

# ARNm axonaux : de la visualisation histochimique aux analyses fonctionnelles

Alain Trembleau

Équipe Avenir/INSERM Développement et Plasticité des Réseaux Neuronaux, CNRS UMR 7102, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, Boîte 12, 9 quai St Bernard, 75005 Paris, France

Auteur correspondant : Alain Trembleau, [alain.trembleau@upmc.fr](mailto:alain.trembleau@upmc.fr)

Reçu le 4 juin 2008

**Résumé** – L'axone des neurones de vertébrés a longtemps été considéré comme étant dépourvu de la machinerie de biosynthèse des protéines. Au début des années 1990 cependant, la visualisation cytochimique d'ARNm dans certains axones de rongeurs est venue bousculer ce dogme de la neurobiologie cellulaire. Le but de cet article est d'illustrer, essentiellement sur l'exemple des neurones sensoriels olfactifs de la souris, les développements conceptuels et méthodologiques développés notamment dans mon équipe, qui visent à identifier les fonctions de ces ARNm axonaux.

**Mots clés** : ARNm / axone / développement / traduction locale / guidage axonal

**Abstract** – Axonal mRNAs: from histochemical visualization to functional analyses.

The vertebrate neuron axon has long been considered as devoid of the protein synthesis machinery. During the early nineties however, the cytochemical visualization of identified mRNAs within certain rodent neuron axons challenged this dogma of cellular neurobiology. The aim of this paper is to illustrate, taking mainly the mouse olfactory system as an example, conceptual and methodological approaches developed in particular in my group, that aim at identifying the function of these axonal mRNAs.

**Key words**: mRNA / axon / development / local translocation / axon guidance

---

## Introduction : les origines d'un dogme

L'existence d'un flux axonal antérograde a été proposée par Paul Weiss, à la suite de l'observation d'une accumulation de matériel axoplasmique au niveau de l'extrémité centrale d'axones dans des nerfs ligaturés (Weiss & Hiscoe, 1948). Il est remarquable de noter que c'est une expérience visant à confirmer cette hypothèse de flux axonal qui mena à l'idée d'une absence de synthèse de protéine dans le compartiment axonal des neurones (Droz & Leblond, 1962). Dans leur fameuse expérience publiée dans Science en 1962, Droz et Leblond apportèrent en effet la première démonstration directe d'un transport antérograde de protéines radioactives dans les axones du nerf sciatique. Ils observèrent qu'après injection de leucine

tritiée chez le rat, un fort marquage radioactif était observé dans les corps cellulaires de neurones, mais pas au niveau des axones pour lesquels aucun marquage significatif n'était observé. L'apparition, après un délai de quelques jours, d'un marquage radioactif de ces axones validait le concept de transport antérograde de protéines néosynthétisées dans les corps cellulaires. Au-delà de ce résultat remarquable, l'ensemble de ces données plaidait en faveur de l'absence de synthèse de protéines dans les axones. Bien que n'étant pas mise en avant par les auteurs dans cet article, cette notion finit néanmoins par être considérée comme un principe acquis par de nombreux auteurs. En plein accord avec les résultats d'analyses morphologiques rapportant l'absence de ribosomes/polysomes dans les axones du système nerveux des vertébrés (Palay & Palade, 1955),

elle en devint même un dogme très robuste de la neurobiologie cellulaire : jusque dans les années 1980, il est très généralement admis qu'il n'y a ni synthèse de protéines, ni même la machinerie moléculaire permettant cette activité biochimique, dans le compartiment axonal des neurones de vertébrés.

En fait, si ces analyses indiquaient clairement que le compartiment axonal des neurones de vertébrés n'était pas le siège d'une synthèse protéique aussi massive que le compartiment constitué par leur corps cellulaire, elles ne démontraient aucunement l'absence de toute activité de synthèse protéique dans l'axone. La radioautographie est en effet limitée dans sa sensibilité, et inappropriée dès lors qu'il s'agit de révéler de très faibles quantités de protéines radioactives. De leur côté, les observations au microscope électronique ne permettent généralement pas d'explorer de façon complète le compartiment axonal, de dimension macrométrique sur sa longueur pour la plupart des neurones. Aussi pourrait-on presque s'étonner, *a posteriori*, que la remise en cause de ce dogme reposant sur des bases somme toute fragiles ait été si difficile à accepter par la communauté scientifique.

### ARNm axonaux : la preuve du concept par l'image

Le développement de l'hybridation *in situ*, technique plus sensible permettant de détecter non plus des protéines radioactives (ou de voir directement des organelles) mais de localiser tout en les identifiant des ARNm, a permis de ré-examiner sous un angle nouveau cette question. Grâce à sa spécificité extraordinaire, cette technique permet d'abord de tester la présence d'ARNm précis (une avancée considérable comparée à la détection de protéines radioactives dont l'identité reste inconnue). Grâce à sa haute résolution, permise dans ses raffinements ultimes par des avancées méthodologiques impliquant l'utilisation de systèmes de détection préalablement mis au point pour l'immunocytochimie (enzymes, particules d'or, etc.), cette méthode autorise en outre l'analyse de la localisation subcellulaire d'ARNm dans le système nerveux. Il est important de noter ici que si la contribution des biologistes moléculaires fut essentielle au développement de l'hybridation *in situ* dans tous ses domaines d'application, celle des neuroanatomistes s'étant dotés dans les années 1970-80 d'une batterie extraordinaire d'outils cytochimiques (notamment la radioautographie, l'immunocytochimie et leurs multiples combinaisons, mises en oeuvre aussi bien en microscopie optique qu'électronique) fut déterminante pour franchir l'étape critique qui permet d'identifier des ARNm dans leur contexte ultrastructural et moléculaire. Ainsi, c'est dans des laboratoires de neuroanatomie fonction-

