *et al.* 2002). Dans les années à venir, il sera donc nécessaire de promouvoir une recherche efficace sur cette famille de protéines aux multiples fonctions et dont la compréhension serait un atout majeur à la médecine.

## Conclusion

Cette étude permet ainsi d'appréhender la recherche sur les Eph d'un nouveau point de vue. Alors qu'ils ont été longuement considérés comme des récepteurs post-synaptiques à la synapse mature, nous avons démontré grâce à de nombreuses techniques de biochimie et d'immunocytochimie, la présence sans équivoque et en forte proportion des récepteurs EphA4 et EphB2 dans les terminaisons axonales. Ces récepteurs ont été nouvellement

associés à divers compartiments pré-synaptiques, comme la zone active et les vésicules. Une étude plus complète sur EphA4 nous a permis de l'associer aux vésicules synaptiques chargées en neurotransmetteur et aux vésicules d'endocytose à manteau de clathrine. La présence de ces récepteurs à tyrosine kinase dans ces vésicules ouvre un nouveau chapitre sur la recherche des Eph en particulier dans leur rôle dans l'activité neuronale et leur fonction dans l'endocytose dépendante de la clathrine.

## Bibliographie

- Ahmari, S. E., Buchanan, J. and Smith, S. J. (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci*, **3**, 445-451.
- Amaratunga, A., Leeman, S. E., Kosik, K. S. and Fine, R. E. (1995) Inhibition of kinesin synthesis in vivo inhibits the rapid transport of representative proteins for three transport vesicle classes into the axon. *J Neurochem*, **64**, 2374-2376.
- Anderson, T. R., Shah, P. A. and Benson, D. L. (2004) Maturation of glutamatergic and GABAergic synapse composition in hippocampal neurons. *Neuropharmacology*, **47**, 694-705.
- Aoki, M., Yamashita, T. and Tohyama, M. (2004) EphA receptors direct the differentiation of mammalian neural precursor cells through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*, **279**, 32643-32650.
- Armstrong, J. N., Saganich, M. J., Xu, N. J., Henkemeyer, M., Heinemann, S. F. and Contractor, A. (2006) B-ephrin reverse signaling is required for NMDA-independent long-term potentiation of mossy fibers in the hippocampus. *J Neurosci*, **26**, 3474-3481.
- Bamburg, J. R. (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 185-230.
- Beg, A. A., Sommer, J. E., Martin, J. H. and Scheiffele, P. (2007) alpha2-Chimaerin is an essential EphA4 effector in the assembly of neuronal locomotor circuits. *Neuron*, **55**, 768-778.
- Bergemann, A. D., Cheng, H. J., Brambilla, R., Klein, R. and Flanagan, J. G. (1995) ELF-2, a new member of the Eph ligand family, is segmentally expressed in mouse

- embryos in the region of the hindbrain and newly forming somites. *Molecular and cellular biology*, **15**, 4921-4929.
- Bergersen, L., Ruiz, A., Bjaalie, J. G., Kullmann, D. M. and Gundersen, V. (2003) GABA and GABAA receptors at hippocampal mossy fibre synapses. *Eur J Neurosci*, **18**, 931-941.
- Binns, K. L., Taylor, P. P., Sicheri, F., Pawson, T. and Holland, S. J. (2000) Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. *Mol Cell Biol*, **20**, 4791-4805.
- Bourgin, C., Murai, K. K., Richter, M. and Pasquale, E. B. (2007) The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting beta1-integrin signaling pathways. *J Cell Biol*, **178**, 1295-1307.
- Bouton, A. H., Riggins, R. B. and Bruce-Staskal, P. J. (2001) Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and the determination of cellular responses. *Oncogene*, **20**, 6448-6458.
- Bronfman, F. C., Tcherpakov, M., Jovin, T. M. and Fainzilber, M. (2003) Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome. *J Neurosci*, **23**, 3209-3220.
- Brown, A., Yates, P. A., Burrola, P., Ortuno, D., Vaidya, A., Jessell, T. M., Pfaff, S. L., O'Leary, D. D. and Lemke, G. (2000) Topographic mapping from the retina to the

midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling. *Cell*, **102**, 77-88.

