

Université de Montréal

**Stimulation de la survie et de la régénération des cellules  
ganglionnaires de la rétine par inactivation de la GTPase  
Rho après lésion du nerf optique du rat adulte**

par

Johanne Bertrand

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph. D.  
en Sciences neurologiques

Décembre 2006

© Johanne Bertrand, 2006





**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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**

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  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Stimulation de la survie et de la régénération des cellules ganglionnaires de la rétine par  
inactivation de la GTPase Rho après lésion du nerf optique du rat adulte

présentée par :  
Johanne Bertrand

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Serge Rossignol, président-rapporteur  
et représentant du doyen de la FES  
Dr Lisa McKerracher, directrice de recherche  
Dr Adriana Di Polo, co-directrice  
Dr Guy Doucet, membre du jury  
Dr Jean-François Cloutier, examinateur externe

## Résumé

Les GTPases de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42) sont des molécules clés des voies de signalisation intracellulaires qui contrôlent la croissance axonale des neurones en développement. En réponse aux molécules de guidage attractives ou répulsives, elles contrôlent l'avancement, le virage ou la rétraction de l'axone et le guident vers sa cible. Alors que l'activation de Rac et Cdc42 est associée davantage aux signaux attractifs, Rho est activée principalement par la signalisation répulsive, et son activation tend à freiner la croissance. Rho pourrait donc être une composante clé dans l'absence de régénération axonale après une lésion du système nerveux central (SNC), qui est en grande partie attribuée à la présence de molécules inhibitrices de croissance, capables d'activer Rho.

Afin de déterminer le rôle de Rho dans l'inhibition de régénération du SNC, nous avons utilisé le modèle de lésion du nerf optique, formé par les axones des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR), et nous avons étudié les effets d'un antagoniste de Rho sur la régénération et la survie des CGR. L'inactivation de la GTPase Rho a été obtenue par injections intraoculaires de « C3 perméable », une version modifiée de l'antagoniste de Rho, C3. C3 ajoute un groupement ADP-ribosyle sur l'acide aminé Asparagine 41 de Rho, empêchant ainsi son activation, et la version modifiée comprend une séquence de transport qui facilite l'entrée de C3 dans les cellules.

L'inactivation de Rho avec une injection de C3 perméable faite immédiatement après la lésion a doublé la survie et quadruplé la régénération axonale des CGR après 2 semaines, par rapport aux témoins. Nous avons par la suite montré que la survie et la régénération étaient augmentées par des traitements répétés. La survie à 2 semaines est passée de 13,2 % à 20,1% avec des injections multiples. La régénération a plus que doublé avec des traitements répétés, et près de 4,5% des cellules survivantes ont régénéré un axone au-delà du site de lésion, dont près de la moitié ont atteint 500  $\mu$ m. L'utilisation de

calendriers d'injections variés nous a également permis d'établir que la fenêtre de temps disponible pour stimuler la régénération en inactivant Rho était plus courte que celle permettant de stimuler la survie par la même approche.

Nous avons aussi déterminé que l'inactivation de Rho ne permettait pas de rétablir la vitesse du transport axonal lent, qui est fortement réduite par la lésion du nerf optique. Ce résultat suggère que le traitement avec C3 perméable n'est pas suffisant pour rétablir toutes les conditions favorisant la croissance des CGR, et pourrait expliquer pourquoi la régénération que nous obtenons n'est pas plus élevée, malgré le fait que l'inactivation de Rho bloque la signalisation des molécules inhibitrices. L'ensemble de nos résultats suggère que la combinaison de C3 perméable avec un traitement qui stimulerait les conditions de croissance des CGR pourrait être une stratégie très efficace pour stimuler leur régénération.

**Mots clés :** Système nerveux central, nerf optique, cellules ganglionnaires de la rétine, Rho, C3, régénération axonale, survie neuronale, transport axonal lent.

## Abstract

Rho family GTPases (Rho, Rac and Cdc42) are key molecules in intracellular signaling pathways controlling axonal growth during development. Reacting to attractive or repulsive guidance cues, they control axonal elongation, turning or retraction, and guide the axon towards its target. Whereas Rac and Cdc42 activation are mostly associated with attractive signals, Rho is activated mainly by repulsive cues, and its activation tends to stop growth. Rho could be a key component in the absence of axonal regeneration following a central nervous system (CNS) lesion, which is mainly attributed to the presence of growth inhibitory molecules, known to activate Rho.

To determine how Rho is involved in CNS regeneration inhibition, we used the optic nerve lesion model. We studied the effects of Rho antagonists on the survival and regeneration of retinal ganglion cells (RGCs), the neurons whose axons make up the optic nerve. We inactivated Rho with intraocular injections of cell permeable C3, a modified version of Rho antagonist C3. C3 ADP-ribosylates Rho on amino acid Asparagine 41 and prevents its activation. The modified version has an additional transport sequence that facilitates its entry into cells.

Rho inactivation with a single injection of cell permeable C3 performed immediately after optic nerve lesion doubled the survival and quadrupled axonal regeneration of RGC after 2 weeks, compared to controls. We then showed that both survival and regeneration could be enhanced with repeated injections. Survival at 2 weeks increased from 13.2% to 20.1% with multiple injections. Regeneration more than doubled with repeated injections, and close to 4.5% of surviving RGCs regenerated an axon past the lesion site, with almost half of those reaching 500  $\mu\text{m}$ . We tested different injection schedules, which allowed us to determine that the therapeutic window during which

inactivating Rho can promote regeneration is shorter than the window available to stimulate RGC survival with Rho antagonists.

We also determined that inactivating Rho did not restore the rate of slow axonal transport, which is greatly reduced following optic nerve axotomy. This result suggest that treatment with cell permeable C3 is not enough to re-establish all conditions necessary to stimulate RGC growth, which might explain why regeneration is still limited in spite of the fact that Rho inactivation stops growth inhibitors signaling. Together, our results suggest that combining cell permeable C3 with a treatment that could prime mature RGCs into a growth mode could be an efficient strategy to stimulate regeneration.

**Keywords :** Central nervous system, optic nerve, retinal ganglion cells, Rho, C3, axonal regeneration, neuronal survival, slow axonal transport



## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	v
<b>Table des matières</b> .....	vii
<b>Liste des figures</b> .....	xiv
<b>Liste des abréviations</b> .....	xvii
<b>Remerciements</b> .....	xx
<b>Chapitre 1. Introduction</b> .....	1
<b>1.1. Mort cellulaire et inhibition de la croissance axonale dans le système nerveux central</b> .....	2
1.1.1. Mort cellulaire.....	3
1.1.2. Inhibition de croissance.....	7
1.1.2.1. Molécules inhibitrices de la cicatrice gliale.....	9
1.1.2.2. Molécules inhibitrices de la myéline.....	10
1.1.2.2.1. Nogo.....	11
<i>Figure 1. Configurations membranaires de Nogo-A, -B et -C.</i> .....	13
1.1.2.2.2. Myelin-Associated Glycoprotein (MAG).....	14
1.1.2.2.3. Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp).....	14
1.1.2.2.4. Autres inhibiteurs dans la myéline.....	15
1.1.2.3. Le complexe NgR/p75 <sup>NTR</sup> -TROY/LINGO-1 : récepteur commun pour Nogo-66, MAG et OMgp.....	16
1.1.2.4. Autres considérations relatives aux inhibiteurs de la régénération axonale	19
<b>1.2. La GTPase Rho</b> .....	21
1.2.1. Les petites protéines G.....	21
1.2.1.1. Caractéristiques générales.....	21
1.2.1.2. Régulateurs des petites protéines G.....	22

	<i>Figure 2. Cycle de régulation des GTPases.....</i>	23
1.2.2.	La famille Rho des petites GTPases.....	24
1.2.2.1.	Structure et caractéristiques générales. ....	25
1.2.2.2.	Régulation des Rho GTPases.....	25
1.2.2.2.1.	Régulation par les inhibiteurs de dissociation du nucléotide guanine (GDIs) .....	26
1.2.2.2.2.	Régulation par les facteurs d'échange nucléotidiques (GEFs) .....	27
1.2.2.2.3.	Régulation par les activateurs d'activité GTPasique (GAPs) .....	29
1.2.2.3.	Rôles biochimiques et biologiques des Rho GTPases. ....	30
1.2.2.4.	Implication des Rho GTPases dans le guidage axonal.....	32
1.2.2.4.1.	Le cône de croissance et les molécules de guidage.....	32
	<i>Figure 3. Le cône de croissance. ....</i>	34
1.2.2.4.2.	Les Rho GTPases et la régulation du cytosquelette d'actine .....	37
	<i>Figure 4. Régulation de l'actine par les Rho GTPases. ....</i>	39
1.2.2.5.	Implication de Rho dans l'inhibition de la régénération.....	41
1.2.2.5.1.	Lien entre les molécules inhibitrices/répulsives et l'activation de Rho .....	43
1.2.2.5.2.	Inactivation de Rho ou de ROCK <i>in vivo</i> .....	45
1.2.2.5.3.	Signalisation associée aux molécules inhibitrices.....	46
	<i>Figure 5. Liaison p75<sup>NTR</sup> et RhoGDI.....</i>	48
	<i>Figure 6. Signalisation des molécules inhibitrices. ....</i>	49
1.2.2.6.	Implication de Rho dans la mort cellulaire .....	52
<b>1.3.</b>	<b>Lésion du nerf optique : modèle de blessure du SNC pour l'étude de la survie et de la régénération .....</b>	<b>54</b>
1.3.1.	Présentation globale du modèle .....	55
	<i>Figure 7. Œil et nerf optique.....</i>	56
1.3.1.1.	Avantages du modèle du nerf optique.....	57
1.3.1.2.	Impacts d'une lésion du nerf optique .....	58

1.3.1.3.	Le modèle de microlésion du nerf optique.....	61
1.3.2.	Quantification de la survie et de la régénération des CGR .....	62
	<i>Figure 8. Quantification de la survie et de la régénération</i> .....	64
1.3.3.	Mort et survie des CGR après lésion du nerf optique .....	65
1.3.3.1.	Comment les CGR meurent-elles? Nécrose et apoptose.....	65
1.3.3.2.	Pourquoi les CGR meurent-elles?.....	66
1.3.3.3.	Stratégies utilisées pour stimuler la survie des CGR .....	68
1.3.4.	Inhibition de croissance et régénération des CGR après lésion du nerf optique .....	70
1.3.4.1.	Pourquoi les CGR ne régénèrent-elles pas spontanément?.....	70
1.3.4.2.	Stimuler la régénération dans un greffon de nerf périphérique.....	72
1.3.4.3.	Stimuler la régénération dans le nerf optique.....	75
<b>1.4.</b>	<b>Objectifs de la recherche présentée dans cette thèse</b> .....	<b>79</b>
<b>Chapitre 2.</b>	<b>Article no 1 - Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats.....</b>	<b>80</b>
2.1.	Abstract .....	81
2.2.	Introduction .....	81
2.3.	Materials and methods .....	83
2.3.1.	Rho antagonists C3-05 and C3-07 .....	83
2.3.2.	Axonal regrowth after axotomy in Campenot chambers .....	84
2.3.3.	Axonal growth on MAG in Campenot chambers .....	86
2.3.4.	Intraorbital microlesion surgery and C3-05/07 treatment.....	87
2.3.5.	Anterograde labeling, immunohistochemistry and quantification of axon growth .....	88
2.3.6.	Western blots of retina and optic nerve homogenates .....	89
2.3.7.	Retrograde labeling and quantitation of RGC survival.....	90
2.3.8.	Radiolabeling and intracranial optic nerve crush.....	91

2.3.9.	Evaluation of slow axonal transport.....	92
2.4.	Results.....	93
2.4.1.	Localized application of C3-07 after axotomy.....	93
2.4.2.	Localized application of C3-07 promotes axonal growth on MAG substrate .....	94
2.4.3.	Intravitreal injection of C3-05 or C3-07 stimulates regeneration in the optic nerve .....	95
2.4.4.	Delayed treatment with C3-07 stimulates regeneration through the lesion scar .....	97
2.4.5.	Intravitreal injection of C3-07 increases RGC survival.....	98
2.4.6.	Slow axonal transport after C3-07 treatment .....	99
2.5.	Discussion .....	100
2.6.	Figures.....	106
	<i>Figure 1. C3-07 and axonal regrowth in vitro after axotomy.....</i>	106
	<i>Figure 2. C3-07 promotes axonal growth on MAG substrates, independently of the cellular location of application. ....</i>	107
	<i>Figure 3. Immediate treatment with intravitreal injection of C3-05 or C3-07 stimulates regeneration in the optic nerve after 2 weeks.....</i>	108
	<i>Figure 4. Immediate treatment with intravitreal injection of C3-05 stimulates regeneration in the optic nerve after 4 weeks. ....</i>	109
	<i>Figure 5. Delayed treatment with C3-07 promotes regeneration past the lesion site.....</i>	110
	<i>Figure 6. C3-07 promotes survival of axotomized RGCs. ....</i>	111
	<i>Figure 7. C3-07 does not accelerate slow axonal transport after intracranial optic nerve crush. ....</i>	112
	<i>Supplemental figure 1. Detection of C3-07 in retinal and optic nerve Western blot. ....</i>	113