nelle, et en particulier dans celui dirigé par André Calas, que furent développées dès la seconde moitié des années 1980, alors même que l'hybridation *in situ* appliquée à l'étude du système nerveux en était à ses balbutiements, des méthodes de détections multiples d'ARNm à l'échelle optique, ou encore de visualisation d'ARNm à l'échelon ultrastructural (Trembleau *et al.*, 1988; Trembleau *et al.*, 1990; Trembleau *et al.*, 1993).

Au cours des années 1980-90, certains ARNm ont fortuitement été observés en dehors des régions cérébrales contenant les corps cellulaires connus pour les exprimer. Curieusement, pour certains d'entre eux au moins, ces zones correspondaient à des zones de projection de ces corps cellulaires. Les premiers résultats ayant été obtenus avec des méthodes rudimentaires (sondes radioactives révélées par radioautographie) rendant impossible de distinguer une éventuelle localisation axonale d'une expression jusque là inconnue d'un gène par un nouveau groupe de cellules, ils firent l'objet de ces deux interprétations possibles. Le cas le plus éloquent en la matière est celui de la découverte, à la fin des années 1980, de la présence des ARNm codant la vasopressine et l'ocytocine dans la neurohypophyse (Murphy *et al.*, 1989). Il s'agit précisément de la zone terminale de projection des axones des neurones magnocellulaires de l'hypothalamus qui expriment très fortement l'un ou l'autre de ces ARNm codant des neuropeptides; mais cette zone contient en outre des cellules appelées pituicytes ainsi que de nombreux éléments vasculaires. Certains auteurs de cette découverte, manifestement convaincus de l'inviolabilité du dogme mentionné plus haut, ont conclu qu'ils avaient mis en évidence un nouveau site d'expression de ces gènes, et que les ARNm qu'ils observaient étaient forcément synthétisés par les pituicytes (Murphy *et al.*, 1989). Un éminent neurobiologiste américain, informé de cette observation à l'occasion d'un voyage en Europe, et probablement plus enclin à une analyse factuelle non biaisée par des *a priori*, fit remarquer que cette observation s'expliquait beaucoup plus simplement si l'on voulait admettre que ces ARNm étaient transportés le long de l'axone des neurones magnocellulaires, jusque dans leurs terminaisons. De retour dans son laboratoire, il proposa à son équipe de tester cette hypothèse hérétique, ce qui fut entrepris et aboutit, en deux temps, à la confirmation de la localisation axonale de ces ARNm dans ce système, par la visualisation de ces ARNm dans leur contexte ultrastructural, en microscopie électronique (Jirikowski *et al.*, 1990; Trembleau *et al.*, 1994).

Le transport d'ARNm dans des axones du système nerveux adulte ou en développement a ensuite été observé dans le système olfactif de la souris pour d'autres ARNm, dont les ARNm codant les récepteurs de

molécules odorantes (Vassar *et al.*, 1994; Ressler *et al.*, 1994), puis dans d'autres populations de neurones (pour revues voir Van Minnen, 1994; Steward & Schuman, 2003; Sotelo-Silveira *et al.*, 2006; Lin & Holt, 2007). Dans tous les cas, comme cela avait d'ailleurs été observé pour le transport dendritique d'ARNm, les neurones concernés ne transportaient manifestement pas tous leurs ARNm dans le compartiment axonal. Un tri d'une très forte sélectivité semble conduire au transport de quelques espèces d'ARNm, alors que la très grande majorité d'entre eux (et même, parmi eux, les plus fortement exprimés) sont confinés dans le corps cellulaire. On sait aujourd'hui que ces transports différentiels vers différents compartiments d'une même cellule sont dus à l'existence de signaux de transport présents dans les séquences 5' ou 3'-non traduites des ARNm ; signaux reconnus par des protéines elles-mêmes interagissant avec des systèmes de transports (Kislauskis & Singer, 1992; Kiebler & Bassell, 2006; Sossin & DesGroseillers, 2006).