- Buchert, M., Schneider, S., Meskenaite, V., Adams, M. T., Canaani, E., Baechi, T., Moelling, K. and 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.
- Bundesen, L. Q., Scheel, T. A., Bregman, B. S. and Kromer, L. F. (2003) Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J Neurosci*, **23**, 7789-7800.
- Carter, R. E. and Sorkin, A. (1998) Endocytosis of functional epidermal growth factor receptor-green fluorescent protein chimera. *J Biol Chem*, **273**, 35000-35007.
- Chin-Sang, I. D., George, S. E., Ding, M., Moseley, S. L., Lynch, A. S. and Chisholm, A. D. (1999) The ephrin VAB-2/EFN-1 functions in neuronal signaling to regulate epidermal morphogenesis in *C. elegans*. *Cell*, **99**, 781-790.
- Cho, K. O., Hunt, C. A. and Kennedy, M. B. (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, **9**, 929-942.
- Conover, J. C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D. and Alvarez-Buylla, A. (2000) Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci*, **3**, 1091-1097.



- Contractor, A., Rogers, C., Maron, C., Henkemeyer, M., Swanson, G. T. and Heinemann, S. F. (2002) Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science*, **296**, 1864-1869.
- Cousin, M. A. and Robinson, P. J. (2001) The dephosphins: dephosphorylation by calcineurin triggers synaptic vesicle endocytosis. *Trends Neurosci*, **24**, 659-665.
- Cowan, C. W., Shao, Y. R., Sahin, M. et al. (2005) Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron*, **46**, 205-217.
- Cowan, W. M., Kopnisky, K. L. and Hyman, S. E. (2002) The human genome project and its impact on psychiatry. *Annu Rev Neurosci*, **25**, 1-50.
- Cremona, O. and De Camilli, P. (1997) Synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol*, **7**, 323-330.
- Dalva, M. B. (2007) There's more than one way to skin a chimaerin. *Neuron*, **55**, 681-684.
- Dalva, M. B., McClelland, A. C. and Kayser, M. S. (2007) Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 206-220.
- Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W. and Greenberg, M. E. (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell*, **103**, 945-956.
- Davis, S., Gale, N. W., Aldrich, T. H., Maisonpierre, P. C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M. and Yancopoulos, G. D. (1994) Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science*, **266**, 816-819.

- Davy, A., Gale, N. W., Murray, E. W., Klinghoffer, R. A., Soriano, P., Feuerstein, C. and 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. and Robbins, S. M. (2000) Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *Embo J*, **19**, 5396-5405.
- de Heuvel, E., Bell, A. W., Ramjaun, A. R., Wong, K., Sossin, W. S. and McPherson, P. S. (1997) Identification of the major synaptojanin-binding proteins in brain. *J Biol Chem*, **272**, 8710-8716.
- DesMarais, V., Ghosh, M., Eddy, R. and Condeelis, J. (2005) Cofilin takes the lead. *J Cell Sci*, **118**, 19-26.
- Dickman, D. K., Lu, Z., Meinertzhagen, I. A. and Schwarz, T. L. (2006) Altered synaptic development and active zone spacing in endocytosis mutants. *Curr Biol*, **16**, 591-598.
- Dodelet, V. C., Pazzagli, C., Zisch, A. H., Hauser, C. A. and Pasquale, E. B. (1999) A novel signaling intermediate, SHEP1, directly couples Eph receptors to R-Ras and Rap1A. *J Biol Chem*, **274**, 31941-31946.
- Donoghue, M. J. and Rakic, P. (1999) Molecular evidence for the early specification of presumptive functional domains in the embryonic primate cerebral cortex. *J Neurosci*, **19**, 5967-5979.

- Dottori, M., Hartley, L., Galea, M. et al. (1998) EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13248-13253.
- Dresbach, T., Torres, V., Wittenmayer, N. et al. (2006) Assembly of active zone precursor vesicles: obligatory trafficking of presynaptic cytomatrix proteins Bassoon and Piccolo via a trans-Golgi compartment. *J Biol Chem*, **281**, 6038-6047.
- Drescher, U. (2002) Eph family functions from an evolutionary perspective. *Current opinion in genetics & development*, **12**, 397-402.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M. and 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.
- Ellis, C., Kasmi, F., Ganju, P., Walls, E., Panayotou, G. and Reith, A. D. (1996) A juxtamembrane autophosphorylation site in the Eph family receptor tyrosine kinase, Sek, mediates high affinity interaction with p59fyn. *Oncogene*, **12**, 1727-1736.
- Elowe, S., Holland, S. J., Kulkarni, S. and Pawson, T. (2001) Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction. *Mol Cell Biol*, **21**, 7429-7441.
- Eph Nomenclature Committee (1997) Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell*, **90**, 403-404.