<i>Supplemental figure 2. Diagram of sample collection for axonal transport experiments.</i> .....	113
2.7. References .....	114
<b>Chapitre 3. Article 2 - Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists.</b> .....	120
3.1. Abstract .....	121
3.2. Introduction .....	122
3.3. Materials and methods .....	124
3.3.1. Rho antagonists C3-07 and C3-11 .....	124
3.3.2. Intraorbital microlesion surgery and treatment with Rho antagonists .....	124
3.3.3. Retrograde labeling and analysis of RGC survival .....	126
3.3.4. Anterograde labeling, immunohistochemistry and analysis of axon regeneration.....	126
3.4. Results .....	128
3.4.1. Repeated delivery of a Rho antagonist increases RGC survival.....	128
3.4.2. Repeated delivery of a Rho antagonist increases RGC regeneration.....	131
3.5. Discussion .....	132
3.6. Acknowledgements .....	137
3.7. Tables .....	138
<i>Table 1. RGC survival: quantitative analysis.</i> .....	138
<i>Table 2. Axon regeneration: quantitative analysis.</i> .....	138
3.8. Figures.....	139
<i>Figure 1. Repeated delivery of Rho antagonists increases RGC survival.</i> 139	
<i>Figure 2. Repeated injections of 1 µg of C3-11 increase RGC survival....</i> 141	
<i>Figure 3. Repeated delivery of Rho antagonists increases RGC axon regeneration.</i> .....	142
<i>Figure 4. Multiple injections of Rho antagonist C3-07 increase RGC regeneration when performed early after optic nerve lesion.</i> .....	143

3.9. References .....	144
<b>Chapitre 4. Discussion</b> .....	149
4.1. Rho et régénération des CGR.....	151
<i>Figure 1. Modèle de lésion préalable dans le nerf optique.</i> .....	156
4.2. Rho et survie des CGR.....	157
4.3. Conclusion.....	163
<b>Bibliographie</b> .....	164
<b>Annexe 1 – Article 3</b> (deuxième auteur) Vaccination stimulates retinal ganglion cell regeneration in the adult optic nerve .....	193
Contribution à l'article .....	193
Abstract .....	193
Introduction .....	194
Materials and methods .....	196
Immunization and surgery.....	196
Anterograde labeling and quantification of regeneration.....	197
Retrograde labeling and quantification of survival.....	198
Time course of serum IgG and IgM .....	199
Immunohistochemistry for immunoglobulins.....	199
Western blot analysis .....	200
Cell culture .....	202
Results .....	202
Regeneration of RGC axons after optic nerve microcrush .....	203
Antibody reaction following vaccination.....	204
Effect of SCH antiserum on RGC neurite outgrowth .....	207
RGC survival after optic nerve microcrush .....	208
Discussion .....	209
Acknowledgements .....	214
Figures.....	215

<i>Figure 1. Vaccination with SCH stimulates axon regeneration in the adult rat optic nerve.</i> .....	215
<i>Figure 2. The SCH vaccine significantly enhances extent of regeneration.</i> .....	216
<i>Figure 3. Vaccination with SCH gradually leads to elevated serum immunoglobulins.</i> .....	217
<i>Figure 4. Antibodies against known growth-inhibitory proteins are not detected in animals vaccinated with SCH.</i> .....	218
<i>Figure 5. Antibodies produced by SCH-treated rats bind to full SCH and MBP but not to known growth-inhibitory proteins.</i> .....	220
<i>Figure 6. Vaccinating with either SCH or LH does not lead to significantly different patterns of antibody binding in the injured optic nerve.</i> .....	221
<i>Figure 7. Serum from SCH vaccinated animals blocks neurite growth inhibition on myelin but not on CSPG.</i> .....	222
<i>Figure 8. Vaccination with SCH does not increase survival of RGCs after axotomy.</i> .....	223
References .....	224
<b>Annexe 2 – Accord des co-auteurs pour Article 1</b> .....	231
<b>Annexe 3 – Accord des co-auteurs pour Article 2</b> .....	234

## Liste des figures

<b>Chapitre 1. Introduction</b> .....	1
<i>Figure 1. Configurations membranaires de Nogo-A, -B et -C.</i> .....	13
<i>Figure 2. Cycle de régulation des GTPases.</i> .....	23
<i>Figure 3. Le cône de croissance.</i> .....	34
<i>Figure 4. Régulation de l'actine par les Rho GTPases.</i> .....	39
<i>Figure 5. Liaison p75<sup>NTR</sup> et RhoGDI.</i> .....	48
<i>Figure 6. Signalisation des molécules inhibitrices.</i> .....	49
<i>Figure 7. Œil et nerf optique.</i> .....	56
<i>Figure 8. Quantification de la survie et de la régénération</i> .....	64
<b>Chapitre 2. Article no 1 - Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats</b> .....	80
<i>Figure 1. C3-07 and axonal regrowth in vitro after axotomy.</i> .....	106
<i>Figure 2. C3-07 promotes axonal growth on MAG substrates, independently of the cellular location of application.</i> .....	107
<i>Figure 3. Immediate treatment with intravitreal injection of C3-05 or C3-07 stimulates regeneration in the optic nerve after 2 weeks.</i> .....	108
<i>Figure 4. Immediate treatment with intravitreal injection of C3-05 stimulates regeneration in the optic nerve after 4 weeks.</i> .....	109
<i>Figure 5. Delayed treatment with C3-07 promotes regeneration past the lesion site.</i> .....	110
<i>Figure 6. C3-07 promotes survival of axotomized RGCs.</i> .....	111
<i>Figure 7. C3-07 does not accelerate slow axonal transport after intracranial optic nerve crush.</i> .....	112
<i>Supplemental figure 1. Detection of C3-07 in retinal and optic nerve Western blot.</i> .....	113



<i>Supplemental figure 2. Diagram of sample collection for axonal transport experiments.</i> .....	113
<b>Chapitre 3. Article 2 - Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists.</b> .....	120
<i>Figure 1. Repeated delivery of Rho antagonists increases RGC survival.</i> 139	
<i>Figure 2. Repeated injections of 1 µg of C3-11 increase RGC survival...</i> 141	
<i>Figure 3. Repeated delivery of Rho antagonists increases RGC axon regeneration.</i> .....	142
<i>Figure 4. Multiple injections of Rho antagonist C3-07 increase RGC regeneration when performed early after optic nerve lesion.</i> .....	143
<b>Chapitre 4. Discussion</b> .....	149
<i>Figure 1. Modèle de lésion préalable dans le nerf optique.</i> .....	156
<b>Annexe 1 – Article 3 (deuxième auteur) Vaccination stimulates retinal ganglion cell regeneration in the adult optic nerve</b> .....	193
<i>Figure 1. Vaccination with SCH stimulates axon regeneratin in the adult rat optic nerve.</i> .....	215
<i>Figure 2. The SCH vaccine significantly enhances extent of regeneration.</i> .....	216
<i>Figure 3. Vaccination with SCH gradually leads to elevated serum immunoglobulins.</i> .....	217
<i>Figure 4. Antibodies against known growth-inhibitory proteins are not detected in animals vaccinated with SCH.</i> .....	218
<i>Figure 5. Antibodies produced by SCH-treated rats bind to full SCH and MBP but not to known growth-inhibitory proteins.</i> .....	220
<i>Figure 6. Vaccinating with either SCH or LH does not lead to significantly different patterns of antibody binding in the injured optic nerve.</i> .....	221
<i>Figure 7. Serum from SCH vaccinated animals blocks neurite growth inhibition on myelin but not on CSPG.</i> .....	222

*Figure 8. Vaccination with SCH does not increase survival of RGCs after axotomy.* ..... 223

## Liste des abréviations

AAV :	Adeno-associated virus (virus adéno-associé)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AMPA :	Acide $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
Asn :	Asparagine
BDNF:	Brain-derived neurotrophic factor (facteur neurotrophique dérivé du cerveau)
bFGF :	Basic fibroblast growth factor (facteur de croissance fibroblastique basique)
CGN :	Cerebellar granule neurons (neurones granulaires du cervelet)
CGR :	Cellules ganglionnaires de la rétine
CNTF :	Ciliary Neurotrophic factor (facteur neurotrophique ciliaire)
CS :	Collicule supérieur
CSPG :	Chondroïtine sulfate proteoglycans (protéoglycane chondroïtine sulfate)
CT $\beta$ :	<u>C</u> holera toxin subunit $\beta$ (sous-unité $\beta$ de la toxine du choléra)
EGFR :	Epidermal growth factor receptor (récepteur du facteur de croissance épidermal)
FGF:	Fibroblast growth factor (facteur de croissance fibroblastique)
FGF2:	Fibroblast growth factor 2 (facteur de croissance fibroblastique 2)
GAG :	Glycosaminoglycane

GAP :	GTPase activating protein (protéine activatrice de la GTPase)
GAP-43 :	Growth-associated protein-43 (protéine associée à la croissance-43)
GDI :	Guanine nucleotide dissociation inhibitor (inhibiteur de dissociation du nucléotide guanine)
GDNF:	Glial cell-derived neurotrophic factor (facteur neurotrophique dérivé de cellules gliales)
GEF :	Guanine exchange factor (facteur d'échange du nucléotide guanine)
GPI :	Glycosyl-phosphatidyl-inositol
GDP :	Guanosine diphosphate
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GTP :	Guanosine triphosphate
iNOS :	Inducible nitric oxide synthase (enzyme inductible de synthèse de l'oxide nitrique)
LINGO-1 :	<u>L</u> RR and <u>I</u> g domain-containing, <u>N</u> ogo receptor interacting protein
LPA:	Lysophosphatidic acid (acide lysophosphatidique)
MAG :	Myelin-associated glycoprotein
MLC :	Myosin light chain (chaîne légère de la myosine)
MLCK:	Myosin light chain kinase (kinase de la chaîne légère de la myosine)
MLCP:	Myosin light chain phosphatase (phosphatase de la chaîne légère de la myosine)
MT :	Microtubules

NGF :	Nerve growth factor (facteur de croissance neuronal)
NgR:	Nogo receptor (récepteur de Nogo)
NgR <sup>DN</sup> :	Dominant négatif de NgR
NMDA :	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NP:	Nerf périphérique
NO:	Nitric oxide (oxide nitrique)
NT-3:	Neurotrophine 3
NT-4/5 :	Neurotrophine 4/5
NTR:	Neurotrophin receptor (récepteur de neurotrophines)
OM :	Oncomoduline
OMgp :	Oligodendrocyte myelin glycoprotein
PKC:	Protéine kinase C
RGMa:	Repulsive guidance molecule a (molécule de guidage répulsive a)
sMAG :	Soluble MAG (MAG soluble)
SNC:	Système nerveux central
SNP :	Système nerveux périphérique
TNF $\alpha$ :	Tumor necrosis factor $\alpha$
TNFR :	Tumor necrosis factor receptor (récepteur du tumor necrosis factor)
TNF-R1 :	Tumor necrosis factor receptor 1 (récepteur 1 du tumor necrosis factor)

## Remerciements

Plusieurs personnes ont contribué à ce que mes années d'études supérieures soient une période que je n'oublierai jamais. Je dois remercier plus particulièrement :

**Lisa McKerracher**, ma directrice de recherche, pour tout ce qu'elle a fait pour moi

**Adriana Di Polo**, ma co-directrice de recherche, qui m'a accueillie et soutenue pendant ma dernière année de doctorat

**Catherine Dubreuil**, ma collègue et amie, pour son support indéfectible, tout le temps, mais particulièrement au cours des derniers mois

**Marguerite Bertrand**, ma mère, pour tout, tout le temps

**Denise Bertrand**, ma sœur, pour être la meilleure sœur qui soit, tout le temps

**Carole Deslisle**, ma « deuxième sœur » et complice d'études entreprises sur le tard, pour les soupers de bière et pizza ponctués d'encouragements.

.....

Je tiens également à remercier le FRSQ et les IRSC pour leur soutien financier.

## Chapitre 1. Introduction

Les neurones du système nerveux central (SNC) meurent après une lésion et ceux qui survivent ne régénèrent pas spontanément leur axone. Les blessures du SNC peuvent donc entraîner des pertes de fonction permanentes et être dévastatrices pour les personnes affectées. Bien qu'on ait cru longtemps qu'il était impossible pour un neurone adulte du SNC de régénérer un axone, on sait maintenant qu'il est possible dans certaines conditions de stimuler une réponse régénérative. L'absence de régénération spontanée est en grande partie attribuable à la présence de molécules inhibitrices de croissance dans le SNC adulte, en particulier après une lésion (Yiu and He, 2006), et diverses stratégies ont été expérimentées pour limiter l'effet de ces inhibiteurs et stimuler la régénération des axones lésés (McKerracher, 2001; David and Lacroix, 2003). Certaines approches consistent à remplacer l'environnement inhibiteur du SNC par un tissu plus permissif comme un nerf périphérique ou des cellules de Schwann. D'autres visent à bloquer l'effet des inhibiteurs à l'aide d'anticorps ou d'antagonistes de leurs récepteurs. Une autre approche consiste à modifier la signalisation intracellulaire associée aux inhibiteurs en inactivant une composante clé de cette signalisation, comme la GTPase Rho.

