



## RÉFÉRENCES

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 ; 100 : 57-70.
2. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005 ; 434 : 864-70.
3. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009 ; 137 : 1062-75.
4. Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005 ; 436 : 642.
5. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005 ; 434 : 907-13.
6. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 ; 2 : 731-7.
7. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009 ; 136 : 823-37.
8. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 2009 ; 139 : 693-706.
9. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999 ; 98 : 295-303.
10. Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, et al. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 1998 ; 18 : 2553-8.
11. Barré B, Vigneron A, Perkins N, et al. The STAT3 oncogene as a predictive marker of drug resistance. *Trends Mol Med* 2007 ; 13 : 4-11.
12. Lee H, Herrmann A, Deng JH, et al. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* 2009 ; 15 : 283-93.

## NOUVELLE

### Un nouveau mode d'agrégation des récepteurs nicotiques via une protéine sécrétée à domaines CCP (*complement control protein*)

Marie Gendrel

ENS, département de biologie, Inserm U789, Biologie cellulaire de la synapse, 46, rue d'Ulm, 75005 Paris, France. [mgendrel@biologie.ens.fr](mailto:mgendrel@biologie.ens.fr)

► La synapse est une structure spécialisée capable d'assurer une transmission rapide et efficace de l'influx nerveux entre deux cellules excitables. Cette transmission synaptique est possible grâce à l'apposition de la zone présynaptique contenant les vésicules synaptiques chargées en neurotransmetteur et du domaine postsynaptique où les récepteurs du neurotransmetteur sont agrégés. Le recrutement de ces récepteurs constitue donc une phase essentielle pour assurer une neurotransmission efficace. L'agrégation des récepteurs à la membrane se fait par l'intermédiaire de protéines sous-membranaires interagissant avec la région cytoplasmique des récepteurs. De tels processus ont été décrits pour l'agrégation (1) des récepteurs nicotiques à la jonction neuromusculaire des vertébrés (pour revue, voir [1]), (2) des récepteurs du GABA (acide  $\gamma$  aminobutyrique) et de la glycine par la géphyrine aux synapses inhibitrices (pour revue, voir [2]) et

(3) des récepteurs du glutamate par les protéines de la famille MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase*) (pour revue, voir [3]). À côté de ces échafaudages cytoplasmiques, il a été démontré que les pentraxines neuronales ont un rôle dans le recrutement des récepteurs ionotropiques du glutamate à travers des interactions extracellulaires [4], mais ces complexes extracellulaires semblent jouer plutôt un rôle modulateur que central dans l'organisation des domaines postsynaptiques [5].

#### *C. elegans*, un modèle d'étude des synapses

Afin de comprendre les mécanismes d'agrégation des récepteurs ionotropes aux synapses, nous cherchons à identifier par une approche génétique des protéines impliquées dans l'agrégation des récepteurs nicotiques à la jonction neuromusculaire du nématode *Caenorhabditis elegans*, un ver non parasite pour l'homme. Les propriétés biologi-

ques de *C. elegans* en font un excellent système modèle. Il mesure 1 mm à l'âge adulte, est transparent, possède un cycle de vie court (3,5 jours), et donne naissance à une descendance abondante. Le nématode possède un système nerveux simple composé de 302 neurones et de 7 000 synapses. Chacun de ces neurones est identifiable individuellement sur la base d'une combinaison unique de propriétés telles que leur morphologie, leur connectivité et leur position. La plupart des composants du système nerveux ne sont pas nécessaires au développement, à la survie et à la reproduction des animaux dans les conditions de culture du laboratoire. Cela permet l'isolement de mutants viables chez lesquels les fonctions neurophysiologiques sont néanmoins très altérées. Les outils génétiques puissants disponibles chez *C. elegans* (comme la transgénèse ou l'ARN interférence) font de cet organisme un excellent modèle pour étudier la fonction ou la formation des synapses. La plupart des

molécules impliquées dans la transmission synaptique telles que les neurotransmetteurs sont conservées entre *C. elegans* et les vertébrés. En tirant parti de la conservation évolutive entre *C. elegans* et les vertébrés, les résultats obtenus chez le ver permettent d'extrapoler à la biologie du système nerveux de l'homme. Notre équipe avait démontré que l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine à la jonction neuromusculaire de *C. elegans* nécessitait la présence de l'ectodomaine de LEV-10 [6], une protéine membranaire de type I contenant dans sa partie extracellulaire cinq domaines CUB (*complement subcomponent C1r/C1s, uEGF, Bmp1*). LEV-10 est exprimée dans le muscle et agrégée à la synapse. En l'absence du récepteur, cette protéine n'est plus accumulée à la synapse suggérant l'existence d'autres partenaires permettant la localisation de ce complexe à la jonction neuromusculaire. Les mutants *lev-10* sont faiblement résistants au lévamisole, un agoniste nicotinique spécifique des récepteurs de l'acétylcholine du nématode. Notre stratégie a donc consisté à étudier la localisation des récepteurs de l'acétylcholine chez des mutants isolés lors de cribles génétiques de résistance au lévamisole, présentant ainsi un phénotype semblable aux mutants *lev-10*.