- Ethell, I. M., Irie, F., Kalo, M. S., Couchman, J. R., Pasquale, E. B. and Yamaguchi, Y. (2001) EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, **31**, 1001-1013.
- Ethell, I. M. and Pasquale, E. B. (2005) Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol*, **75**, 161-205.
- Ethell, I. M. and Yamaguchi, Y. (1999) Cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 induces the maturation of dendritic spines in rat hippocampal neurons. *J Cell Biol*, **144**, 575-586.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629-635.
- Feldheim, D. A., Nakamoto, M., Osterfield, M., Gale, N. W., DeChiara, T. M., Rohatgi, R., Yancopoulos, G. D. and Flanagan, J. G. (2004) Loss-of-function analysis of EphA receptors in retinotectal mapping. *J Neurosci*, **24**, 2542-2550.
- Feldheim, D. A., Vanderhaeghen, P., Hansen, M. J., Frisen, J., Lu, Q., Barbacid, M. and Flanagan, J. G. (1998) Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron*, **21**, 1303-1313.
- Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V. and Harris, K. M. (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci*, **18**, 8900-8911.
- Fiala, J. C., Spacek, J. and Harris, K. M. (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*, **39**, 29-54.

- Fisher, S. E. and DeFries, J. C. (2002) Developmental dyslexia: genetic dissection of a complex cognitive trait. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 767-780.
- Flanagan, J. G. and Vanderhaeghen, P. (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci*, **21**, 309-345.
- Fremeau, R. T., Jr., Troyer, M. D., Pahner, I. et al. (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron*, **31**, 247-260.
- Fu, W. Y., Chen, Y., Sahin, M. et al. (2007) Cdk5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism. *Nat Neurosci*, **10**, 67-76.
- Gaidarov, I. and Keen, J. H. (1999) Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol*, **146**, 755-764.
- Gale, N. W., Holland, S. J., Valenzuela, D. M. et al. (1996) Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron*, **17**, 9-19.
- Garcia-Junco-Clemente, P., Linares-Clemente, P. and Fernandez-Chacon, R. (2005) Active zones for presynaptic plasticity in the brain. *Mol Psychiatry*, **10**, 185-200; image 131.
- George, S. E., Simokat, K., Hardin, J. and Chisholm, A. D. (1998) The VAB-1 Eph receptor tyrosine kinase functions in neural and epithelial morphogenesis in *C. elegans*. *Cell*, **92**, 633-643.

- Gerlai, R., Shinsky, N., Shih, A. et al. (1999) Regulation of learning by EphA receptors: a protein targeting study. *J Neurosci*, **19**, 9538-9549.
- Gerlai, R., Williams, S. P., Cairns, B. et al. (1998) Protein targeting in the analysis of learning and memory: a potential alternative to gene targeting. *Exp Brain Res*, **123**, 24-35.
- Girault, J. A., Costa, A., Derkinderen, P., Studler, J. M. and Toutant, M. (1999) FAK and PYK2/CAKbeta in the nervous system: a link between neuronal activity, plasticity and survival? *Trends Neurosci*, **22**, 257-263.
- Graham, M. E., Anggono, V., Bache, N., Larsen, M. R., Craft, G. E. and Robinson, P. J. (2007) The in vivo phosphorylation sites of rat brain dynamin I. *J Biol Chem*, **282**, 14695-14707.
- Grigorenko, E. L., Wood, F. B., Meyer, M. S., Pauls, J. E., Hart, L. A. and Pauls, D. L. (2001) Linkage studies suggest a possible locus for developmental dyslexia on chromosome 1p. *Am J Med Genet*, **105**, 120-129.
- Grimes, M. L., Beattie, E. and Mobley, W. C. (1997) A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9909-9914.
- Grimes, M. L., Zhou, J., Beattie, E. C. et al. (1996) Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci*, **16**, 7950-7964.

- Grunwald, I. C., Korte, M., Adelman, G., Plueck, A., Kullander, K., Adams, R. H., Frotscher, M., Bonhoeffer, T. and 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. and Klein, R. (2001) Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **32**, 1027-1040.
- Gu, J. and Gu, X. (2003) Natural history and functional divergence of protein tyrosine kinases. *Gene*, **317**, 49-57.
- Gutierrez, R. (2002) Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers in vitro. *J Neurophysiol*, **87**, 2562-2570.
- Gutierrez, R. (2005) The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. *Trends Neurosci*, **28**, 297-303.
- Haffner, C., Takei, K., Chen, H., Ringstad, N., Hudson, A., Butler, M. H., Salcini, A. E., Di Fiore, P. P. and De Camilli, P. (1997) Synaptojanin 1: localization on coated endocytic intermediates in nerve terminals and interaction of its 170 kDa isoform with Eps15. *FEBS Lett*, **419**, 175-180.
- Hansen, M. J., Dallal, G. E. and Flanagan, J. G. (2004) Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron*, **42**, 717-730.