Ces études par hybridation *in situ* étaient finalement en plein accord avec les observations historiques de Droz et Leblond : elles confirmaient que la très grande majorité des protéines axonales sont synthétisées dans le corps cellulaire, avant d'être transportées dans l'axone. Néanmoins, les études d'hybridation *in situ* révélèrent que certains ARNm, très peu nombreux semblait-il, sont transportés dans l'axone de certaines populations (peu nombreuses elles aussi) de neurones chez le rongeur. Le caractère presque anecdotique de ces observations – peu d'axones et peu d'ARNm semblaient concernés – leur valeur d'être longtemps considérées avec le plus grand scepticisme, un scepticisme d'autant plus grand qu'aucune preuve de leur traduction dans l'axone n'avait pu être apportée. La question majeure restait : quelle est la fonction de ces ARNm dans l'axone ? Y sont-ils traduits et, si oui, quel est l'intérêt pour le neurone de délocaliser une machinerie lourde de traduction dans l'axone alors que des systèmes très efficaces de transport axonal de protéines existent ? Cette dernière question ne pouvait être abordée par l'hybridation *in situ*, et des méthodes plus complexes ont dû être mises en œuvre ou inventées pour tenter de la résoudre.

## Les ARNm axonaux sont-ils traduits dans l'axone ?

Démontrer de façon directe la traduction d'une population identifiée d'ARNm dans un *tissu* nécessite l'utilisation de méthodes biochimiques. Une première approche consiste à montrer la néosynthèse de la protéine correspondante, par exemple en immunoprécipitant cette protéine après marquage métabolique à

l'aide d'acides aminés radioactifs. Une autre méthode consiste à démontrer la présence d'ARNm dans des fractions polysomales. Ces deux méthodes sont néanmoins extrêmement difficiles à appliquer au *compartiment axonal* des neurones. En effet, dans les deux cas, il est nécessaire de s'assurer de la séparation préalable des axones des cellules ou autre prolongements neuronaux de leur environnement, et de leur degré satisfaisant de pureté. C'est pour cette raison d'ailleurs qu'un certain nombre d'anciens travaux, réalisés par exemple sur l'axone isolé de cellules de Mauthner chez le poisson (Edström & Sjöstrand, 1969), n'ont pas vraiment convaincu la communauté scientifique sur l'existence d'une synthèse de protéines dans ces axones : difficile en effet d'être certain dans ces conditions que les protéines néosynthétisées (non-identifiées dans ces études) ne sont pas issues de quelques cellules résiduelles qui n'ont pas pu être éliminées lors de la dissection de l'axone.

Dans certains cas rendus favorables par l'organisation neuroanatomique du système analysé, cette purification d'axones devient facultative. Dans le système olfactif de la souris par exemple, il est en principe possible de déterminer par des analyses biochimiques réalisées sur des extraits de bulbe olfactif (BO) si les ARNm axonaux codant des récepteurs de molécules odorantes (RO, Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994) sont traduits dans ce compartiment neuronal. En effet, les gènes codant les RO étant spécifiquement exprimés par les neurones sensoriels olfactifs (NSO, dont les corps cellulaires sont tous situés en dehors du BO, dans l'épithélium olfactif) mais pas par des corps cellulaires présents dans le BO, une démonstration de leur traduction dans le BO aurait de fait valeur de preuve de leur traduction axonale. Ayant identifié dans ces axones des composants régulateurs de la traduction (Nedelec *et al.*, 2004), nous avons entrepris d'analyser l'éventuelle traduction axonale des ARNm codant les RO, malgré les difficultés posées par ce projet. En effet, si ce système permet de s'affranchir de purifier les axones sensoriels olfactifs, il présente l'inconvénient suivant : chaque RO n'étant exprimé que par une proportion infime de NSO seulement (moins d'un millième de la population totale des NSO chez la souris, Mombaerts, 2006), les molécules d'ARNm axonaux d'un RO donné extraites à partir de bulbe olfactif total sont très peu nombreuses, et noyées dans une masse considérable d'autres ARNm exprimés par l'ensemble des cellules bulbaires. Aussi, il n'est pas simple de les détecter, et encore plus difficile d'en démontrer la traduction. Nous avons néanmoins mis au point dans mon équipe une approche extrêmement sensible et spécifique de quantification d'ARNm codant des RO dans des extraits bruts de bulbe olfactif, ainsi que dans des fractions biochimiques de type polysome. Cela nous a permis non seulement

de démontrer pour la première fois que ces ARNm sont traduits dans l'axone, mais également de mesurer leur taux de traduction dans le bulbe olfactif, et de montrer que cette traduction est régulée au cours du développement (Dubacq, Jamet, Trembleau, soumis). Nos résultats démontrent clairement que les taux de traduction des ARNm étudiés sont plus élevés dans des circonstances caractérisées par une forte croissance des axones des NSO, comme par exemple chez des souris néonatales, ou encore chez des souris adultes en phase de régénération de leurs projections sensorielles olfactives après lésion des NSO. Cela nous a conduit à étayer un modèle fonctionnel qui sera détaillé plus bas.