Plusieurs de ces stratégies ont été testées dans le nerf optique (So and Yip, 1998; Isenmann et al., 2003). Contrairement aux autres structures et nerfs sensitifs, la rétine et le nerf optique sont en effet des composantes du SNC. Le modèle de lésion du nerf optique est souvent choisi pour des expériences de survie ou de régénération, parce que sa structure est plus simple et qu'il est plus accessible que la moelle épinière. C'est le modèle de lésion que nous avons utilisé dans les expériences présentées dans cette thèse, dont l'objectif global

était d'étudier les effets des antagonistes de Rho sur la régénération et la survie après une lésion du SNC.

Dans cette introduction, nous aborderons en premier le sujet de la mort cellulaire et de l'inhibition de croissance qui suivent une lésion du système nerveux, en mettant l'emphase sur la présence de molécules inhibitrices de croissance axonale dans le SNC. Nous présenterons ensuite les GTPases de la famille Rho (les Rho GTPases), des molécules clés de la réponse axonale aux molécules de guidage, attractives ou répulsives, y compris les molécules inhibitrices de croissance. Dans cette section, l'emphase sera mise sur la GTPase Rho et sur son implication dans l'inhibition de la régénération et dans la mort cellulaire après une lésion du SNC. Finalement, ces informations seront situées dans le contexte d'une lésion du nerf optique, qui est le modèle d'étude que nous avons choisi pour étudier les effets d'inhibiteurs de Rho sur la survie neuronale et la régénération axonale après une lésion du SNC.

## **1.1. Mort cellulaire et inhibition de la croissance axonale dans le système nerveux central**

Chaque année, les lésions de la moelle épinière font environ 10,000 nouvelles victimes en Amérique du Nord seulement (Schwartz and Fehlings, 2002). Pendant la même période, environ 1.5 million d'américains subissent une lésion traumatique au cerveau, et 80,000 à 90,000 d'entre eux en gardent des séquelles permanentes (Thurman et al., 1999).



Contrairement aux lésions du système nerveux périphérique (SNP), où les neurones lésés peuvent généralement survivre et régénérer leur axone, les lésions du SNC entraînent des pertes de fonction permanentes parce qu'elles provoquent une mort importante des neurones et des cellules gliales, et parce que les neurones qui survivent ne régénèrent pas leur axone (Goldberg and Barres, 2000).

Le SNC est un environnement complexe et les mécanismes entourant la mort cellulaire et l'absence de régénération vont nécessairement varier d'un type de lésion à un autre. Il se dégage cependant un certain nombre de caractéristiques communes que nous présenterons dans les prochaines sections.

### **1.1.1. Mort cellulaire**

Après une lésion traumatique du SNC, on observe deux phases de dégénérescence cellulaire. Une phase primaire commence immédiatement après la lésion. Pendant cette phase aiguë, des neurones et cellules gliales situés dans la région immédiate de la lésion meurent, principalement par nécrose, lorsque les membranes cellulaires et axonales sont brisées par la force mécanique générée par la blessure (Royo et al., 2003; Hagg and Oudega, 2006). Ces événements initiaux déclenchent une cascade de réactions telles que la libération d'acides aminés excitotoxiques, l'inflammation, la peroxydation des lipides et la formation de radicaux libres, qui vont entraîner une phase secondaire de dégénérescence neuronale et gliale (Beattie et al., 2002; Morganti-Kossmann et al., 2002; Keane et al.,

2006), qui peut durer des mois ou même des années dans le cas de lésions de la moelle épinière chez l'humain (Hagg and Oudega, 2006).

Nous savons maintenant que la mort apoptotique de neurones et de cellules gliales s'ajoute à la mort nécrotique pendant cette phase chronique. Des caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose ont été observées dans des modèles de lésion de la moelle épinière, de lésion traumatique au cerveau, de lésion du nerf optique et d'ischémie cérébrale (Berkelaar et al., 1994; Liu et al., 1997; Springer et al., 1999; Eldadah and Faden, 2000; Zhang et al., 2005). La présence de cellules apoptotiques peut être observée très rapidement après une lésion. Par exemple, après une lésion de la moelle épinière par contusion chez le rat, on peut voir des neurones apoptotiques près du site de lésion aussi rapidement que 4 à 6 heures plus tard (Liu et al., 1997; Springer et al., 1999). Après quelques jours, on verra aussi beaucoup d'oligodendrocytes avec une morphologie apoptotique, qui peuvent être à plusieurs millimètres du site de lésion (Liu et al., 1997; Springer et al., 1999).

L'activation de la caspase-3, une des principales caspases effectrices de l'apoptose, a été démontrée dans un grand nombre de modèles de lésions du SNC (Eldadah and Faden, 2000). L'inhibition de cette caspase a d'ailleurs permis d'augmenter la survie neuronale après une lésion du nerf optique (Kermer et al., 1999a), de même qu'après une lésion traumatique au cerveau (Clark et al., 2000) ou dans un modèle d'ischémie cérébrale (Chen et al., 1998), confirmant la contribution de l'apoptose à la mort de neurones. On ne connaît

cependant pas spécifiquement les stimuli initiateurs de l'apoptose. L'activation de la caspase-9 a été rapportée dans plusieurs modèles, suggérant que la voie apoptotique intrinsèque est activée par un stress intracellulaire (Eldadah and Faden, 2000; Yakovlev and Faden, 2001; Weishaupt et al., 2003). L'implication de la caspase-8 semble avoir été moins étudiée, mais elle a été observée après des lésions traumatiques au cerveau (Zhang et al., 2003), des lésions du nerf optique (Weishaupt et al., 2003) et de la moelle épinière (Matsushita et al., 2000; Keane et al., 2001), suggérant l'implication de la voie apoptotique extrinsèque et de ses activateurs, les récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNFR) et Fas/CD95.

Plusieurs expériences associent le récepteur Fas ou son ligand, FasL, à la mort cellulaire résultant d'une lésion du SNC. Dans des tissus humains provenant de patients opérés à la suite d'un traumatisme crânien, on a observé une corrélation entre l'augmentation de Fas et celle de la caspase-8, alors que les niveaux de Fas étaient plus élevés chez les patients qui n'ont pas survécu au traumatisme (Zhang et al., 2003). Dans un modèle de section transversale de la moelle épinière chez la souris, une forte augmentation de FasL a été observée, maximale au jour 3 (Demjen et al., 2004). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-FasL a permis d'augmenter la régénération et d'améliorer la locomotion (Demjen et al., 2004). Aussi, l'utilisation de souris mutantes déficientes pour Fas a permis de diminuer la mort apoptotique des oligodendrocytes, de préserver la myéline et d'améliorer la locomotion 6 semaines après une compression de la moelle épinière,

suggérant une implication de Fas dans la mort apoptotique des oligodendrocytes et la démyélination (Casha et al., 2005).

Le TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) a aussi été impliqué dans la mort cellulaire après lésion du SNC. Dans un modèle de compression de la moelle épinière chez le rat, une forte augmentation de TNF $\alpha$  a été observée 1 heure après la lésion, suivie rapidement d'une augmentation de l'expression de iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) et de NO (Nitric Oxide). L'utilisation d'un anticorps neutralisant le TNF $\alpha$  a entraîné une diminution de iNOS, de NO et du nombre de cellules apoptotiques, suggérant un mécanisme où l'augmentation de TNF après la lésion induirait l'augmentation de iNOS et la production de NO, qui induirait ensuite l'apoptose (Lee et al., 2000; Yune et al., 2003). Après une ischémie cérébrale par occlusion de l'artère cérébrale médiane, l'utilisation d'anticorps anti-TNF $\alpha$  et anti-FasL a diminué la mortalité animale et permis de réduire de près de 70% le volume de lésion, 24 heures après la reperfusion (Martin-Villalba et al., 2001).

Ces résultats suggèrent que FasL et TNF $\alpha$  sont impliqués dans la mort cellulaire dans plusieurs types de lésion du SNC, mais leur contribution directe à l'initiation de l'apoptose n'est pas démontrée.

Finalement, il est intéressant de noter que l'apoptose peut être observée même lorsque le corps cellulaire se trouve très loin du site de lésion initial de l'axone. Hains et al ont observé l'apoptose de neurones dans le cortex moteur primaire à la suite d'une section

transversale de la voie corticospinale en T9 chez le rat (Hains et al., 2003). On observe également la mort de cellules ganglionnaires de la rétine à la suite d'une lésion du nerf optique, même lorsque la lésion s'effectue à plusieurs millimètres des corps cellulaires (Villegas-Perez et al., 1993; Berkelaar et al., 1994). De façon générale, il semble que les neurones soient plus à risque de mourir si l'axone lésé n'a pas de branches collatérales ou si la lésion se situe proximale aux collatérales (Batchelor and Howells, 2003). De plus, la mort surviendrait plus rapidement si la lésion axonale est près du corps cellulaire que si elle en est éloignée (Villegas-Perez et al., 1993). Bien qu'on ne connaisse pas encore le mécanisme par lequel les neurones meurent après une lésion de leur axone, ces résultats suggèrent qu'un support trophique rétrograde pourrait contribuer à prolonger leur survie.

Nos connaissances sur les mécanismes entraînant la mort cellulaire après une lésion du SNC augmentent constamment, mais le SNC est complexe et les enseignements tirés d'un modèle ne s'appliquent pas nécessairement à un autre. L'identification de ces mécanismes est cependant cruciale si on veut profiter du délai thérapeutique que la phase secondaire de dégénérescence nous accorde pour intervenir et limiter la mort cellulaire.

### **1.1.2. Inhibition de croissance**

On sait depuis longtemps que les neurones du SNC ne régénèrent pas spontanément leur axone après une lésion. Dès le début du vingtième siècle, Cajal notait l'absence de croissance des axones lésés, malgré la présence d'un bourgeonnement à l'extrémité du tronçon proximal de ces axones (Cajal, 1928). On a ensuite longtemps cru que les neurones

adultes lésés étaient incapables de régénérer un axone, malgré les travaux de Cajal et de ses étudiants et collaborateurs, qui suggéraient que des axones lésés pouvaient repousser dans l'environnement plus permissif d'un nerf périphérique (Cajal, 1928). Les techniques de l'époque ne permettant pas de confirmer l'origine des axones croissant dans le tissu greffé, ces résultats ont été mis en doute et pratiquement oubliés jusqu'au début des années 1980. À l'aide de techniques permettant de retracer l'origine des fibres nerveuses, Albert Aguayo et son équipe ont alors montré que des neurones de la moelle épinière (Richardson et al., 1980; David and Aguayo, 1981; Richardson et al., 1982; Richardson et al., 1984), du cerveau (Benfey and Aguayo, 1982) et de la rétine (So and Aguayo, 1985; Vidal-Sanz et al., 1987) pouvaient effectivement régénérer dans un greffon de nerf périphérique. Ils ont aussi montré que des cellules ganglionnaires de la rétine régénérant dans un nerf périphérique pouvaient sortir du greffon et pénétrer dans le collicule supérieur, leur cible principale chez les rongeurs, pour former des synapses fonctionnelles (Keirstead et al., 1985; Carter et al., 1989; Keirstead et al., 1989; Vidal-Sanz et al., 1991). Ces expériences confirmaient donc que plusieurs types de neurones adultes du SNC étaient capables de régénérer un axone, et suggéraient que l'absence de régénération spontanée était due à la nature non permissive de l'environnement du SNC. Au cours des 25 dernières années, on a beaucoup étudié cet environnement et on sait maintenant que les axones qui tentent de croître après une lésion du SNC sont exposés non seulement à la barrière physique que peut représenter la cicatrice gliale qui se forme au site de lésion, mais aussi à une multitude de

molécules inhibitrices sécrétées après une lésion par les cellules qui forment la cicatrice, ou présentes de façon constitutive dans la myéline.