- Harris, E. W. and Cotman, C. W. (1986) Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett*, **70**, 132-137.
- Harris, K. M. (1999) Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, **9**, 343-348.
- Hattori, M., Osterfield, M. and Flanagan, J. G. (2000) Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science*, **289**, 1360-1365.
- Henderson, J. T., Georgiou, J., Jia, Z., Robertson, J., Elowe, S., Roder, J. C. and Pawson, T. (2001) The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron*, **32**, 1041-1056.
- Henkemeyer, M., Itkis, O. S., Ngo, M., Hickmott, P. W. and Ethell, I. 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. and Pawson, T. (1994) Immunolocalization of the Nuk receptor tyrosine kinase suggests roles in segmental patterning of the brain and axonogenesis. *Oncogene*, **9**, 1001-1014.
- Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J. T., Saxton, T. M., Roder, J., Pawson, T. and Klein, R. (1996) Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell*, **86**, 35-46.



- Himanen, J. P., Chumley, M. J., Lackmann, M. et al. (2004) Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci*, **7**, 501-509.
- Himanen, J. P. and Nikolov, D. B. (2003) Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 130-134.
- Himanen, J. P., Rajashankar, K. R., Lackmann, M., Cowan, C. A., Henkemeyer, M. and Nikolov, D. B. (2001) Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature*, **414**, 933-938.
- Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M. and O'Leary, D. D. (2002) EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron*, **35**, 475-487.
- Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J. and Takaku, F. (1987) A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science*, **238**, 1717-1720.
- Holland, S. J., Gale, N. W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G. D., Henkemeyer, M. and Pawson, T. (1996) Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature*, **383**, 722-725.
- Holmberg, J., Armulik, A., Senti, K. A., Edoff, K., Spalding, K., Momma, S., Cassidy, R., Flanagan, J. G. and Frisen, J. (2005) Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev*, **19**, 462-471.
- Holmberg, J., Clarke, D. L. and Frisen, J. (2000) Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature*, **408**, 203-206.

- Hoogenraad, C. C., Milstein, A. D., Ethell, I. M., Henkemeyer, M. and Sheng, M. (2005) GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat Neurosci*, **8**, 906-915.
- Hopper, N. A. and O'Connor, V. (2005) Ephrin tempers two-faced synaptojanin 1. *Nat Cell Biol*, **7**, 454-456.
- Hsueh, Y. P., Yang, F. C., Kharazia, V., Naisbitt, S., Cohen, A. R., Weinberg, R. J. and Sheng, M. (1998) Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. *J Cell Biol*, **142**, 139-151.
- Huai, J. and 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.
- Hubbard, S. R. (2001) Theme and variations: juxtamembrane regulation of receptor protein kinases. *Mol Cell*, **8**, 481-482.
- Irie, F., Okuno, M., Pasquale, E. B. and Yamaguchi, Y. (2005) EphrinB-EphB signalling regulates clathrin-mediated endocytosis through tyrosine phosphorylation of synaptojanin 1. *Nat Cell Biol*, **7**, 501-509.
- Irie, F. and Yamaguchi, Y. (2002) EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci*, **5**, 1117-1118.

- Iwasato, T., Katoh, H., Nishimaru, H. et al. (2007) Rac-GAP alpha-chimerin regulates motor-circuit formation as a key mediator of EphrinB3/EphA4 forward signaling. *Cell*, **130**, 742-753.
- Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A. et al. (2005) Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*, **123**, 291-304.
- Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A. and Sorkin, A. (2003) Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell*, **14**, 858-870.
- Kalo, M. S. and Pasquale, E. B. (1999) Multiple in vivo tyrosine phosphorylation sites in EphB receptors. *Biochemistry*, **38**, 14396-14408.
- Kim, E. and Sheng, M. (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 771-781.
- Knoll, B. and Drescher, U. (2002) Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci*, **25**, 145-149.
- Knoll, B., Isenmann, S., Kilic, E., Walkenhorst, J., Engel, S., Wehinger, J., Bahr, M. and Drescher, U. (2001) Graded expression patterns of ephrin-As in the superior colliculus after lesion of the adult mouse optic nerve. *Mech Dev*, **106**, 119-127.
- Kuijper, S., Turner, C. J. and Adams, R. H. (2007) Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med*, **17**, 145-151.
- Kullander, K. and Klein, R. (2002) Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 475-486.