### **Synthétiser des protéines dans l'axone... mais pour assurer quelle(s) fonction(s) ?**

#### *Synthétiser les protéines constitutives de l'axone ?*

Si la faiblesse de certains résultats en faveur de l'existence d'une traduction locale d'ARNm dans l'axone des neurones de vertébrés a été l'une des causes évidentes du scepticisme soulevé par ce concept, un autre facteur a également pesé dans le même sens : tant qu'aucune fonction claire pour ce processus n'avait été identifiée, il s'agissait d'un concept vide de sens. Certes, une signification plausible, étayée parfois par des démonstrations quasi-mathématiques, était que pour des axones très longs, dont le volume excède de plusieurs ordres de grandeur celui du corps cellulaire associé, une synthèse des protéines axonales restreinte au péricaryon ne pourrait suffire à approvisionner l'axone (Alvarez *et al.*, 2000; Alvarez, 2001). Ces raisonnements, qui prennent en compte la lente vitesse du flux axonal antérograde, en arrivent à la conclusion qu'il est inconcevable, à moins d'imaginer des durées de vie extrêmement longues pour les protéines du cytosquelette axonal par exemple, que ces protéines ne soient pas synthétisées ici ou là dans l'axone. Cet argument purement théorique, encore discuté aujourd'hui (faute de démonstration expérimentale suffisamment convaincante en sa faveur), présente un intérêt évident pour certaines catégories de neurones à long axone, pour lesquels des sites de traduction locale axonale le long de l'axone permettrait de pallier une machinerie de transport de protéines sous-dimensionnée et inadaptée dès lors que l'axone dépasse une certaine longueur. Cependant, il n'a pas été très entendu par la communauté scientifique, malgré une série de résultats préliminaires apportant, à défaut d'une démonstration définitive, des arguments allant dans ce sens (pour revue voir Alvarez *et al.*, 2000; Alvarez, 2001; Hillefors *et al.*, 2007; Giuditta *et al.*, 2008).

#### *Changer l'identité ou le comportement d'un axone en réponse à des signaux locaux ?*

La fonction de synthèse de protéines constitutives décrite dans le précédent paragraphe, si elle existe, ne présente ni le caractère original ni la richesse conceptuelle d'autres fonctions par traduction axonale locale, qui ont été proposées et démontrées récemment dans un certain nombre de systèmes. Paradoxalement – mais il s'agit d'un paradoxe habituel en sciences –, ces découvertes ont été faites non pas par les équipes engagées depuis très longtemps dans l'analyse de la traduction locale axonale, mais par des chercheurs travaillant à l'étude des mécanismes moléculaires de guidage axonal, ou encore de régénération axonale après lésion.

En 2001 pour la première fois, puis au cours des années qui suivirent, forte d'un dispositif permettant de suivre en temps réel dans une boîte de culture le comportement d'une cône de croissance confronté à un gradient d'une molécule de guidage, l'équipe de Christine Holt a tout d'abord démontré de façon très élégante que le virage de cônes en réponse à des molécules attractives ou répulsives était bloqué lorsque l'ôn inhibait la synthèse locale de protéines dans le cône de croissance axonale (Campbell & Holt, 2001; Brunet *et al.*, 2005). La même équipe et une autre équipe indépendante ont ensuite montré que ce phénomène impliquait très probablement la traduction locale polarisée dans le cône de croissance de l'ARNm  $\beta$ -actine, dont le contrôle est manifestement assuré par des mécanismes complexes et encore très mal compris de régulation géographique de la traduction de cet ARNm au sein du cône de croissance (Yao *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006). Dans ce système, la traduction locale d'ARNm ne compense pas du tout l'éventuelle insuffisance de transport axonal de  $\beta$ -actine dans l'axone en croissance; elle assure par son asymétrie au sein du cône, induite par le gradient de molécule de guidage auquel le cône est soumis, son changement orienté de direction de croissance (Leung *et al.*, 2006).

En 2002, l'équipe de John Flanagan publia un ensemble de résultats indiquant que la traduction locale régulée d'un ARNm dans des axones en croissance pourrait permettre à ces derniers de changer radicalement de comportement vis-à-vis de signaux de guidage lors de leur traversée d'une zone critique, la ligne médiane ventrale du tube neural (Brittis *et al.*, 2002). Nous savions en effet que les axones de neurones commissuraux sont dans un premier temps attirés par des signaux sécrétés par la ligne médiane (d'où leur croissance orientée vers la plaque du plancher) et que, une fois cette plaque du plancher traversée, ils avaient la capacité de s'en éloigner – ce qui signifiait qu'il avaient changé leur réponse vis-à-vis

de ces mêmes signaux. Flanagan et ses collaborateurs ont montré que ce changement de comportement était très probablement dû à la synthèse locale axonale dans le cône de croissance, au moment de sa traversée de la plaque du plancher, d'un nouveau récepteur à des signaux de guidage (EphA2). Le nouveau concept élaboré à partir de cette contribution originale est que la synthèse locale d'un nouveau récepteur (non exprimé jusque là) dans un cône de croissance, activée par certains signaux spécifiques au niveau de cibles intermédiaires (ici la plaque du plancher), permet à ce cône de changer d'identité en terme d'expression de récepteurs à des molécules de guidage, et donc de progresser vers une autre cible une fois franchie cette cible intermédiaire. Ce processus est le fruit de la mise en jeu de mécanismes de régulation de la traduction très efficaces pour faire en sorte qu'une protéine n'apparaisse sur le cône de croissance qu'après que ce dernier ait franchi une cible intermédiaire. Le mécanisme qui a été recruté au cours de l'évolution pour assurer cette apparition contrôlée dans l'espace et le temps de cette protéine sur le cône de croissance est le même que celui qui permet de contrôler dans l'espace et le temps la synthèse locale de certaines protéines dans l'ovocyte de Xénope (Wu *et al.*, 1997). Il implique une protéine de liaison aux ARNm (*Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein*, CPEB) reconnaissant une séquence spécifique au sein de la séquence 3' non traduite des ARNm concernés par cette régulation (*Cytoplasmic Polyadenylation Element*, CPE), ainsi qu'une autre protéine liant CPEB et le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, assurant ainsi un blocage de la traduction des ARNm possédant une CPE (pour revue voir Richter & Sonenberg, 2005). En présence de certains signaux extracellulaires, l'activation de kinases induit la phosphorylation de CPEB, premier événement d'une chaîne qui entraîne la polyadénylation cytoplasmique de l'ARNm et l'activation de sa traduction (Brittis *et al.*, 2002; Richter & Sonenberg, 2005).