#### **1.1.2.1. Molécules inhibitrices de la cicatrice gliale**

Après une blessure du SNC, on observe la formation d'une cicatrice au site de lésion (Fawcett and Asher, 1999; Silver and Miller, 2004). Cette cicatrice est principalement formée d'astrocytes réactifs, mais peut comprendre aussi d'autres types cellulaires tels que fibroblastes, macrophages, microglies et cellules précurseurs d'oligodendrocytes (Fawcett and Asher, 1999; Silver and Miller, 2004; Yiu and He, 2006). Bien que cette structure ait possiblement un effet protecteur pour le tissu lésé en circonscrivant la zone de la lésion (Faulkner et al., 2004; Silver and Miller, 2004), elle représente aussi une barrière à la régénération axonale. La cicatrice peut prendre plusieurs jours et même plusieurs semaines à se former complètement et peut alors devenir une barrière physique importante (Silver and Miller, 2004). Mais elle peut beaucoup plus rapidement représenter une barrière chimique pour les axones qui tentent de régénérer, puisque les cellules précurseurs d'oligodendrocytes et les astrocytes présents dans la cicatrice commencent à sécréter des molécules de protéoglycanes de type chondroïtine sulfate (CSPG pour chondroitin sulfate proteoglycans) dans les premières 24 heures après une lésion (Selles-Navarro et al., 2001; Tang, 2003). Ces molécules ont un corps protéique auquel s'attachent de façon covalente de longues chaînes d'hydrates de carbones, qu'on appelle des glycosaminoglycanes (GAG) (Morgenstern et al., 2002). La nature inhibitrice

de ces molécules pour les axones en croissance a été démontrée *in vitro* (McKeon et al., 1991; Dergham et al., 2002) et *in vivo*, quand la dégradation des chaînes de GAG par un traitement à la chondroïtinase a stimulé la régénération axonale dans des modèles de lésion de la moelle épinière (Bradbury et al., 2002; Houle et al., 2006) et de la voie nigrostriatale (Moon et al., 2001). En plus de sécréter des CSPG, les cellules qui forment la cicatrice semblent capables d'exprimer d'autres molécules inhibitrices ou répulsives pour les axones en croissance, telles que des sémaphorines et des éphrines (Fawcett and Asher, 1999; Pasterkamp and Verhaagen, 2001; Silver and Miller, 2004). Les récepteurs des sémaphorines et des éphrines sont identifiés, mais on ne connaît toujours pas l'identité des molécules par lesquelles les CSPG transmettent leur signal inhibiteur aux cellules. On sait par contre que toutes ces molécules activent des voies de signalisation intracellulaire qui mèneront à l'activation de la GTPase Rho. Comme nous le verrons plus tard, Rho est une molécule clé dans l'action des inhibiteurs de croissance, par son effet sur le cytosquelette au niveau du cône de croissance.

#### **1.1.2.2. Molécules inhibitrices de la myéline**

C'est Martin Berry, au début des années 1980, qui aurait été le premier à suggérer que la myéline du SNC puisse inhiber la régénération axonale (He and Koprivica, 2004). Depuis ce temps, plusieurs molécules inhibitrices de la croissance axonale présentes dans la myéline ont été identifiées. Les plus étudiées sont Nogo, myelin-associated glycoprotein (MAG) et oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp). On a également identifié un



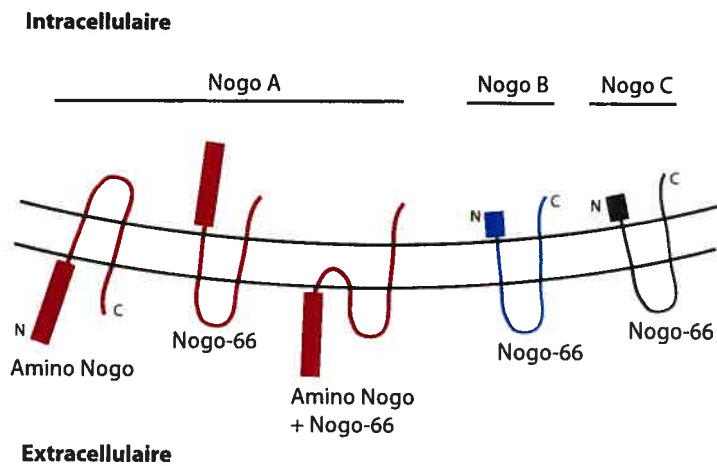
complexe de récepteur commun à ces 3 protéines, soit NgR/p75<sup>NTR</sup>-TROY/LINGO-1 (Nogo receptor/p75<sup>Neurotrophin receptor</sup>-TROY/LINGO-1).

#### 1.1.2.2.1. Nogo

L'effet inhibiteur de la myéline a été démontré en premier dans le laboratoire de Martin Schwab (Caroni and Schwab, 1988a, b). Caroni et Schwab ont montré que des protéines membranaires de la myéline inhibaient la croissance neuritique (Caroni and Schwab, 1988a). Ils ont généré des anticorps monoclonaux (IN-1 et IN-2) contre ces protéines inhibitrices, et leur utilisation a favorisé la croissance sur la myéline *in vitro* (Caroni and Schwab, 1988b). Deux ans plus tard, Schnell et Schwab publiaient dans Nature les résultats de l'utilisation *in vivo* de IN-1, qui stimulait la régénération axonale après une lésion complète de la voie corticospinale (Schnell and Schwab, 1990). C'est en 2000 que l'antigène de IN-1, Nogo, a finalement été cloné par 3 groupes différents (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; Prinjha et al., 2000). Nogo existe sous 3 isoformes, Nogo-A, Nogo-B et Nogo-C. Les 3 isoformes ont une partie C-terminale identique, de même que 2 domaines transmembranaires séparés par une boucle de 66 acides aminés (Nogo-66). Nogo-A possède une section N-terminale qui lui est spécifique, plus longue que celle de Nogo-B et C (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; Prinjha et al., 2000). Nogo-A est fortement exprimé dans le SNC, surtout dans les oligodendrocytes, mais aussi dans certains types de neurones, alors que les 2 autres isoformes sont largement exprimées à l'extérieur du SNC (Huber et al., 2002). Deux domaines inhibiteurs de croissance neuritique ont été identifiés

chez Nogo-A : Nogo-66, qu'on trouve aussi dans les autres isoformes et une section de la portion N-terminale spécifique à Nogo-A, qu'on nomme Amino-Nogo (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; Prinjha et al., 2000; Fournier et al., 2001). On ne sait pas avec certitude quels domaines de Nogo-A sont intracellulaires ou extracellulaires puisque plusieurs modèles de topologie membranaire ont été proposés et pourraient coexister *in vivo* (**Figure 1**) (GrandPre et al., 2000; Huber and Schwab, 2000; Oertle and Schwab, 2003). Une lésion du SNC brisant la myéline rendrait cependant ces domaines inhibiteurs accessibles aux axones, quelle que soit leur configuration initiale.

**Figure 1. Configurations membranaires de Nogo-A, -B et -C.**



**Figure 1. Configurations membranaires de Nogo-A, -B et -C.**  
 Nogo existe sous 3 isoformes: Nogo-A, Nogo-B et Nogo-C. Nogo-A pourrait avoir 3 topologies membranaires différentes, alors qu'une seule a été établie pour Nogo-B et Nogo-C.

#### **1.1.2.2.2. Myelin-Associated Glycoprotein (MAG)**

MAG est une protéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines, qu'on trouve uniquement dans la myéline. C'est la première protéine inhibitrice de la myéline à avoir été identifiée et cette identification a été faite simultanément par 2 groupes, en 1994 (McKerracher et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 1994). Contrairement à Nogo-A, qu'on ne retrouve que dans le SNC, MAG s'exprime à la fois dans les oligodendrocytes du SNC et dans les cellules de Schwann du SNP (Salzer et al., 1987; McGee and Strittmatter, 2003). Tant dans le SNC que dans le SNP, on trouve MAG dans les feuillettes internes de la myéline, donc à proximité des axones (Filbin, 2003). Il existe des formes solubles de MAG (sMAG) *in vivo* dans la matière blanche à la suite d'une lésion (Tang et al., 1997) et l'équipe de Marie Filbin a montré que sMAG contribue fortement à inhiber la croissance axonale (Tang et al., 2001). Il est intéressant de noter que si la croissance axonale de neurones adultes du SNC est inhibée par MAG, sa présence stimule la croissance de neurones en développement. Ce passage de la stimulation à l'inhibition se fait autour de la naissance, le moment exact variant selon le type de neurone (DeBellard et al., 1996).

#### **1.1.2.2.3. Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp)**

OMgp est une protéine d'environ 120 kDa, liée à la membrane par une ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) (Mikol and Stefansson, 1988). Bien qu'on l'ait

d'abord associée aux oligodendrocytes, il a plus tard été montré que c'était aussi une protéine neuronale dans le SNC (Habib et al., 1998). Une étude récente de David Colman et collègues suggère qu'OMgp serait surtout associée à des cellules de type oligodendrocyte, mais non myélinisantes, possiblement des cellules précurseurs d'oligodendrocytes localisées près des nœuds de Ranvier (Huang et al., 2005). Cette étude a aussi montré pour une première fois une faible présence d'OMgp dans le SNP. C'est en 2002 que 2 groupes ont parallèlement démontré qu'OMgp pouvait inhiber la croissance axonale (Kottis et al., 2002; Wang et al., 2002b) et l'étude du Dr Colman mentionnée plus tôt appuie ces résultats en suggérant qu'OMgp jouerait un rôle dans la formation des nœuds de Ranvier et contribuerait à bloquer le bourgeonnement axonal collatéral (Huang et al., 2005).

#### **1.1.2.2.4. Autres inhibiteurs dans la myéline**

En plus de Nogo, MAG et OMgp, on trouve aussi dans la myéline adulte d'autres molécules inhibitrices pour la croissance neuritique, telles les CSPG Versican V2 ou Brevican, dont l'effet inhibiteur sur la croissance axonale a été démontré *in vitro* (Yamada et al., 1997; Niederost et al., 1999; Schmalfeldt et al., 2000). Ces 2 CSPG s'expriment dans le SNC vers la fin du développement et leur expression persiste chez l'adulte (Seidenbecher et al., 1998; Schmalfeldt et al., 2000). L'expression de Versican V2 et de Brevican a été spécifiquement démontrée dans le nerf optique de souris et de rats adultes, et pourrait contribuer à l'inhibition de la régénération après une lésion du nerf optique.

### 1.1.2.3. Le complexe NgR/p75<sup>NTR</sup>-TROY/LINGO-1 : récepteur commun pour Nogo-66, MAG et OMgp

Un récepteur pour Nogo (NgR pour Nogo receptor) a été cloné en 2001 par l'équipe de Stephen Strittmatter (Fournier et al., 2001). La protéine, d'environ 85 kDa, est liée à la membrane par une ancre GPI. NgR est fortement exprimé dans le cerveau et son expression dans les neurones et leurs axones a été associée à plusieurs types neuronaux (Fournier et al., 2002b; McGee and Strittmatter, 2003). La première étude avec NgR montrait que le récepteur liait Nogo-66 avec une haute affinité, mais suggérait que NgR ne liait pas Amino-Nogo (Fournier et al., 2001). Une étude plus récente a cependant démontré qu'une partie de Amino-Nogo pouvait lier NgR, sans entraîner d'inhibition de croissance (Hu et al., 2005), à moins que cette liaison ne se fasse en même temps que la liaison de Nogo-66 au récepteur NgR. Cette combinaison de 2 domaines de Nogo-A créerait un ligand de plus haute affinité encore pour NgR que Nogo-66 seul et inhiberait fortement la croissance axonale (Hu et al., 2005). Cette combinaison serait possible *in vivo* puisqu'une des conformations membranaires suggérée pour Nogo-A est que Amino-Nogo et Nogo-66 se retrouvent tous les 2 du côté extracellulaire de la membrane plasmique des oligodendrocytes (Oertle et al., 2003) (**Figure 1**).

Moins d'un an après le clonage du récepteur, il a été démontré par les laboratoires de Stephen Strittmatter et de Marie Filbin que MAG était aussi un ligand pour NgR (Domeniconi et al., 2002; Liu et al., 2002). Toujours en 2002, en même temps qu'ils

identifiaient OMgp comme protéine inhibitrice de la croissance axonale, l'équipe de Zhigang He montrait que le récepteur d'OMgp était aussi NgR (Wang et al., 2002b).

Puisque le récepteur NgR est une protéine extracellulaire à ancre GPI, il n'a pas de domaine intracellulaire et doit donc interagir avec d'autres protéines pour transmettre son message inhibiteur. Toshihide Yamashita a d'abord démontré que p75<sup>NTR</sup>, un récepteur des neurotrophines de la famille des Tumor Necrosis Factor (TNF), était impliqué dans la transmission intracellulaire du signal de MAG (Yamashita et al., 2002). Quelques mois plus tard, l'association de p75<sup>NTR</sup> et de NgR dans la transmission des signaux de MAG, OMgp et Nogo était démontrée (Wang et al., 2002a; Wong et al., 2002). Un troisième partenaire à ce complexe de récepteur s'est ensuite ajouté quand il a été démontré qu'une protéine transmembranaire nommée LINGO-1 (pour LRR and Ig domain-containing, Nogo receptor interacting protein) liait NgR et p75<sup>NTR</sup> pour transmettre le signal des molécules inhibitrices (Mi et al., 2004). Finalement, le fait que p75<sup>NTR</sup> ne s'exprime pas dans plusieurs populations de neurones adultes a mené à la recherche d'un substitut pour ce co-récepteur. TROY, un autre membre de la famille des récepteurs de TNF aussi appelé TAJ, a été identifié comme partenaire de NgR et LINGO-1 dans la transmission du signal des inhibiteurs de la myéline (Park et al., 2005; Shao et al., 2005).