- Kullander, K., Mather, N. K., Diella, F., Dottori, M., Boyd, A. W. and Klein, R. (2001) Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo. *Neuron*, **29**, 73-84.
- Lamas, M., Gomez-Lira, G. and Gutierrez, R. (2001) Vesicular GABA transporter mRNA expression in the dentate gyrus and in mossy fiber synaptosomes. *Brain Res Mol Brain Res*, **93**, 209-214.
- Lardi-Studler, B. and Fritschy, J. M. (2007) Matching of pre- and postsynaptic specializations during synaptogenesis. *Neuroscientist*, **13**, 115-126.
- Lau, L. F. and Huganir, R. L. (1995) Differential tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem*, **270**, 20036-20041.
- Lee, S. Y., Wenk, M. R., Kim, Y., Nairn, A. C. and De Camilli, P. (2004) Regulation of synaptojanin 1 by cyclin-dependent kinase 5 at synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 546-551.
- Li, Z. and Sheng, M. (2003) Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 833-841.
- Liebl, D. J., Morris, C. J., Henkemeyer, M. and 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.
- Lin, D., Gish, G. D., Songyang, Z. and Pawson, T. (1999) The carboxyl terminus of B class ephrins constitutes a PDZ domain binding motif. *J Biol Chem*, **274**, 3726-3733.

- Lise, M. F. and El-Husseini, A. (2006) The neuroligin and neurexin families: from structure to function at the synapse. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 1833-1849.
- Marston, D. J., Dickinson, S. and Nobes, C. D. (2003) Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol*, **5**, 879-888.
- Martone, M. E., Holash, J. A., Bayardo, A., Pasquale, E. B. and Ellisman, M. H. (1997) Immunolocalization of the receptor tyrosine kinase EphA4 in the adult rat central nervous system. *Brain Res*, **771**, 238-250.
- McLaughlin, T., Hindges, R., Yates, P. A. and O'Leary, D. D. (2003) Bifunctional action of ephrin-B1 as a repellent and attractant to control bidirectional branch extension in dorsal-ventral retinotopic mapping. *Development*, **130**, 2407-2418.
- McLaughlin, T. and O'Leary, D. D. (2005) Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annu Rev Neurosci*, **28**, 327-355.
- McPherson, P. S., Garcia, E. P., Slepnev, V. I. et al. (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, **379**, 353-357.
- McPherson, P. S., Kay, B. K. and Hussain, N. K. (2001) Signaling on the endocytic pathway. *Traffic*, **2**, 375-384.
- Meima, L., Kljavin, I. J., Moran, P., Shih, A., Winslow, J. W. and Caras, I. W. (1997) AL-1-induced growth cone collapse of rat cortical neurons is correlated with REK7 expression and rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur J Neurosci*, **9**, 177-188.
- Merlos-Suarez, A. and Battle, E. (2008) Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol*.

- Mohamed, A. M. and Chin-Sang, I. D. (2006) Characterization of loss-of-function and gain-of-function Eph receptor tyrosine kinase signaling in *C. elegans* axon targeting and cell migration. *Developmental biology*, **290**, 164-176.
- Monami, G., Emiliozzi, V. and Morrione, A. (2008) Grb10/Nedd4-mediated multiubiquitination of the insulin-like growth factor receptor regulates receptor internalization. *J Cell Physiol*.
- Moore, K. B., Mood, K., Daar, I. O. and Moody, S. A. (2004) Morphogenetic movements underlying eye field formation require interactions between the FGF and ephrinB1 signaling pathways. *Dev Cell*, **6**, 55-67.
- Murai, K. K., Nguyen, L. N., Irie, F., Yamaguchi, Y. and Pasquale, E. B. (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci*, **6**, 153-160.
- Nakata, T., Terada, S. and Hirokawa, N. (1998) Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J Cell Biol*, **140**, 659-674.
- Nestor, M. W., Mok, L. P., Tulapurkar, M. E. and Thompson, S. M. (2007) Plasticity of Neuron-Glial Interactions Mediated by Astrocytic EphARs. *J Neurosci*, **27**, 12817-12828.
- Nguyen, C. and Bibb, J. A. (2003) Cdk5 and the mystery of synaptic vesicle endocytosis. *J Cell Biol*, **163**, 697-699.
- Noebels, J. L. (2003) The biology of epilepsy genes. *Annu Rev Neurosci*, **26**, 599-625.