Autre illustration significative : dans un paradigme expérimental dans lequel les auteurs analysaient les mécanismes induisant l'effondrement (« *collapse* ») de cônes de croissance induit par la Sémaphorine 3A, il a été montré que la synthèse locale de la protéine RhoA dans le cône de croissance, induite par la transduction associée à la liaison de la sémaphorine 3A sur son récepteur, était nécessaire et suffisante à cet effondrement (Wu *et al.*, 2005). Ainsi, la traduction locale d'ARNm préalablement dormants dans les cônes de croissance participe non seulement au contrôle de leur navigation mais aussi à leur arrêt de croissance.

Dans les quelques exemples choisis plus haut pour illustrer les nouvelles fonctions de la traduction locale axonale, on voit l'importance des mécanismes de contrôle inhibiteur (pour assurer l'absence d'une

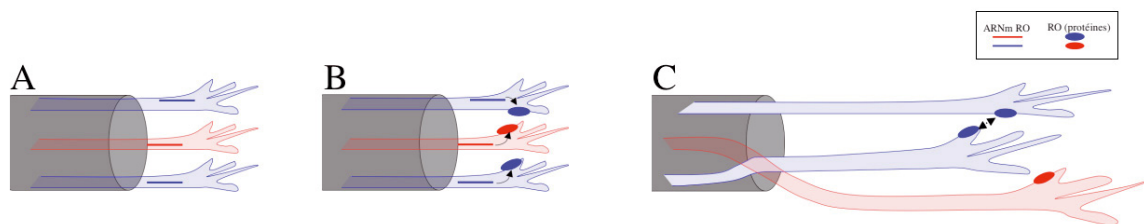
protéine en dépit de la présence de l'ARNm dans un axone) et activateur (pour assurer la production locale et rapide d'une protéine dans l'axone, en réponse à un signal extracellulaire) de la traduction des ARNm concernés. Dans les trois cas également, ces fonctions sont à mettre en relation avec des processus développementaux concernant le contrôle du guidage et de la navigation des axones vers leur cible. Mais la traduction locale axonale joue également des rôles plus tardifs, impliqués dans d'autres fonctions.

*Contrôler la survie des neurones,  
ou encore la régénération axonale après lésion ?*

La découverte de l'ARNm codant la protéine CREB (*cAMP Responsive Element Binding protein*, un facteur de transcription) dans l'axone de neurones sensoriels a conduit Samie Jaffrey et ses collaborateurs à montrer l'activation de la traduction de cet ARNm dans l'axone en réponse au NGF puis le transport rétrograde de la protéine CREB jusque dans le noyau où elle exerce un contrôle transcriptionnel nécessaire à la survie du neurone, démontrant ainsi un nouveau rôle clef de ce processus dans les mécanismes de survie induits par un facteur neurotrophique (Cox *et al.*, 2008).

Dans un paradigme expérimental de lésion du nerf sciatique chez le rat adulte enfin, Fainzilber et ses collaborateurs ont démontré le rôle critique d'une traduction locale d'ARNm axonaux (importine  $\beta$ , vimentine), induite par la lésion, dans les processus moléculaire de signalisation rétrograde vers le noyau, qui contrôlent *in fine* la régénération des axones lésés (Hanz *et al.*, 2003; Perlson *et al.*, 2005).

La conclusion de cette brève revue de la littérature montre clairement qu'au-delà du rôle classique imaginé dans les années 1960 pour la traduction locale (permettre un apport suffisant en protéines constitutives), ont émergé depuis le début du 21<sup>e</sup> siècle de nouvelles fonctions d'une grande variété, qui permettent d'aborder sous un angle nouveau un grand nombre de questions concernant le développement des réseaux neuronaux et le maintien de leur intégrité. Il est probable que la liste des processus dans lesquels la traduction locale d'ARNm axonaux est impliquée n'est pas bouclée et, pour revenir à notre système favori – le système olfactif de la souris – nous proposons que la traduction locale des ARNm codant les RO dans l'axone des neurones sensoriels olfactifs que nous venons de démontrer joue un rôle déterminant dans le contrôle du développement et du maintien de la carte sensorielle olfactive primaire.