### **LEV-9, une protéine indispensable à l'agrégation des récepteurs nicotiniques à la jonction neuromusculaire**

Notre étude a permis de mettre en évidence l'existence d'un nouveau membre de cet échafaudage extracellulaire, la protéine sécrétée LEV-9 [7]. Chez les mutants *lev-9*, les récepteurs de l'acétylcholine ne sont plus détectables par immunofluorescence. Toutefois, l'analyse en *Western blot* montre que les récepteurs sont toujours exprimés à un niveau identique à celui des animaux sauvages et des études électro-physiologiques sur les cellules musculaires révèlent que ces récepteurs sont toujours fonctionnels mais que leur nombre est réduit de façon significative à la synapse. Nous avons

donc conclu que LEV-9 est nécessaire pour localiser les récepteurs de l'acétylcholine à la synapse.

Cette protéine sécrétée contient huit domaines CCP (*complement control protein*, ou domaine *sushi*) qui sont constitués d'environ 60 acides aminés avec comme résidus invariants quatre cystéines formant des ponts disulfures. La structure en 3D des domaines CCP montre que les domaines forment un cœur hydrophobe compact entouré de feuillets  $\beta$  qui sont maintenus par les deux ponts disulfures. Nous avons démontré que *lev-9* est exprimé dans le muscle et que cette expression musculaire est nécessaire et suffisante pour la fonction de *lev-9*. Pour localiser la protéine endogène, nous avons introduit une étiquette T7 au niveau aminoterminal de la protéine par recombinaison homologue. L'immunomarquage de cette souche *knock-in* avec des anticorps anti-T7 nous a permis de conclure que la protéine LEV-9 a une distribution synaptique et est co-localisée avec les récepteurs de l'acétylcholine et la protéine LEV-10.

Chez les mutants *lev-9*, les agrégats de LEV-10 sont absents même si la protéine est toujours exprimée comme le montre l'analyse en *Western blot*. L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine LEV-9 est requise pour localiser aussi bien les récepteurs de l'acétylcholine que LEV-10 à la synapse. De plus, l'immunomarquage de la souche *knock-in* permet de montrer qu'en l'absence de la protéine LEV-10 ou du récepteur de l'acétylcholine, la protéine LEV-9 n'est plus localisée à la jonction neuromusculaire, indiquant que LEV-9, LEV-10 et le récepteur sont interdépendants pour leur localisation à la synapse.

L'étude des interactions génétiques entre ces trois acteurs nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un échafaudage extracellulaire comprenant LEV-10 et LEV-9 et localisant le récepteur de l'acétylcholine à la jonction neuromusculaire. Par des approches combinées d'immunoprécipitation et de reconstitution du

complexe dans un système hétérologue, nous avons montré (1) que le récepteur de l'acétylcholine et LEV-10 appartiennent bien au même complexe et (2) que LEV-9 et LEV-10 interagissent. LEV-9 et LEV-10 forment donc un complexe protéique avec le récepteur permettant ainsi son agrégation à la synapse, mais d'autres partenaires restent à identifier puisqu'ils sont tous les trois interdépendants pour leur localisation à la jonction neuromusculaire.

### **Des protéines à domaines CCP sont exprimées dans le système nerveux central des mammifères**

Des orthologues de *lev-9* sont trouvés dans tous les génomes d'ectysozoaire<sup>1</sup> mais pas chez les deutérostomes<sup>2</sup>. Néanmoins les protéines à domaines CCP pourraient définir une nouvelle famille de protéines nécessaires à l'agrégation synaptique de récepteurs ionotropes. En effet, au moins 24 gènes codant des protéines à domaines CCP (sur 52 protéines prédites dans le génome de souris) sont potentiellement exprimés dans le système nerveux central (d'après le *Brain Allen Atlas*) et un nombre de plus en plus grand de ces protéines à domaines CCP est connu pour avoir une fonction neuronale. Par exemple, les mutations dans le gène humain *SRPX2*, qui code une protéine sécrétée avec trois domaines CCP et un domaine ressemblant au domaine immunoglobuline, entraînent des épilepsies rolandiques associées à des défauts de langage [8]. Chez la souris, ce gène est exprimé dans les neurones du cortex, le gyrus denté et les cellules pyramidales de l'hippocampe. Par immunohistochimie, il est démontré que la protéine est exprimée dans les neurones corticaux dès la naissance. Cette protéine a donc potentiellement un rôle au niveau du système nerveux central mais celui-ci reste à définir.

<sup>1</sup> Les ectysozoaires (dont les nématodes) perdent leur cuticule par mue (*ecdysis*) au cours du développement.

<sup>2</sup> Chez les deutérostomes, la bouche se forme après l'anus qui résulte, lui, de l'ouverture du blastopore. Les chordées (dont les mammifères) sont des deutérostomes.