- O'Neill, G. M., Fashena, S. J. and Golemis, E. A. (2000) Integrin signalling: a new Cas(t) of characters enters the stage. *Trends Cell Biol*, **10**, 111-119.
- Orioli, D., Henkemeyer, M., Lemke, G., Klein, R. and Pawson, T. (1996) Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *Embo J*, **15**, 6035-6049.
- Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K. S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U. and Klein, R. (2002) EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell*, **9**, 725-737.
- Park, S., Frisen, J. and Barbacid, M. (1997) Aberrant axonal projections in mice lacking EphA8 (Eek) tyrosine protein kinase receptors. *Embo J*, **16**, 3106-3114.
- Pasquale, E. B., Deerinck, T. J., Singer, S. J. and Ellisman, M. H. (1992) Cek5, a membrane receptor-type tyrosine kinase, is in neurons of the embryonic and postnatal avian brain. *J Neurosci*, **12**, 3956-3967.
- Penzes, P., Beeser, A., Chernoff, J., Schiller, M. R., Eipper, B. A., Mains, R. E. and 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.
- Petros, T. J., Williams, S. E. and Mason, C. A. (2006) Temporal regulation of EphA4 in astroglia during murine retinal and optic nerve development. *Mol Cell Neurosci*, **32**, 49-66.

- Phillips, G. R., Huang, J. K., Wang, Y. et al. (2001) The presynaptic particle web: ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. *Neuron*, **32**, 63-77.
- Qiao, F. and Bowie, J. U. (2005) The many faces of SAM. *Sci STKE*, **2005**, re7.
- Rebecchi, M. J. and Pentylala, S. N. (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev*, **80**, 1291-1335.
- Richardson, D. S., Lai, A. Z. and Mulligan, L. M. (2006) RET ligand-induced internalization and its consequences for downstream signaling. *Oncogene*, **25**, 3206-3211.
- Ringstad, N., Nemoto, Y. and De Camilli, P. (1997) The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8569-8574.
- Rodenas-Ruano, A., Perez-Pinzon, M. A., Green, E. J., Henkemeyer, M. and Liebl, D. J. (2006) Distinct roles for ephrinB3 in the formation and function of hippocampal synapses. *Dev Biol*, **292**, 34-45.
- Rosenmund, C., Rettig, J. and Brose, N. (2003) Molecular mechanisms of active zone function. *Curr Opin Neurobiol*, **13**, 509-519.
- Sahin, M., Greer, P. L., Lin, M. Z. et al. (2005) Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron*, **46**, 191-204.
- Sato-Yoshitake, R., Yorifuji, H., Inagaki, M. and Hirokawa, N. (1992) The phosphorylation of kinesin regulates its binding to synaptic vesicles. *J Biol Chem*, **267**, 23930-23936.



- Schuske, K. R., Richmond, J. E., Matthies, D. S., Davis, W. S., Runz, S., Rube, D. A., van der Blik, A. M. and Jorgensen, E. M. (2003) Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron*, **40**, 749-762.
- Schuster, T., Krug, M., Stalder, M., Hackel, N., Gerardy-Schahn, R. and Schachner, M. (2001) Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J Neurobiol*, **49**, 142-158.
- Scully, A. L., McKeown, M. and Thomas, J. B. (1999) Isolation and characterization of Dek, a Drosophila eph receptor protein tyrosine kinase. *Molecular and cellular neurosciences*, **13**, 337-347.
- Setou, M., Seog, D. H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M. and Hirokawa, N. (2002) Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature*, **417**, 83-87.
- Shamah, S. M., Lin, M. Z., Goldberg, J. L. et al. (2001) EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell*, **105**, 233-244.
- Shapira, M., Zhai, R. G., Dresbach, T., Bresler, T., Torres, V. I., Gundelfinger, E. D., Ziv, N. E. and Garner, C. C. (2003) Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. *Neuron*, **38**, 237-252.

- Shi, L., Fu, W. Y., Hung, K. W., Porchetta, C., Hall, C., Fu, A. K. and Ip, N. Y. (2007) Alpha2-chimaerin interacts with EphA4 and regulates EphA4-dependent growth cone collapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 16347-16352.
- Shi, Y. and Ethell, I. M. (2006) Integrins control dendritic spine plasticity in hippocampal neurons through NMDA receptor and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated actin reorganization. *J Neurosci*, **26**, 1813-1822.
- Siksou, L., Rostaing, P., Lechaire, J. P. et al. (2007) Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J Neurosci*, **27**, 6868-6877.
- Song, I. and Huganir, R. L. (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, **25**, 578-588.
- Song, J. Y., Ichtchenko, K., Sudhof, T. C. and Brose, N. (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1100-1105.
- Song, W. and Zinsmaier, K. E. (2003) Endophilin and synaptojanin hook up to promote synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*, **40**, 665-667.
- Sorkina, T., Huang, F., Beguinot, L. and Sorkin, A. (2002) Effect of tyrosine kinase inhibitors on clathrin-coated pit recruitment and internalization of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, **277**, 27433-27441.
- Stein, E., Lane, A. A., Cerretti, D. P., Schoecklmann, H. O., Schroff, A. D., Van Etten, R. L. and Daniel, T. O. (1998) Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to

determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses.