**Fig. 1.** Modèle de contrôle spatio-temporel de la fasciculation homotypique des axones sensoriels olfactifs par l'activation de la traduction locale axonale des ARNm codant des récepteurs de molécules odorantes.

Sont distinguées dans notre modèle trois étapes (A, B et C) dans la progression des cônes de croissance axonale des neurones sensoriels olfactifs, entre l'épithélium olfactif et leur cible glomérulaire dans le bulbe olfactif. Sont à l'heure actuelle hypothétiques les points rédigés au conditionnel. **A** : Au cours de leur progression dans les branches du nerf olfactif, entre l'épithélium olfactif et le bulbe olfactif, les cônes de croissances des NSO synthétisant différents RO n'exprimeraient pas les RO à leur surface car, bien que contenant les ARNm codant ces RO, leur traduction serait bloquée au cours de cette phase d'élongation des axones. **B** : Lorsqu'ils pénètrent dans le BO, probablement sous l'influence d'un signal local exprimé par le BO, la traduction des ARNm codant les RO serait activée, conduisant à la synthèse et à l'adressage des RO à la membrane des axones. **C** : Ayant ainsi acquis leur identité moléculaire de surface, les axones forment alors des faisceaux homotypique. Ce processus de tri des axones pourrait être dû à des interactions homophiliques trans-axonales entre RO ; si l'affinité entre deux axones est proportionnelle au degré d'identité des RO, et maximale pour des axones exprimant le même RO, on s'attend, à l'issue d'interactions dynamiques au hasard entre les axones, à leur tri en faisceaux homotypiques.

### Synthèse axonale régulée de récepteurs olfactifs et son rôle dans la formation de la carte sensorielle olfactive : une hypothèse de travail

Contrairement aux systèmes visuel et auditif, caractérisés par une conservation topographique dans la projection de la périphérie vers les relais centraux (organisations rétinotopique et tonotopique), le système olfactif principal obéit à un principe très différent de formation de la carte olfactive au niveau du bulbe olfactif (O'Leary *et al.*, 1999). Ce principe n'a été élucidé qu'au début des années 1990, peu après la découverte de l'immense famille de gènes (plus de 1200 gènes fonctionnels de RO chez la souris, soit 4 à 5 % de la totalité de ses gènes!) qui codent les récepteurs de molécules odorantes (Buck & Axel, 1991). Chaque NSO exprime, de façon mono-allélique, un seul de ces gènes choisis au hasard au sein du répertoire, et tous les neurones qui expriment le même RO projettent sur une paire de glomérules par bulbe olfactif (Serizawa *et al.*, 2004). Ainsi, la carte glomérulaire ne correspond pas à une projection topographiquement conservée de la carte périphérique des neurones sensoriels ; il s'agit d'une carte moléculaire dont la construction dépend de l'identité des axones des NSO et de la convergence, sur un petit nombre de glomérules, des axones de même identité (Mombaerts *et al.*, 1996). Nous savons que les RO eux-mêmes jouent un rôle essentiel dans ce processus, et des données récentes indiquent que cette fonction de guidage axonal pourrait être assurée

par les RO au niveau des axones des NSO (pour revue voir Mombaerts, 2006). En effet, des analyses immunohistochimiques ont montré la présence de RO au niveau du segment terminal des axones des NSO dans le bulbe olfactif, alors que ces protéines sont absentes des régions plus proximales de ces axones (Barnea *et al.*, 2004 ; Strotmann *et al.*, 2004). Or, cette localisation des RO corrèle parfaitement avec le comportement des axones des NSO : avant d'arriver dans le BO, les axones se comportent comme s'ils n'avaient pas d'identité particulière (ils ne s'arrangent pas en faisceaux homogènes d'axones) ; une fois arrivés dans le BO, les faisceaux hétérogènes (en terme d'identité) d'axones défasciculent et se ré-arrangent pour former des faisceaux homotypiques, rassemblant les axones de même identité moléculaire (= exprimant le même RO) pour coalescer en glomérules (Treloar *et al.*, 2002). Nous appuyant sur ces informations, nous proposons que l'acquisition de l'identité moléculaire des axones des NSO, qui permettrait selon nous de déclencher leur fasciculation homotypique, passerait par la traduction locale des ARNm codant les RO dans l'axone des NSO, lorsque ces derniers entrent dans le bulbe olfactif (Fig. 1). Ayant montré que cette traduction locale de RO existe dans les axones bulbaires, et que son taux est corrélé positivement à la croissance de nouveaux axones de NSO dans le BO (Dubacq, Jamet et Trembleau, soumis), nous souhaitons maintenant interférer avec cette traduction locale axonale afin de déterminer si son blocage altère la fasciculation homotypique des axones sensoriels et leur coalescence en glomérules.