On a donc 3 protéines sans similitude de domaine ou de séquence apparente, qui utilisent un même complexe de récepteurs (NgR/p75<sup>NTR</sup>-TROY/LINGO-1) pour bloquer la croissance axonale. Un rôle pour NgR dans l'inhibition associée à Nogo-66, MAG et

OMgp a été bien établi *in vitro* (GrandPre et al., 2000; Fournier et al., 2001; Domeniconi et al., 2002; Fournier et al., 2002a; Liu et al., 2002; Wang et al., 2002b), mais l'importance réelle de NgR dans l'inhibition de la régénération axonale *in vivo* est toujours en discussion. En effet, si plusieurs études utilisant des antagonistes de NgR, des dominants négatifs de NgR, ou même des souris knock-out pour NgR suggèrent un rôle important de NgR dans l'inhibition de régénération après une lésion du SNC (GrandPre et al., 2002; Fischer et al., 2004a; Lee et al., 2004; Li et al., 2004; Li et al., 2005), des expériences récentes utilisant des souris knock-out pour le gène ne montrent aucune stimulation de régénération après lésion de la voie corticospinale par rapport aux témoins de type sauvage (Kim et al., 2004a; Zheng et al., 2005). Une explication de ce résultat pourrait être l'existence d'autres récepteurs capables de lier Nogo-66, MAG et OMgp et d'entraîner la transmission de leur signal. D'ailleurs, l'action inhibitrice de MAG en absence de NgR a été démontrée (Niederost et al., 2002) et des expériences récentes ont également démontré que MAG pourrait lier NgR2, un homologue de NgR (Venkatesh et al., 2005). Aussi, l'élimination du gène de NgR pourrait entraîner des effets compensatoires comme l'augmentation de l'expression de ces autres récepteurs ou des récepteurs d'autres inhibiteurs comme les CSPG ou Amino-Nogo.

Nous avons déjà mentionné que les molécules inhibitrices de la cicatrice gliale activaient la GTPase Rho. C'est ce que font aussi les molécules inhibitrices de la myéline. L'activation du complexe NgR/p75<sup>NTR</sup>-TROY/LINGO-1 mène effectivement à une voie de signalisation qui inclut l'activation de Rho, comme nous le verrons plus tard.



#### **1.1.2.4. Autres considérations relatives aux inhibiteurs de la régénération axonale**

Plusieurs facteurs extrinsèques peuvent ainsi affecter la capacité d'un neurone à régénérer, mais des facteurs intrinsèques influencent également la réponse neuronale. Un de ces facteurs qui a reçu beaucoup d'attention au cours des dernières années est l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). On sait maintenant que le niveau d'AMPC peut déterminer la direction du cône de croissance axonal en présence de MAG ou de myéline. En effet, en culture en présence d'AMPC élevé, les cônes de croissance de neurones spinaux de *Xénotopus* sont attirés par MAG ou par la myéline alors qu'ils sont repoussés par ces molécules quand le niveau d'AMPC est bas (Song et al., 1998). Certaines molécules de guidage peuvent aussi être attractives ou répulsives pour un neurone en fonction du niveau d'AMPC (Ming et al., 1997). Le niveau d'AMPC affecte aussi la croissance des neurones mis en culture sur des substrats inhibiteurs. Par exemple, sur un substrat de MAG, l'inhibition de croissance de neurones post-nataux (neurones du cervelet ou neurones des ganglions des racines dorsales) est abolie si l'AMPC est augmentée dans le milieu de culture (Cai et al., 1999). De même, l'augmentation du niveau d'AMPC par l'ajout de Forskolin dans le milieu de culture stimule la croissance de cellules granulaires du cervelet (P7-P8) sur un substrat normalement inhibiteur d'Amino-Nogo (Bandtlow, 2003).

Le niveau d'AMPC varie avec l'âge. L'équipe de Marie Filbin a montré en 2001, dans plusieurs types de neurones, que le niveau intracellulaire d'AMPC chutait dramatiquement à la fin du développement (Cai et al., 2001). Ils ont aussi démontré que

cette diminution du niveau d'AMPC coïncidait avec le moment où les neurones commençaient à être inhibés par MAG (Cai et al., 2001). Les neurones embryonnaires sont en effet capables de croître sur MAG, mais cette capacité est perdue à la naissance ou quelques jours plus tard, l'âge exact variant selon le type neuronal (Mukhopadhyay et al., 1994; DeBellard et al., 1996; Turnley and Bartlett, 1998). La diminution du niveau d'AMPC contribuerait donc à l'action des molécules inhibitrices, une hypothèse que viennent appuyer les expériences utilisant des lésions préalables (conditioning lesion) ou des neurotrophines pour stimuler la régénération axonale. Il a en effet été démontré que la régénération de la branche centrale de neurones des ganglions des racines dorsales est augmentée si on a fait une lésion préalable de la branche périphérique et que cette augmentation est associée à une hausse du niveau d'AMPC (Neumann and Woolf, 1999; Neumann et al., 2002b; Qiu et al., 2002). La diminution de l'effet inhibiteur de MAG ou de la myéline, observée quand des neurones en culture sont préalablement exposés à des neurotrophines, a aussi été associée à une augmentation du niveau d'AMPC (Cai et al., 1999; Gao et al., 2003). Ensemble, ces données suggèrent que l'augmentation du niveau d'AMPC pourrait être une condition nécessaire pour stimuler la croissance de neurones adultes dans l'environnement inhibiteur du SNC.

L'absence de régénération dans le SNC serait donc attribuable en grande partie à des facteurs extrinsèques, comme les molécules inhibitrices présentes au niveau de la cicatrice gliale et de la myéline, mais aussi à des facteurs intrinsèques aux neurones, comme la diminution du niveau d'AMPC chez l'adulte.

## **1.2. La GTPase Rho**

La GTPase Rho appartient à la famille Rho des petites protéines G, elle-même une composante de la superfamille des petites protéines G. Avant de parler spécifiquement de Rho, nous présenterons cette grande famille de protéines.

### **1.2.1. Les petites protéines G**

#### **1.2.1.1. Caractéristiques générales**

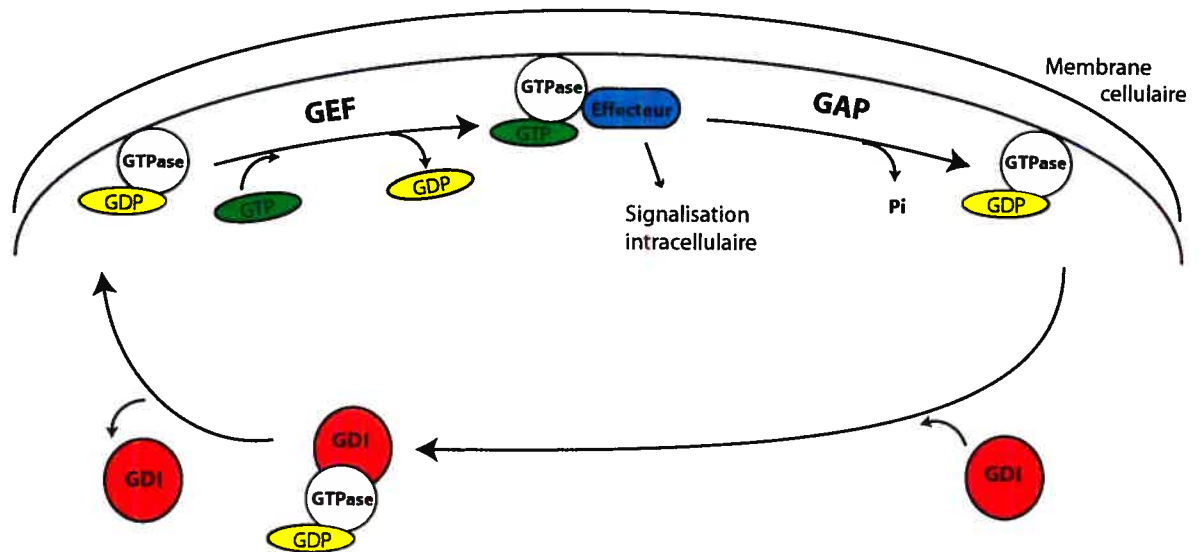
Les petites protéines G (nommées ainsi à cause de leur capacité à se lier à des nucléotides de guanosine) forment une superfamille de plus de 100 protéines monomériques de 20 à 40 kDa, séparées en 5 grandes familles en fonction de leur structure ; Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf et Ran (Takai et al., 2001). Elles sont impliquées dans un grand nombre de fonctions cellulaires dont les principales par famille sont l'expression génique (Ras), la régulation du cytosquelette et l'expression génique (Rho), la formation et le transport de vésicules (Rab et Sar1/Arf), l'organisation des microtubules de même que le transport entre le noyau et le cytosol (Ran) (Takai et al., 2001). Les petites protéines G agissent comme des interrupteurs moléculaires, qui peuvent déclencher ou terminer une fonction biochimique donnée en réponse à une variété de stimuli extracellulaires. Cette capacité est due au fait qu'elles alternent entre une conformation active, quand elles sont liées au guanosine triphosphate (GTP), et une conformation inactive, quand elle sont liées au guanosine diphosphate (GDP). L'activation de la petite protéine G prend fin quand celle-

ci actionne sa fonction GTPasique et transforme le GTP en GDP. C'est à cause de cette fonction intrinsèque que ces protéines sont aussi appelées des petites GTPases. Quand elles sont sous leur forme active, elles peuvent interagir avec des protéines effectrices et entraîner leur activation. Le mécanisme le plus commun par lequel les GTPases activeraient leurs effecteurs serait d'entraîner un changement de conformation chez ces derniers (Bishop and Hall, 2000). Le domaine fonctionnel de plusieurs des effecteurs serait en effet bloqué par des interactions moléculaires autoinhibitrices et la liaison de la GTPase modifierait leur conformation de façon à ce qu'ils deviennent actifs (Bishop and Hall, 2000; Mueller et al., 2005; Zhao and Manser, 2005).

#### **1.2.1.2. Régulateurs des petites protéines G**

Il existe 3 types de molécules qui régulent le passage entre les formes actives et inactives des petites GTPases ; les facteurs d'échange du nucléotide guanine (ou GEFs pour « guanine exchange factors »), les protéines activatrices de la GTPase (ou GAPs pour « GTPase activating proteins ») et les inhibiteurs de dissociation du nucléotide guanine (ou GDIs pour « guanine nucleotide dissociation inhibitors ») (Takai et al., 2001; DerMardirossian and Bokoch, 2005) (**Figure 2**).

Figure 2. Cycle de régulation des GTPases.



**Figure 2. Cycle de régulation des GTPases.** Les GTPases alternent entre un état inactif (liées au GDP) et un état actif (liées au GTP). Ce passage d'un état à l'autre est régulé par les GDIs, qui séquestrent les GTPases inactives dans le cytosol, par les GEFs, qui stimulent l'activation des GTPases, et par les GAPs, qui favorisent leur désactivation. GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors), GEFs (guanine exchange factors), GAPs (GTPase activating factors).

Les GEFs stimulent l'activation des GTPases en catalysant l'échange du GDP pour le GTP, un processus intrinsèquement lent. Les GAPs contribuent à l'inactivation des GTPases en accélérant l'hydrolyse du GTP en GDP, un autre processus relativement lent. Finalement, les GDIs empêchent l'échange du GDP pour le GTP et séquestrent donc les GTPases dans leur forme inactive (Takai et al., 2001). On a identifié des GEFs et des GAPs dans toutes les familles de petites GTPases, mais l'existence des GDIs n'a été démontrée que dans les familles Ran, Rab et Rho jusqu'ici (Takai et al., 2001).

### **1.2.2. La famille Rho des petites GTPases**

On a identifié jusqu'ici plus de 20 membres de cette famille chez les mammifères (Jaffe and Hall, 2005; Rossman et al., 2005) et parmi eux, les mieux étudiés et caractérisés sont Rho, Rac et Cdc42. Rho a 3 isoformes principales (RhoA, RhoB et RhoC), Rac en a aussi 3 (Rac1, Rac2 et Rac3), et Cdc42 n'en a qu'une (Jaffe and Hall, 2005). Dans la littérature, on réfère souvent à ce groupe de 7 protéines par le terme « Rho GTPases ». C'est aussi ce que je ferai pour la suite de ce texte, alors que les termes Rho ou Rac désigneront les 3 isoformes de leur groupe respectif.