LEV-9 contient huit domaines CCP, qui sont habituellement présents dans les protéines impliquées dans la voie du complément chez les mammifères. Ceci pourrait être le reflet de l'importance fonctionnelle du système du complément dans le cerveau au cours du développement. Cependant, cette hypothèse n'est pas en accord avec les fonctions synaptiques de LEV-9 puisque la voie du complément n'existe pas chez *C. elegans*. Les analyses phylogénétiques des composants du complément suggèrent que la voie du complément est apparue chez les deutérostomes. Cela s'est réalisé non pas par l'invention de nouveaux domaines mais par la création de nouvelles combinaisons de domaines préexistants [9]. Les domaines CCP ont-ils tout d'abord été utilisés par des protéines neuronales puis assimilés par le système du complément au cours de l'évolution du lignage des deutérostomes ? Récemment, une analyse comparative des protéines présentes aux synapses

des invertébrés et des vertébrés indique que le protéome synaptique a augmenté en complexité lors de la transition des invertébrés aux vertébrés. Ceci s'expliquerait non pas par le recrutement de protéines contenant des nouveaux domaines, mais plus par l'expansion de types de protéines déjà présentes dans le *pool* synaptique [10]. Cela suggérerait que les protéines contenant des domaines CCP jouaient tout d'abord un rôle aux synapses, avant d'être assimilées par le système du complément, prédisant que d'importantes fonctions pour les protéines à domaines CCP restent à identifier dans le cerveau des mammifères. ♦

#### A new mode of nicotinic receptor clustering via a secreted CCP (complement control protein) containing protein

#### CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Song Y, Balice-Gordon R. New dogs in the dogma: Lrp4 and Tid1 in neuromuscular synapse formation. *Neuron* 2008 ; 60 : 526-8.
2. Kneussel M, Loebrich S. Trafficking and synaptic anchoring of ionotropic inhibitory neurotransmitter receptors. *Biol Cell* 2007 ; 99 : 297-309.
3. Elias GM, Nicoll RA. Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends Cell Biol* 2007 ; 17 : 343-52.
4. Xu D, Hopf C, Reddy R, et al. Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron* 2003 ; 39 : 513-28.
5. Cho RW, Park JM, Wolff SB, et al. mGluR1/5-dependent long-term depression requires the regulated ectodomain cleavage of neuronal pentraxin NPR by TACE. *Neuron* 2008 ; 57 : 858-71.
6. Gally C, Eimer S, Richmond JE, et al. A transmembrane protein required for acetylcholine receptor clustering in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2004 ; 431 : 578-82.
7. Gendrel M, Rapti G, Richmond JE, et al. A secreted complement-control-related protein ensures acetylcholine receptor clustering. *Nature* 2009 ; 461 : 992-6.
8. Roll P, Rudolf G, Pereira S, et al. SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum Mol Genet* 2006 ; 15 : 1195-207.
9. Nonaka M, Yoshizaki F. Primitive complement system of invertebrates. *Immunol Rev* 2004 ; 198 : 203-15.
10. Emes RD, Pocklington AJ, Anderson CN, et al. Evolutionary expansion and anatomical specialization of synapse proteome complexity. *Nat Neurosci* 2008 ; 11 : 799-806.

## NOUVELLE

### Les polyphosphates

#### Nouveaux acteurs plaquettaires qui associent thrombose et inflammation

Danièle Kerbiriou-Nabias

Médecine/Sciences, ADR Inserm, Paris 5,  
2, rue d'Alésia, 75014 Paris, France.  
[daniele.kerbiriou-nabias@inserm.fr](mailto:daniele.kerbiriou-nabias@inserm.fr)

> Les polyphosphates (polyP) sont des polymères linéaires de phosphate inorganique (Figure 1A) dont la présence a été initialement observée dans des organismes procaryotes ou eucaryotes unicellulaires. Dans ces organismes, les polyP sont séquestrés dans des vésicules acides riches en calcium et pompes ioniques appelées acidocalcisomes, qui ont notamment pour rôle de maintenir le pH intracellulaire et la régulation osmotique [1].

**Les plaquettes sanguines contiennent des structures de type acidocalcisomes**  
Chez l'homme, l'existence d'acidocalcisomes n'avait pas été observée jusqu'à ce qu'intervienne la démonstration, en 2004, de fortes similitudes morphologiques et de composition entre ces structures et les granules denses, vésicules intracytoplasmiques des plaquettes sanguines [2]. Ainsi, les granules denses plaquettaires, du fait notamment de leur contenu important en polyP de longueur de chaîne

autour de 80 unités phosphate (polyP<sub>80</sub>), représentent les seuls organites connus à ce jour qui auraient été conservés de la bactérie à l'homme au cours de l'évolution. Les granules denses jouent un rôle essentiel dans les fonctions des plaquettes activées, grâce à la sécrétion de leur contenu (calcium, sérotonine, ADP, ATP...) susceptible d'agir sur la vasodilatation, sur l'activation d'autres plaquettes, et sur les mécanismes procoagulants. À ces composants, il a donc fallu ajouter les