*Genes Dev*, **12**, 667-678.

Sudhof, T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, **27**, 509-547.

Suga, H., Hoshiyama, D., Kuraku, S., Katoh, K., Kubokawa, K. and Miyata, T. (1999a)

Protein tyrosine kinase cDNAs from amphioxus, hagfish, and lamprey: isoform

duplications around the divergence of cyclostomes and gnathostomes. *Journal of*

*molecular evolution*, **49**, 601-608.

Suga, H., Koyanagi, M., Hoshiyama, D., Ono, K., Iwabe, N., Kuma, K. and Miyata, T.

(1999b) Extensive gene duplication in the early evolution of animals before the

parazoan-eumetazoan split demonstrated by G proteins and protein tyrosine kinases

from sponge and hydra. *J Mol Evol*, **48**, 646-653.

Surawska, H., Ma, P. C. and Salgia, R. (2004) The role of ephrins and Eph receptors in

cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, **15**, 419-433.

Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., Dityatev, A. and Schachner, M. (2004) Trans-Golgi network

delivery of synaptic proteins in synaptogenesis. *J Cell Sci*, **117**, 381-388.

Takasu, M. A., Dalva, M. B., Zigmond, R. E. and Greenberg, M. E. (2002) Modulation of

NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB

receptors. *Science*, **295**, 491-495.

Takenawa, T. and Itoh, T. (2001) Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin

cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane.

*Biochim Biophys Acta*, **1533**, 190-206.

- Tan, T. C., Valova, V. A., Malladi, C. S. et al. (2003) Cdk5 is essential for synaptic vesicle endocytosis. *Nat Cell Biol*, **5**, 701-710.
- Tao-Cheng, J. H. (2007) Ultrastructural localization of active zone and synaptic vesicle proteins in a preassembled multi-vesicle transport aggregate. *Neuroscience*, **150**, 575-584.
- Tolias, K. F., Bikoff, J. B., Kane, C. G., Tolias, C. S., Hu, L. and Greenberg, M. E. (2007) The Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 mediates EphB receptor-dependent dendritic spine development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7265-7270.
- Tomizawa, K., Sunada, S., Lu, Y. F. et al. (2003) Cophosphorylation of amphiphysin I and dynamin I by Cdk5 regulates clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Biol*, **163**, 813-824.
- Tong, J., Elowe, S., Nash, P. and Pawson, T. (2003) Manipulation of EphB2 regulatory motifs and SH2 binding sites switches MAPK signaling and biological activity. *J Biol Chem*, **278**, 6111-6119.
- Torres, R., Firestein, B. L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E. N., Huganir, R. L., Brecht, D. S., Gale, N. W. and 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. and Doucet, G. (2007) Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus. *J Comp Neurol*, **501**, 691-702.

- Uchigashima, M., Fukaya, M., Watanabe, M. and Kamiya, H. (2007) Evidence against GABA release from glutamatergic mossy fiber terminals in the developing hippocampus. *J Neurosci*, **27**, 8088-8100.
- Varoqueaux, F., Jamain, S. and Brose, N. (2004) Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *Eur J Cell Biol*, **83**, 449-456.
- Vivar, C. and Gutierrez, R. (2005) Blockade of the membranal GABA transporter potentiates GABAergic responses evoked in pyramidal cells by mossy fiber activation after seizures. *Hippocampus*, **15**, 281-284.
- Voglmaier, S. M., Kam, K., Yang, H., Fortin, D. L., Hua, Z., Nicoll, R. A. and Edwards, R. H. (2006) Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron*, **51**, 71-84.
- Wang, X., Roy, P. J., Holland, S. J., Zhang, L. W., Culotti, J. G. and Pawson, T. (1999) Multiple ephrins control cell organization in *C. elegans* using kinase-dependent and -independent functions of the VAB-1 Eph receptor. *Mol Cell*, **4**, 903-913.
- Wang, Y. T. and Salter, M. W. (1994) Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature*, **369**, 233-235.
- Wegmeyer, H., Egea, J., Rabe, N. et al. (2007) EphA4-dependent axon guidance is mediated by the RacGAP alpha2-chimaerin. *Neuron*, **55**, 756-767.
- Weinl, C., Drescher, U., Lang, S., Bonhoeffer, F. and Loschinger, J. (2003) On the turning of *Xenopus* retinal axons induced by ephrin-A5. *Development*, **130**, 1635-1643.