## Épilogue : quelques vœux d'images pour le futur

On a montré dans cet article que la présence d'ARNm et leur traduction locale dans des axones de neurones de vertébrés ont longtemps suscité le scepticisme et fait l'objet d'un faible intérêt dans la communauté des neurobiologistes, aussi bien faute de preuve définitive que de fonction(s) originale(s) proposée(s) pour de tels phénomènes. Au cours des vingt dernières années, nous avons assisté à un bouleversement complet de cette situation : la présence d'ARNm dans des axones est aujourd'hui formellement démontrée, la traduction de certains de ces ARNm dans l'axone est attestée, et de nouvelles fonctions extrêmement importantes leur ont été assignées. Dans ce processus d'évolution des idées, l'obtention d'images histo-chimiques et cytochimiques ayant permis de visualiser des ARNm dans le compartiment axonal a très certainement joué un rôle déterminant. Cependant, ces images en soi se sont avérées très insuffisantes pour avancer dans la compréhension de la signification fonctionnelle de cette localisation inattendue pour des ARNm. Grâce au développement d'approches biochimiques et pharmacologiques, non seulement la preuve de la traduction de ces ARNm dans l'axone a été obtenue, mais certaines fonctions nouvelles de cette traduction locale ont pu être identifiées. Ces analyses biochimiques atteignent néanmoins elles aussi leurs limites dans un certain nombre de systèmes. Pour ce qui concerne le système sur lequel nous travaillons, une inconnue de taille est liée à la coexistence de deux catégories d'axones sensoriels olfactifs dans le bulbe olfactif : des axones matures et des axones immatures (Nedelec *et al.*, 2005). En effet, les NSO étant soumis à une neurogenèse continue chez l'adulte, le BO de la souris comporte à tous ses stades de développement postnatal et chez l'adulte, en plus d'axones matures, une sous-population d'axones immatures en cours de croissance vers leur glomérule cible. Si nos résultats d'analyse biochimique de polysomes de BO nous indiquent que cette traduction locale se fait très probablement dans les axones immatures, nous ignorons à ce stade si elle existe également dans les axones matures. En outre, si les deux catégories d'axones sont concernées par ce phénomène, il sera très intéressant de déterminer si elles sont caractérisées par des taux de traduction identiques ou différents. Pour répondre à ces questions, il sera nécessaire de développer de nouvelles approches combinant les ressources des manipulations génétiques et celles de l'imagerie. Par exemple, l'utilisation d'un rapporteur GFP de traduction (Aakalu *et al.*, 2001) d'un ARNm codant un RO, exprimé en transgénèse par le biais de promoteurs spécifiques soit dans les neurones sensoriels immatures, soit dans les neurones sensoriels matures, de-

vrait permettre de mesurer par des approches d'imagerie l'activité traductionnelle de cet ARNm dans ces deux catégories d'axones. Parmi les autres images que nous souhaitons obtenir dans le futur, pour vérifier notre hypothèse de travail et comprendre les mécanismes d'action des RO axonaux dans le processus de tri qui conduit à leur fasciculation homotypique, figurent des images de microscopie électronique illustrant l'organisation au sein de l'axone (et de son cône de croissance) de la machinerie de synthèse et d'adressage membranaire des RO, et surtout la localisation précise de ces RO le long de la membrane de ces axones. On le voit, la quête de nouvelles images informatives n'est pas terminée dans ce domaine, comme dans bien d'autres des neurosciences.

## Références

- Aakalu G., Smith W.B., Nguyen N., Jiang C., Schuman E.M. Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron*, 2001, 30, 489-502.
- Alvarez J., The autonomous axon: a model based on local synthesis of proteins. *Biol Res*, 2001, 34, 103-109.
- Alvarez J., Giuditta A., Koenig E. Protein synthesis in axons and terminals : significance for maintenance, plasticity and regulation of phenotype. With a critique of slow transport theory. *Prog Neurobiol*, 2000, 62, 1-62.
- Barnea G., O'Donnell S., Mancina F., Sun X., Nemes A., Mendelsohn M., Axel R. Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science*, 2004, 304, 1468.
- Brittis P.A., Lu Q., Flanagan J.G. Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target. *Cell*, 2002, 110, 223-235.
- Brunet I., Weill C., Piper M., Trembleau A., Volovitch M., Harris W., Prochiantz A., Holt C. The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature*, 2005, 438, 94-98.
- Buck L., Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 1991, 65, 175-187.
- Campbell D.S., Holt C.E. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*, 2001, 32, 1013-1026.
- Cox L.J., Hengst U., Gurskaya N.G., Lukyanov K.A., Jaffrey S.R. Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat Cell Biol*, 2008, 10, 149-159.
- Droz B., Leblond C.P. Migration of proteins along the axons of the sciatic nerve. *Science*, 1962, 137, 1047-1048.
- Edström A., Sjöstrand J. Protein synthesis in the isolated Mauthner nerve fibre of goldfish. *J Neurochem*, 1969, 16, 67-81.
- Giuditta A., Tai Chun J., Eyman M., Cefaliello C., Bruno A.P., Crispino M. Local gene expression in axons and