### 1.2.2.1. Structure et caractéristiques générales.

Les Rho GTPases, comme les autres petites protéines G, possèdent 2 régions qu'on appelle « switch 1 » et « switch 2 », qui changent de conformation selon leur liaison au GDP ou au GTP. et qui sont importantes pour l'interaction des GTPases avec leurs partenaires cellulaires (Vetter and Wittinghofer, 2001; Rossman et al., 2005). Elles ont aussi un site de liaison pour le  $Mg^{2+}$ , qui est requis pour stabiliser la liaison du nucléotide (Rossman et al., 2005). Dans les cellules au repos, les Rho GTPases se trouvent principalement dans le cytosol, dans leur conformation inactive (c.-à.d. liée au GDP) et associées aux GDIs (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997; Olofsson, 1999). Pour pouvoir être activées par les GEFs et jouer leur rôle biologique, les GTPases doivent non seulement se dissocier du GDI, mais elles doivent aussi s'associer à la membrane plasmique. Les GTPases possèdent donc en C-terminal un domaine contenant une cystéine qui servira de site d'attache pour l'ajout de 1 ou 2 groupes lipidiques farnésyl ou géranyl. Cette modification post-traductionnelle permettra aux GTPases de s'ancrer à la membrane et d'être activées (Olofsson, 1999; Wennerberg and Der, 2004; Dransart et al., 2005).

### 1.2.2.2. Régulation des Rho GTPases

L'ajout de lipides en C-terminal constitue une forme de régulation des GTPases puisque leur activation et fonction sont dépendantes de leur ancrage aux membranes (Wennerberg and Der, 2004). Cependant, ce sont les GDIs, GEFs et GAPs qui sont les régulateurs les mieux caractérisés des Rho GTPases (**Figure 2**). Comme nous l'avons

mentionné plus tôt, les GDIs séquestrent les GTPases inactives (ie liées au GDP) dans le cytosol jusqu'à leur activation par les GEFs (échange GDP pour GTP), alors que les GAPs contribuent à désactiver les GTPases (ie hydrolyse du GTP en GDP).

#### **1.2.2.2.1. Régulation par les inhibiteurs de dissociation du nucléotide guanine (GDIs)**

La première GDI a été identifiée à la fin des années 1980, dans le laboratoire de Yoshimi Takai (Sasaki and Takai, 1998). À ce jour, seulement 3 GDIs pouvant agir sur les Rho GTPases ont été identifiées (Olofsson, 1999; DerMardirossian and Bokoch, 2005; Dovas and Couchman, 2005; Dransart et al., 2005). L'expression de RhoGDI-1 est ubiquitaire, alors que RhoGDI-2 est exprimé seulement dans les cellules hématopoïétiques et que RhoGDI-3 est surtout exprimé dans le cerveau (Olofsson, 1999; Dransart et al., 2005). RhoGDI-1 peut lier RhoA, RhoC, Rac1, Rac2 et Cdc42, mais sa capacité à lier RhoB est controversée (DerMardirossian and Bokoch, 2005). RhoGDI-2 peut lier RhoA, Rac1, Rac2 et Cdc42, alors que RhoGDI-3 ne lierait que RhoB (DerMardirossian and Bokoch, 2005). Les souris RhoGDI-1 *-/-* sont viables, mais présentent des problèmes de reproduction et meurent à l'intérieur d'un an à cause de problèmes rénaux (Togawa et al., 1999). Les souris RhoGDI-2 *-/-* sont viables mais présentent certains problèmes de réponse immunitaire (Yin et al., 1997).

Globalement, on peut dire que les RhoGDIs exercent leur régulation des Rho GTPases en contrôlant leur changement de localisation, c.-à-d. leur alternance entre membrane et cytosol (Olofsson, 1999; Wennerberg and Der, 2004; DerMardirossian and



Bokoch, 2005; Dransart et al., 2005). Au repos, les Rho GTPases sont dans le cytosol, sous leur forme inactive liée au GDP, et elles sont associées aux GDIs, qui bloquent la dissociation de GDP. Quand elles sont détachées des RhoGDIs, les Rho GTPases peuvent s'associer à la membrane et être activées par les GEFs, et il est possible que les GDIs puissent cibler les GTPases à des membranes spécifiques en se liant à d'autres protéines ou par phosphorylation (Wennerberg and Der, 2004; Dransart et al., 2005). À la fin du cycle d'activation de la GTPase, les RhoGDIs pourraient les extraire de la membrane pour les séquestrer à nouveau dans le cytosol (Olofsson, 1999; Dovas and Couchman, 2005). Les RhoGDI pourraient aussi se lier à des Rho GTPases actives, donc liées au GTP, et cette association bloquerait à la fois l'hydrolyse du GTP et la liaison aux effecteurs (Scita et al., 2000; DerMardirossian and Bokoch, 2005).

Il y a été montré que la phosphorylation des Rho GTPases peut augmenter leur association aux GDIs (Forget et al., 2002). L'état de phosphorylation des RhoGDIs pourrait également affecter cette association (Ridley, 2001; DerMardirossian and Bokoch, 2005).

#### **1.2.2.2. Régulation par les facteurs d'échange nucléotidiques (GEFs)**

La première GEF a été identifiée vers la fin des années 1980 (Eva et al., 1988; Hart et al., 1991) à partir d'une lignée cellulaire appelée « Diffuse B-cell lymphoma », d'où le nom de Dbl qui lui a été attribué. Il y a environ 60 GEF de type Dbl et une dizaine d'une nouvelle famille Dock (Wennerberg and Der, 2004). Les GEFs de la famille Dbl ont en commun un domaine DH, pour « Dbl homology », et un domaine PH pour « plectstrin

homology ». Le domaine DH est responsable de catalyser l'échange du GDP pour le GTP, alors que le domaine PH peut lier les lipides et pourrait servir à localiser les GEFs à la membrane plasmique (Schmidt and Hall, 2002; Rossman et al., 2005). Les GEFs pourraient participer directement ou indirectement à la dissociation des Rho GTPases d'avec les GDIs avant de catalyser l'échange GDP pour GTP (Groysman et al., 2000). C'est en modifiant la conformation des régions « switch 1 » et « switch 2 » que les GEFs contribueraient à l'éjection du GDP et du  $Mg^{2+}$  (Rossman et al., 2005).

Les GEFs seraient eux-mêmes activés par phosphorylation ou par interaction protéine-protéine, mais de façon générale, leurs mécanismes d'activation sont mal connus (Schmidt and Hall, 2002; Hall, 2005). On ne connaît pas les mécanismes associés à leur désactivation, mais des protéines ont été identifiées qui semblent être capables d'inhiber les GEFs (Schmidt and Hall, 2002).

Il existe au moins 3 fois plus de GEFs que de GTPases et il y a beaucoup de variabilité dans la spécificité des GEFs pour les GTPases. Certains GEFs peuvent lier plusieurs Rho GTPases alors que d'autres GEFs ont une haute affinité pour une seule GTPase (Schmidt and Hall, 2002). La grande variété de GEFs, de même que la présence d'autres domaines que DH et PH suggèrent qu'ils ont d'autres fonctions que celle d'activer les GTPases. Une intéressante possibilité envisagée est que les GEFs puissent influencer le choix des effecteurs qu'activera la Rho GTPase active (Schmidt and Hall, 2002; Govek et al., 2005). De récentes études suggèrent que cette participation à la spécification des voies

activées par les GTPases se fasse par l'association des GEFs avec des protéines d'échaffaudage (scaffold proteins) qui lieraient le GEF et la GTPase à des effecteurs spécifiques (Buchsbaum et al., 2002; Jaffe et al., 2004).

On n'a pas encore identifié les GEFs associés à l'activation des récepteurs des molécules inhibitrices de la cicatrice gliale ou de la myéline. Si on les connaissait, on pourrait bloquer les effets des molécules inhibitrices en réprimant spécifiquement l'action des GEFs, ce qui représenterait une alternative intéressante à l'inactivation totale de Rho par des antagonistes de cette GTPase.

#### **1.2.2.2.3. Régulation par les activateurs d'activité GTPasique (GAPs)**

La première GAP associée à la famille des Rho GTPases a été identifiée en 1991 (Diekmann et al., 1991). Les études du génome suggèrent qu'il y en aurait près de 80 chez l'humain (Wennerberg and Der, 2004). Elles sont caractérisées par un domaine appelé « RhoGAP domain » d'environ 150 acides aminés et leur fonction est d'inactiver les Rho GTPases en accélérant l'activité GTPasique intrinsèque de la GTPase (Moon and Zheng, 2003). Tout comme c'était le cas pour les GEFs, il y a beaucoup de variabilité dans la spécificité des GAPs pour les GTPases.

On sait peu de choses sur les mécanismes de recrutement et d'activation des GAPs, mais la phosphorylation, les interactions protéines-protéines et la liaison de lipides pourraient réguler leur activité (Moon and Zheng, 2003). De plus, les RhoGAPs possèdent

plusieurs autres domaines que le « GAP domain », incluant des motifs de kinase, de GEFs, de liaison aux protéines et aux lipides, suggérant qu'elles sont impliquées dans d'autres fonctions cellulaires en plus de leur fonction GAP de désactivation des GTPases (Moon and Zheng, 2003).

### **1.2.2.3. Rôles biochimiques et biologiques des Rho GTPases.**

Les Rho GTPases (Rho, Rac et Cdc42) ont d'abord été reconnues au début des années 1990 pour leur capacité à moduler le cytosquelette d'actine de diverses façons dans les fibroblastes (Hall, 1998; Takai et al., 2001). L'activation de Rho menait à la formation de fibres de stress, composées de filaments contractiles d'actine et de myosine, et de complexes d'adhésion (Ridley and Hall, 1992). L'activation de Rac menait à l'assemblage d'un réseau de filaments d'actine qui formait des lamellipodes, alors que l'activation de Cdc42 entraînait la formation de filopodes, de fins prolongements membranaires contenant de longs filaments d'actine (Hall, 1998). On a ensuite trouvé que les Rho GTPases étaient impliquées dans la majorité, sinon toutes, des fonctions cellulaires associées à une modification du cytosquelette d'actine telles que la migration, l'adhésion, la morphogenèse, la phagocytose et une fonction très importante pour nous soit la croissance axonale (Kaibuchi et al., 1999; Chimini and Chavrier, 2000; Luo, 2002). L'implication des Rho GTPases dans l'expression génique, la régulation des microtubules, la mort cellulaire, l'établissement de la polarité cellulaire et la progression du cycle cellulaire a aussi été démontrée (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997; Etienne-Manneville and Hall, 2002;

Dubreuil et al., 2003). La multitude de fonctions cellulaires auxquelles participent les Rho GTPases se reflète dans le grand nombre d'effecteurs identifiés à ce jour, soit plus de 50, dont plusieurs sont des kinases (Jaffe and Hall, 2005).

Les Rho GTPases sont impliquées dans des fonctions spécifiques aux neurones telles la neuritogenèse, l'établissement de la polarité neuronale, l'élaboration des dendrites et épines dendritiques ainsi que le maintien de la plasticité dendritique, essentielle aux processus d'apprentissage et de mémoire (Govek et al., 2005). Dans chacune de ces fonctions, l'activation de Rac ou Cdc42 est globalement associée à la formation et à l'élongation des neurites (dendrites ou axone), alors que l'activation de Rho est associée à l'inhibition de la formation de neurites ou à leur rétraction. Par exemple, l'utilisation de dominants négatifs de Rac1 ou Cdc42 inhibe la formation de neurites dans des cellules PC12 différenciées en neurones par l'ajout de facteur de croissance neuronal (nerve growth factor (NGF)) (Aoki et al., 2004). Par ailleurs, l'utilisation d'une protéine Rho constitutivement active empêche la formation de neurites dans des cellules de l'hippocampe en culture ou dans des cellules PC12 traitées au NGF, alors que l'inactivation de Rho ou l'utilisation d'un dominant négatif de Rho stimule la formation de neurites (Sebok et al., 1999; Da Silva et al., 2003).

Les Rho GTPases sont aussi associées à deux autres processus critiques pour les neurones. D'une part, Rho, Rac et Cdc42 sont impliquées dans le guidage de l'axone vers sa cible lors du développement. D'autre part, après une lésion axonale, Rho est une

molécule clé dans l'absence de régénération axonale par son implication dans la voie de signalisation des molécules inhibitrices. Voyons maintenant de façon plus détaillée comment les Rho GTPases sont impliquées dans ces deux processus.