- White, J. M. (2003) ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 598-606.
- Willson, C. A., Irizarry-Ramirez, M., Gaskins, H. E., Cruz-Orengo, L., Figueroa, J. D., Whittemore, S. R. and Miranda, J. D. (2002) Upregulation of EphA receptor expression in the injured adult rat spinal cord. *Cell Transplant*, **11**, 229-239.
- Willson, C. A., Miranda, J. D., Foster, R. D., Onifer, S. M. and Whittemore, S. R. (2003) Transection of the adult rat spinal cord upregulates EphB3 receptor and ligand expression. *Cell Transplant*, **12**, 279-290.
- Winslow, J. W., Moran, P., Valverde, J. et al. (1995) Cloning of AL-1, a ligand for an Eph-related tyrosine kinase receptor involved in axon bundle formation. *Neuron*, **14**, 973-981.
- Wybenga-Groot, L. E., Baskin, B., Ong, S. H., Tong, J., Pawson, T. and Sicheri, F. (2001) Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell*, **106**, 745-757.
- Xu, Q., Alldus, G., Holder, N. and Wilkinson, D. G. (1995) Expression of truncated Sek-1 receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain. *Development*, **121**, 4005-4016.
- Xu, Q., Alldus, G., Macdonald, R., Wilkinson, D. G. and Holder, N. (1996) Function of the Eph-related kinase rtk1 in patterning of the zebrafish forebrain. *Nature*, **381**, 319-322.

- Xu, Z., Lai, K. O., Zhou, H. M., Lin, S. C. and Ip, N. Y. (2003) Ephrin-B1 reverse signaling activates JNK through a novel mechanism that is independent of tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, **278**, 24767-24775.
- Yates, P. A., Roskies, A. L., McLaughlin, T. and O'Leary, D. D. (2001) Topographic-specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal map development. *J Neurosci*, **21**, 8548-8563.
- Yin, Y., Yamashita, Y., Noda, H., Okafuji, T., Go, M. J. and Tanaka, H. (2004) EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A ligands in cis. *Neurosci Res*, **48**, 285-296.
- Yokoyama, N., Romero, M. I., Cowan, C. A., Galvan, P., Helmbacher, F., Charnay, P., Parada, L. F. and Henkemeyer, M. (2001) Forward signaling mediated by ephrin-B3 prevents contralateral corticospinal axons from recrossing the spinal cord midline. *Neuron*, **29**, 85-97.
- Zallen, J. A., Kirch, S. A. and Bargmann, C. I. (1999) Genes required for axon pathfinding and extension in the *C. elegans* nerve ring. *Development*, **126**, 3679-3692.
- Zhai, R. G., Vardinon-Friedman, H., Cases-Langhoff, C., Becker, B., Gundelfinger, E. D., Ziv, N. E. and Garner, C. C. (2001) Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron*, **29**, 131-143.
- Zhang, J. and Hughes, S. (2006) Role of the ephrin and Eph receptor tyrosine kinase families in angiogenesis and development of the cardiovascular system. *J Pathol*, **208**, 453-461.

- Zhen, M. and Jin, Y. (2004) Presynaptic terminal differentiation: transport and assembly. *Curr Opin Neurobiol*, **14**, 280-287.
- Zheng, J., Shen, W. H., Lu, T. J. et al. (2008) Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. *J Biol Chem*.
- Zhou, L., Martinez, S. J., Haber, M. et al. (2007) EphA4 signaling regulates phospholipase Cgamma1 activation, cofilin membrane association, and dendritic spine morphology. *J Neurosci*, **27**, 5127-5138.
- Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J. and Klein, R. (2003) EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol*, **5**, 869-878.
- Zisch, A. H., Kalo, M. S., Chong, L. D. and Pasquale, E. B. (1998) Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene*, **16**, 2657-2670.
- Zisch, A. H., Pazzagli, C., Freeman, A. L., Schneller, M., Hadman, M., Smith, J. W., Ruoslahti, E. and Pasquale, E. B. (2000) Replacing two conserved tyrosines of the EphB2 receptor with glutamic acid prevents binding of SH2 domains without abrogating kinase activity and biological responses. *Oncogene*, **19**, 177-187.
- Ziv, N. E. and Garner, C. C. (2004) Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 385-399.