- nerve endings: the glia-neuron unit. *Physiol Rev*, 2008, 88, 515-555.
- Hanz S., Perlson E., Willis D., Zheng J.Q., Massarwa R., Huerta J.J., Koltzenburg M., Kohler M., van-Minnen J., Twiss J.L., Fainzilber M. Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron*, 2003, 40, 1095-1104.
- Hillefors M., Gioio A.E., Mameza M.G., Kaplan B.B. Axon viability and mitochondrial function are dependent on local protein synthesis in sympathetic neurons. *Cell Mol Neurobiol*, 2007, 27, 701-716.
- Jirikowski G.F., Sanna P.P., Bloom F.E. mRNA coding for oxytocin is present in axons of the hypothalamo-neurohypophysial tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87, 7400-7404.
- Kiebler M.A., Bassell G.J. Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron*, 2006, 51, 685-690.
- Kislauskis E.H., Singer R.H. Determinants of mRNA localization. *Curr Opin Cell Biol*, 1992, 4, 975-978.
- Leung K.M., van Horck F.P., Lin A.C., Allison R., Standart N., Holt C.E. Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nat Neurosci*, 2006, 9, 1247-1256.
- Lin A.C., Holt C.E. Local translation and directional steering in axons. *Embo J*, 2007, 26, 3729-3736.
- Mombaerts P. Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22, 713-737.
- Mombaerts P., Wang F., Dulac C., Chao S.K., Nemes A., Mendelsohn M., Edmondson J., Axel R. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 1996, 87, 675-686.
- Murphy D., Levy A., Lightman S., Carter D. Vasopressin RNA in the neural lobe of the pituitary: dramatic accumulation in response to salt loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86, 9002-9005.
- Nedelec S., Dubacq C., Trembleau A., Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *J Neurocytol*, 2005, 34, 49-64.
- Nedelec S., Foucher I., Brunet I., Bouillot C., Prochiantz A., Trembleau A. Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101, 10815-10820.
- O'Leary D.D., Yates P.A., McLaughlin T. Molecular development of sensory maps: representing sights and smells in the brain. *Cell*, 1999, 96, 255-269.
- Palay S.L., Palade G.E. The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol*, 1955, 1, 69-88.
- Perlson E., Hanz S., Ben-Yaakov K., Segal-Ruder Y., Seger R., Fainzilber M. Vimentin-Dependent Spatial Translocation of an Activated MAP Kinase in Injured Nerve. *Neuron*, 2005, 45, 715-726.
- Ressler K.J., Sullivan S.L., Buck L.B. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*, 1994, 79, 1245-1255.
- Richter J.D., Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 2005, 433, 477-480.
- Serizawa S., Miyamichi K., Sakano H. One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends Genet*, 2004, 20, 648-653.
- Sossin W.S., DesGroseillers L. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic*, 2006, 7, 1581-1589.
- Sotelo-Silveira J.R., Calliari A., Kun A., Koenig E., Sotelo J.R. RNA trafficking in axons. *Traffic*, 2006, 7, 508-515.
- Steward O., Schuman E.M. Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*, 2003, 40, 347-359.
- Strotmann J., Levai O., Fleischer J., Schwarzenbacher K., Breer H. Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. *J Neurosci*, 2004, 24, 7754-7761.
- Treloar H.B., Feinstein P., Mombaerts P., Greer C.A. Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J Neurosci*, 2002, 22, 2469-2477.
- Trembleau A., Calas A., Fevre-Montange M. Ultrastructural localization of oxytocin mRNA in the rat hypothalamus by in situ hybridization using a synthetic oligonucleotide. *Brain Res Mol Brain Res*, 1990, 8, 37-45.
- Trembleau A., Fevre-Montange M., Calas A. Ultrastructural localization of mRNA coding for oxytocin by in situ hybridization. Study by high resolution autoradiography using a tritiated oligonucleotide probe. *C R Acad Sci III*, 1988, 307, 869-874.
- Trembleau A., Morales M., Bloom F.E. Aggregation of vasopressin mRNA in a subset of axonal swellings of the median eminence and posterior pituitary: light and electron microscopic evidence. *J Neurosci*, 1994, 14, 39-53.
- Trembleau A., Roche D., Calas A. Combination of non-radioactive and radioactive in situ hybridization with immunohistochemistry: a new method allowing the simultaneous detection of two mRNAs and one antigen in the same brain tissue section. *J Histochem Cytochem*, 1993, 41, 489-498.
- Van Minnen J., RNA in the axonal domain: a new dimension in neuronal functioning? *Histochem J*, 1994, 26, 377-391.



- Vassar R., Chao S.K., Sitcheran R., Nunez J.M., Vossahl L.B., Axel R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*, 1994, 79, 981-991.
- Weiss P., Hiscoe H.B. Experiments on the mechanism of nerve growth. *J Exp Zool*, 1948, 107, 315-395.
- Wu K.Y., Hengst U., Cox L.J., Macosko E.Z., Jeromin A., Urquhart E.R., Jaffrey S.R. Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature*, 2005, 436, 1020-1024.
- Wu L., Good P.J., Richter J.D. The 36-kilodalton embryonic-type cytoplasmic polyadenylation element-binding protein in *Xenopus laevis* is ElrA, a member of the ELAV family of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol*, 1997, 17, 6402-6409.
- Yao J., Sasaki Y., Wen Z., Bassell G.J., Zheng J.Q. An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca<sup>2+</sup>-dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci*, 2006, 9, 1265-1273.