#### **1.2.2.4. Implication des Rho GTPases dans le guidage axonal**

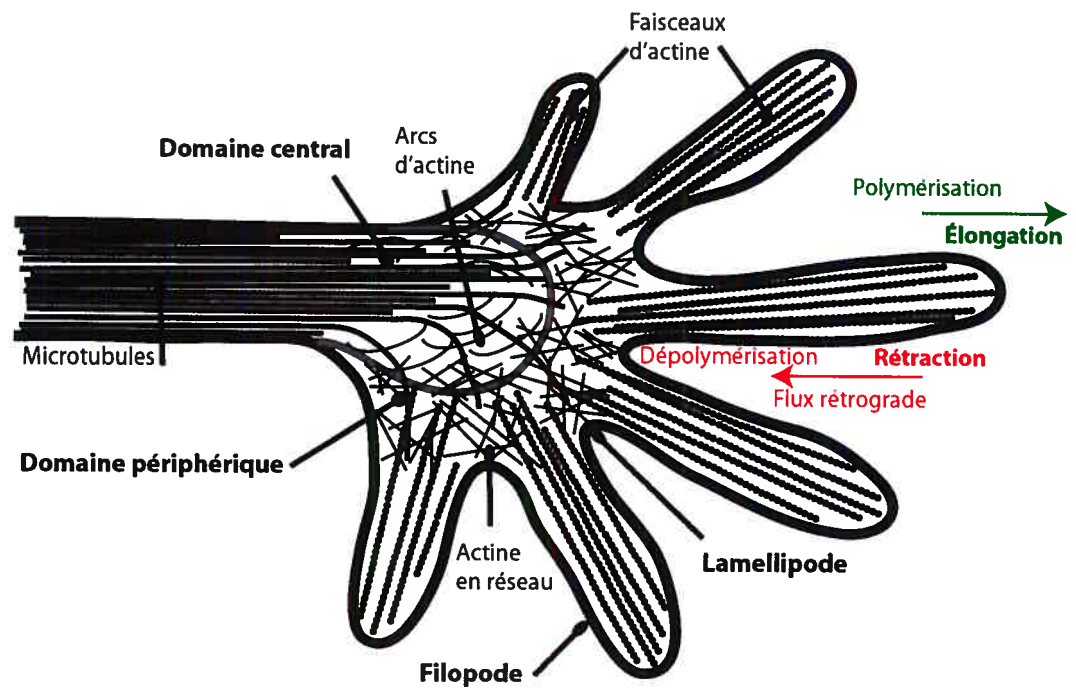
Les axones en développement (ou en régénération) doivent trouver le chemin vers leur cible dans un environnement complexe. Diverses molécules de guidage se trouvent sur ce chemin pour guider l'axone. Celui-ci possède à son extrémité distale une structure appelée cône de croissance, qui interagit avec les molécules de guidage et transforme leur signal de façon à entraîner l'avancement, le virage ou même l'arrêt de l'axone. Ces mouvements du cône de croissance sont grandement dépendants de la réorganisation du cytosquelette d'actine, et les Rho GTPases sont impliquées dans cette réorganisation. Regardons cela un peu plus en détail.

##### **1.2.2.4.1. Le cône de croissance et les molécules de guidage**

Le cône de croissance est une structure spécialisée qu'on retrouve à l'extrémité des neurites en croissance et qui a pour tâche de les guider vers leur cible finale (Huber et al., 2003) (**Figure 3**). Le cône de croissance peut être séparé en un domaine périphérique, qui comprend des filopodes et des lamellipodes, et un domaine central, qui rejoint la partie proximale de l'axone (Gungabissoon and Bamberg, 2003). Les filopodes sont de fines extensions membranaires remplies de faisceaux de filaments d'actine qui explorent

l'environnement en s'allongeant et se rétractant à partir du domaine périphérique du cône. Il s'agit des principales structures impliquées dans l'exploration de l'environnement et l'interaction avec les molécules de guidage (Huber et al., 2003; Maskery and Shinbrot, 2005). Ces filopodes sont reliés entre eux par des lamellipodes, des feuilletts membranaires aplatis contenant des filaments d'actine en réseau (Maskery and Shinbrot, 2005). On trouve aussi des structures d'actine (actine « en arc ») dans le domaine central du cône, où le cytosquelette demeure principalement constitué de microtubules (MT) (Dent and Gertler, 2003). Les MT peuvent s'étirer jusque dans les filopodes, dans le domaine périphérique (Dent and Gertler, 2003).

**Figure 3. Le cône de croissance.**



**Figure 3. Le cône de croissance.** Situé à l'extrémité des dendrites ou axones, le cône de croissance guide le neurite vers sa cible. Le cytosquelette d'actine est en réorganisation constante pour favoriser l'élongation ou la rétraction des filopodes en fonction de l'environnement.



Le cône de croissance exprime à sa surface des récepteurs qui interagissent avec les molécules de guidage qu'il rencontre. Il y a 4 familles principales de molécules de guidage : les nétrines, les sémaphorines, les slits et les éphrines (Huber et al., 2003; Koeberle and Bahr, 2004; Govek et al., 2005; Maskery and Shinbrot, 2005; Chilton, 2006).

Les nétrines sont des molécules diffusibles qui ont d'abord été identifiées par leur capacité d'attraction (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). On sait maintenant qu'elles peuvent exercer un effet répulsif ou attractif sur le cône de croissance. L'effet attractif se fait par l'intermédiaire des récepteurs DCC (deleted in colorectal cancer) ou Neogenin et est favorisé par une forte concentration de  $Ca^{2+}$  ou d'AMPC, ou par une faible concentration de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Le récepteur UNC-5 est associé à l'effet répulsif des nétrines et cet effet est stimulé par les concentrations inverses en  $Ca^{2+}$ , AMPC ou GMPc de celles qui favorisent l'attraction (Chilton, 2006).

Les sémaphorines forment une famille de molécules diffusibles ou liées aux membranes, réparties en plusieurs classes. Reconnues d'abord pour leur effet répulsif sur le cône de croissance (on les a d'abord appelé des « collapsines ») (Luo et al., 1993), leur capacité attractive a été démontrée (Song et al., 1998; Ming et al., 2001). Les niveaux de  $Ca^{2+}$  et de nucléotides cycliques sont impliqués dans cette dualité d'action. Les récepteurs

des sémaphorines sont les plexines, qui doivent cependant s'associer aux neuropilines pour interagir avec la majorité des sémaphorines de classe 3 (Kruger et al., 2005).

Les slits sont des molécules sécrétées, à effet principalement répulsif, qui ont d'abord été caractérisées pour leur rôle dans la répulsion des axones après leur traversée de la ligne médiane lors du développement (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999). Elles se lient aux récepteurs Robo pour exercer leur action. Un effet attractif de slit-2 a été démontré, qui aurait un rôle dans la formation de branches collatérales, mais on ne sait pas si cet effet passe par l'interaction avec un récepteur Robo (Wang et al., 1999).

Les éphrines sont des protéines à ancre GPI (éphrines A) ou transmembranaires (éphrines B), qui lient respectivement les récepteurs Eph-A et Eph-B. Les éphrines ont été identifiées comme ligands des récepteurs Eph vers le milieu des années 1990 (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998). Éphrines et récepteurs Eph sont impliqués entre autres dans l'établissement de la topographie ordonnée des projections axonales, notamment dans le système visuel (Koeberle and Bahr, 2004). Comme les slits et les sémaphorines, ce sont des molécules principalement reconnues pour leur effet répulsif sur le cône de croissance, mais pour lesquelles un effet attractif a aussi été démontré (Holmberg and Frisen, 2002). Une particularité intéressante des complexes éphrines/Eph est que la signalisation est bi-directionnelle, c'est à dire que la liaison des 2 molécules peut induire une réponse autant dans la cellule à laquelle est attachée l'éphrine que dans celle à laquelle est lié le récepteur (Huber et al., 2003).

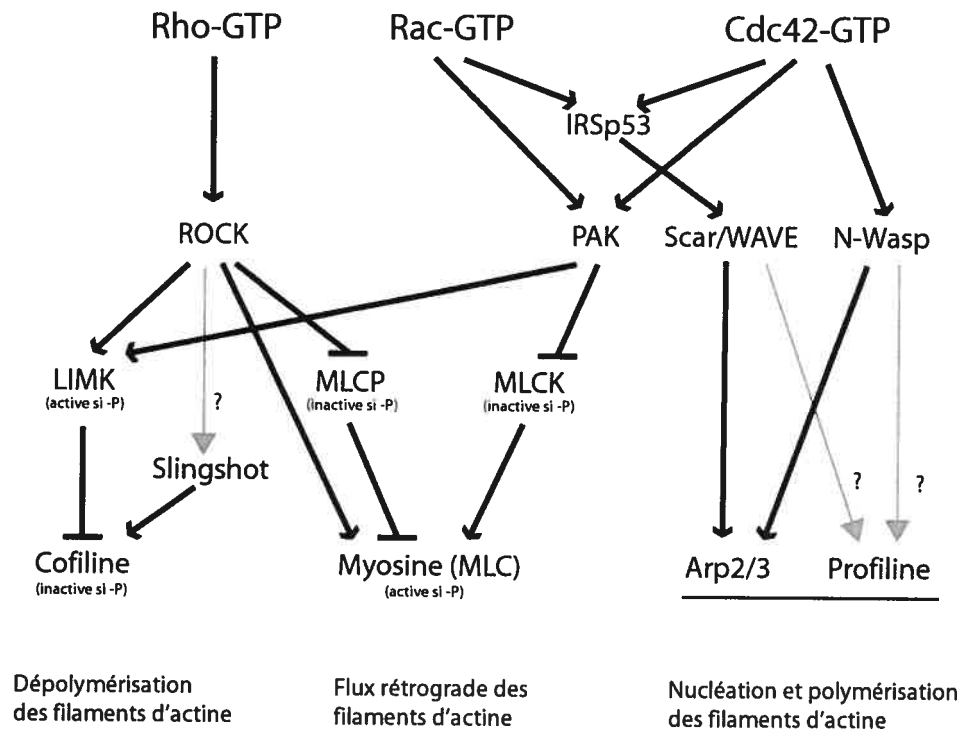
Par l'intermédiaire de leurs récepteurs, toutes ces molécules de guidage activent des voies de signalisation qui affectent l'état d'activation d'une ou plusieurs Rho GTPases. Les changements au cytosquelette qui en résultent détermineront la direction du cône de croissance, qui dépend donc de la combinaison des signaux attractifs et répulsifs présents dans l'environnement. Ces mécanismes de guidage de l'axone devraient se réactiver lors de la régénération et combiner leurs effets sur le cône de croissance à ceux des autres signaux présents, notamment les molécules inhibitrices de la myéline et de la cicatrice gliale.

#### **1.2.2.4.2. Les Rho GTPases et la régulation du cytosquelette d'actine**

Les mouvements du cône de croissance sont dépendants de la polymérisation et de la dépolymérisation de filaments d'actine, de même que du flux rétrograde des filaments d'actine vers la partie centrale du cône (Gungabissoon and Bamberg, 2003; Huber et al., 2003). Les Rho GTPases affectent ces processus en régulant l'action de diverses protéines de liaison à l'actine et cette régulation se fait par l'intermédiaire de leurs effecteurs, tels ROCK ou PAK, et d'autres protéines, dont des kinases et phosphatases (Luo, 2002; Huber et al., 2003) (**Figure 4**). Les protéines de liaison à l'actine impliquées dans la régulation du cône de croissance sont principalement la profiline, le complexe Arp2/3, la cofiline et la myosine (Bishop and Hall, 2000; Huber et al., 2003). L'activation de Arp2/3 et de la profiline contribuent à la nucléation et à la polymérisation des filaments d'actine, alors que celle de la cofiline stimule leur brisure et leur dépolymérisation (Dickson, 2001; Gungabissoon and Bamberg, 2003; Huber et al., 2003). De son côté, l'activation de la

myosine stimule sa liaison aux filaments d'actine et accélère le flux rétrograde des filaments (Luo, 2002; Huber et al., 2003).

**Figure 4. Régulation de l'actine par les Rho GTPases.**



**Figure 4. Régulation de l'actine par les Rho GTPases.** Les Rho GTPases activées exercent leur régulation sur les filaments d'actine principalement par leur action sur cofiline, myosine, Arp 2/3 et profiline, par l'intermédiaire de protéines effectrices des GTPases. MLC (myosin light chain), MLCP (myosin light chain phosphatase), MLCK (myosin light chain kinase).

De façon générale, on associe l'activation de Rac ou de Cdc42 à l'action de molécules attractives ou permissives et donc à la progression du cône et l'élongation des neurites, alors que l'activation de Rho est associée à l'action des molécules répulsives ou inhibitrices et donc à la rétraction du cône et à l'arrêt de croissance (Nikolic, 2002; Patel and Van Vactor, 2002). Rac et Cdc42 vont favoriser l'élongation en stimulant la nucléation et la polymérisation de l'actine par leurs effets sur le complexe Arp2/3 et sur la profiline (Bishop and Hall, 2000; Dickson, 2001). Rac et Cdc42 vont aussi limiter le flux rétrograde d'actine en phosphorylant et inactivant la kinase de la chaîne légère de la myosine (myosin light chain kinase (MLCK)), ce qui aura pour effet d'empêcher la phosphorylation et l'activation de la myosine (plus spécifiquement de la chaîne légère de la myosine ou « myosin light chain » MLC) (Bishop and Hall, 2000; Huber et al., 2003). De son côté, Rho va accélérer le flux rétrograde d'actine par l'action de sa kinase effectrice ROCK, qui va favoriser l'activation de la myosine de 2 façons. ROCK va d'une part directement phosphoryler et activer la myosine, et d'autre part phosphoryler et inactiver la phosphatase de la MLC (MLCP), bloquant ainsi la déphosphorylation et l'inactivation de la myosine (MLC) (Bishop and Hall, 2000; Luo, 2002; Huber et al., 2003). Rho va aussi favoriser la dépolymérisation de l'actine, en activant la cofiline par l'action indirecte de ROCK sur la phosphatase Slingshot, qui va déphosphoryler et activer la cofiline (Hsieh et al., 2006). La dépolymérisation accrue des filaments d'actine et la stimulation du flux rétrograde

contribueraient donc à l'arrêt de croissance ou à la rétraction du cône de croissance à la suite de l'activation de Rho.

#### **1.2.2.5. Implication de Rho dans l'inhibition de la régénération**

Au cours des dernières années, on a vu dans la littérature un intérêt pour la GTPase Rho dans les études associées à la régénération après lésion du SNC. Cet intérêt vient du fait que Rho a été associé au blocage de la régénération quand un lien a été établi entre des molécules inhibitrices de croissance et l'activation de Rho. Avant de présenter les expériences qui ont démontré ce lien entre Rho et des inhibiteurs de croissance, nous présenterons brièvement un outil important pour ces expériences, soit C3, un inhibiteur de Rho.

C3 est une exoenzyme bactérienne de *C. botulinum*, capable d'inactiver spécifiquement les Rho GTPases RhoA, B et C, sans affecter Rac et Cdc42 (Fritz and Aktories, 1994; Bobak, 1999; Lehmann et al., 1999). C3 est donc couramment utilisé pour bloquer l'action de Rho et déterminer si la GTPase est impliquée dans une fonction donnée. C3 est une ADP-ribosyltransférase qui enlève un groupement ADP-ribose de  $\text{NAD}^+$  pour le transférer en Asn41 de Rho (Schmidt and Aktories, 1998). Il est intéressant de noter que l'ADP-ribosylation peut se faire autant sur Rho actif (Rho-GTP) que sur Rho inactif (Rho-GDP), et qu'elle n'empêche ni la liaison de Rho actif à ses effecteurs, ni l'activité

GTPasique intrinsèque ou extrinsèque (Aktories et al., 2004). Le mécanisme exact qui explique pourquoi l'ADP-ribosylation du résidu 41 inactive Rho n'est pas déterminé, mais les hypothèses les plus probables sont que cette action empêche l'activation de Rho par les GEFs et séquestre Rho dans son complexe avec Rho-GDI (Genth et al., 2003; Aktories et al., 2004).

Sous sa forme native, C3 traverse difficilement les membranes et doit être utilisé en forte concentration pour exercer son effet (Winton et al., 2002; Aktories et al., 2004). Une forme modifiée de C3, C3-05, a donc été développée dans notre laboratoire pour faciliter l'entrée de C3 dans les cellules (Winton et al., 2002). La modification consiste en l'ajout d'une séquence de transport en C-terminal, facilitant son passage à travers les membranes et permettant son utilisation en faible concentration (Winton et al., 2002). À titre d'exemple, C3-05 stimule la croissance neuritique de cellules PC12 différenciées et mises en culture sur de la myéline à des concentrations aussi basses que 0,0025 µg/ml, alors qu'une dose de 2,5 µg/ml de C3 n'avait aucun effet, et qu'une dose de 25 µg/ml de C3 n'était efficace que si sa pénétration dans les cellules était favorisée mécaniquement avec un grattoir à cellules (Winton et al., 2002). D'autres versions similaires ont aussi été créées et utilisées par notre laboratoire, telles que C3-07 et C3-11 (Dubreuil et al., 2003; Bertrand et al., 2005; Bertrand et al., 2007). Elles ont toutes la même activité enzymatique d'ADP-ribosyltransférase, et diffèrent principalement par leur méthode de purification (Bertrand et al., 2007).



#### 1.2.2.5.1. Lien entre les molécules inhibitrices/répulsives et l'activation de Rho

Avant que le lien ne soit fait entre l'activation de Rho et l'inhibition de croissance par les molécules inhibitrices de la myéline, il avait été démontré que l'activation de Rho était associée à la rétraction de neurites de cellules en culture mises en présence d'acide lysophosphatidique (LPA) (Jalink et al., 1994; Tigyí et al., 1996). En effet, l'utilisation de C3 abolissait le collapsus des cônes de croissance causé par l'ajout de LPA dans le milieu de culture de cellules PC12. Parallèlement, d'autres expériences montraient que des molécules inhibitrices ou répulsives entraînaient le collapsus des cônes de croissance (Fan et al., 1993; Li et al., 1996). Ensemble, ces résultats suggéraient que Rho pouvait être impliqué dans l'arrêt de croissance associé aux molécules inhibitrices. Depuis ce temps, l'activation de Rho par la majorité des molécules inhibitrices de croissance a été démontrée directement, par des essais « pull down » qui permettent de détecter Rho sous sa forme active (liée au GTP), ou indirectement, par l'utilisation de C3 qui permet de bloquer l'activation de Rho. Ces 2 approches ont permis de montrer que Rho est activé, *in vitro*, par **la myéline** (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002; Winton et al., 2002; Dubreuil et al., 2003), **MAG** (Lehmann et al., 1999; Niederost et al., 2002; Yamashita et al., 2002; Dubreuil et al., 2003; Mi et al., 2004; Park et al., 2005; Shao et al., 2005), **Nogo-66** (Niederost et al., 2002; Fournier et al., 2003; Mi et al., 2004; Park et al., 2005; Shao et al., 2005; Alabed et al., 2006), **Amino-Nogo** (Niederost et al., 2002; Schweigreiter et al.,

2004), **OMgp** (Mi et al., 2004; Park et al., 2005; Shao et al., 2005) et **les CSPG** (Dergham et al., 2002; Borisoff et al., 2003; Monnier et al., 2003; Jain et al., 2004; Schweigreiter et al., 2004). L'activation de Rho est aussi associée à l'effet de molécules de guidage répulsives telles que des éphrines (Shamah et al., 2001; Grunwald and Klein, 2002; Huot, 2004; Sandvig et al., 2004), des sémaphorines (Hu et al., 2001; Grunwald and Klein, 2002; Sandvig et al., 2004; Kruger et al., 2005) et des molécules de guidage répulsives-a (repulsive guidance molecules a (RGMa) (Hata et al., 2006).

Plusieurs groupes ont aussi démontré l'implication de ROCK dans la signalisation des molécules inhibitrices. ROCK est un des effecteurs de Rho. C'est une kinase à sérine/thréonine qui existe sous 2 isoformes, ROCKI (aussi appelée Rok $\beta$  ou p160ROCK) et RockII (aussi appelée Rok $\alpha$ ) (Mueller et al., 2005). Les 2 isoformes sont exprimées de façon ubiquitaire chez le rat, avec une expression plus abondante de ROCKII dans le cerveau (Riento and Ridley, 2003). ROCK est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine (Leung et al., 1996; Ishizaki et al., 1997) et, à l'aide d'inhibiteurs de ROCK tels que Y-27632 ou fasudil, l'implication de ROCK dans l'action inhibitrice de la myéline, de MAG, de Nogo-66, d'Amino-Nogo et des CSPG a été montrée (Dergham et al., 2002; Niederost et al., 2002; Borisoff et al., 2003; Fournier et al., 2003; Monnier et al., 2003; Alabed et al., 2006).

Ces expériences révélaient l'implication de Rho et de ROCK dans l'action des molécules inhibitrices. Elles suggéraient que Rho et ROCK devaient être activés par ces

molécules à la suite d'une lésion, et que leur inactivation *in vivo* pouvait stimuler la régénération.

#### **1.2.2.5.2. Inactivation de Rho ou de ROCK *in vivo***

Des tests *in vivo*, dont plusieurs ont été effectués dans notre laboratoire, ont ensuite confirmé que Rho était effectivement activé après différentes lésions du SNC. L'activation de Rho a été montrée, principalement par des essais « pull down », après lésion de la moelle épinière (Dubreuil et al., 2003; Madura et al., 2004), lésion du nerf optique (Ahmed et al., 2006), lésion traumatique au cerveau (Dubreuil et al., 2006), de même qu'à la suite de convulsions induites par injection d'acide kaïnique (Dubreuil et al., 2006). Les inhibiteurs C3 et Y-27632 ont été testés dans certains de ces modèles. L'utilisation de C3 au site de lésion a permis de favoriser la régénération d'axones corticospinaux et la récupération fonctionnelle après une hémisection dorsale de la moelle épinière de souris (Dergham et al., 2002). L'utilisation de Y-27632 au site de lésion a aussi stimulé la régénération axonale et la récupération dans ce même modèle (Dergham et al., 2002). Autant chez le rat que chez la souris, l'application de C3-05 au site d'une lésion de la moelle épinière a permis de renverser l'activation de Rho induite par la blessure (Dubreuil et al., 2003). Cependant, dans un modèle de lésion de la moelle épinière chez le rat, l'utilisation de C3 n'a pas été associée à de la régénération ou à de la récupération fonctionnelle (Fournier et al., 2003), possiblement parce que la dose utilisée était trop faible ou parce que la libération de C3 par la minipompe utilisée était trop lente pour être efficace.

L'inactivation de ROCK par Y-27632 a cependant stimulé la régénération d'axones corticospinaux et la récupération fonctionnelle après une hémisection chez le rat (Fournier et al., 2003). Des inhibiteurs de Rho et de ROCK ont aussi été utilisés après lésion du nerf optique. L'application de C3 au site de lésion a stimulé la régénération d'axones de cellules ganglionnaires de la rétine au-delà du site de lésion (Lehmann et al., 1999), un résultat qui a aussi été obtenu par l'injection intravitréenne de Y-27632 (Lingor, 2006)(Lingor et al 2006, Program no 228.9, Neuroscience 2006 meeting).

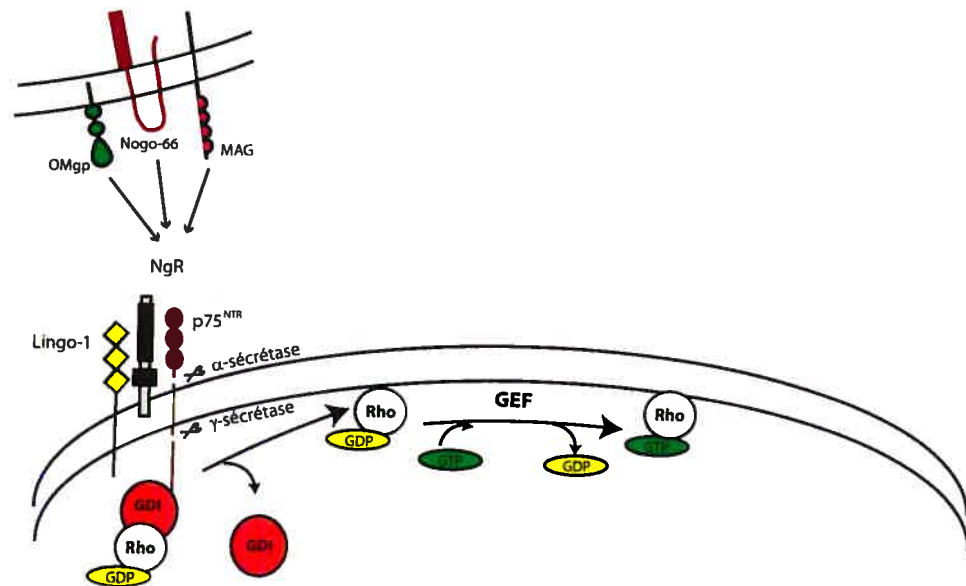
Ensemble, ces expériences *in vitro* et *in vivo* suggèrent fortement que l'activation de Rho par les molécules inhibitrices présentes dans la myéline et au niveau de la cicatrice gliale empêche la régénération après une lésion du SNC.

#### 1.2.2.5.3. Signalisation associée aux molécules inhibitrices

Notre connaissance des mécanismes par lesquels les molécules inhibitrices activent Rho et conduisent au blocage de la croissance est toujours incomplète, mais elle a beaucoup évolué au cours des dernières années. En amont de Rho, on sait maintenant que la signalisation de MAG, Nogo-66 et OMgp commence par la liaison au complexe de récepteur formé par NgR/p75<sup>NTR</sup>-TROY/LINGO-1 (**Figures 5 et 6**). p75<sup>NTR</sup> lierait ensuite Rho-GDI pour favoriser sa dissociation d'avec Rho, qui pourrait alors être activé par des GEFs non encore identifiés (Yamashita and Tohyama, 2003) (**Figure 5**). L'équipe de Marie Filbin a montré en 2005 que le clivage des segments extracellulaires (par  $\alpha$ -sécrétase) et intracellulaires (par  $\gamma$ -sécrétase) de p75<sup>NTR</sup> était essentiel pour induire l'activation de Rho et

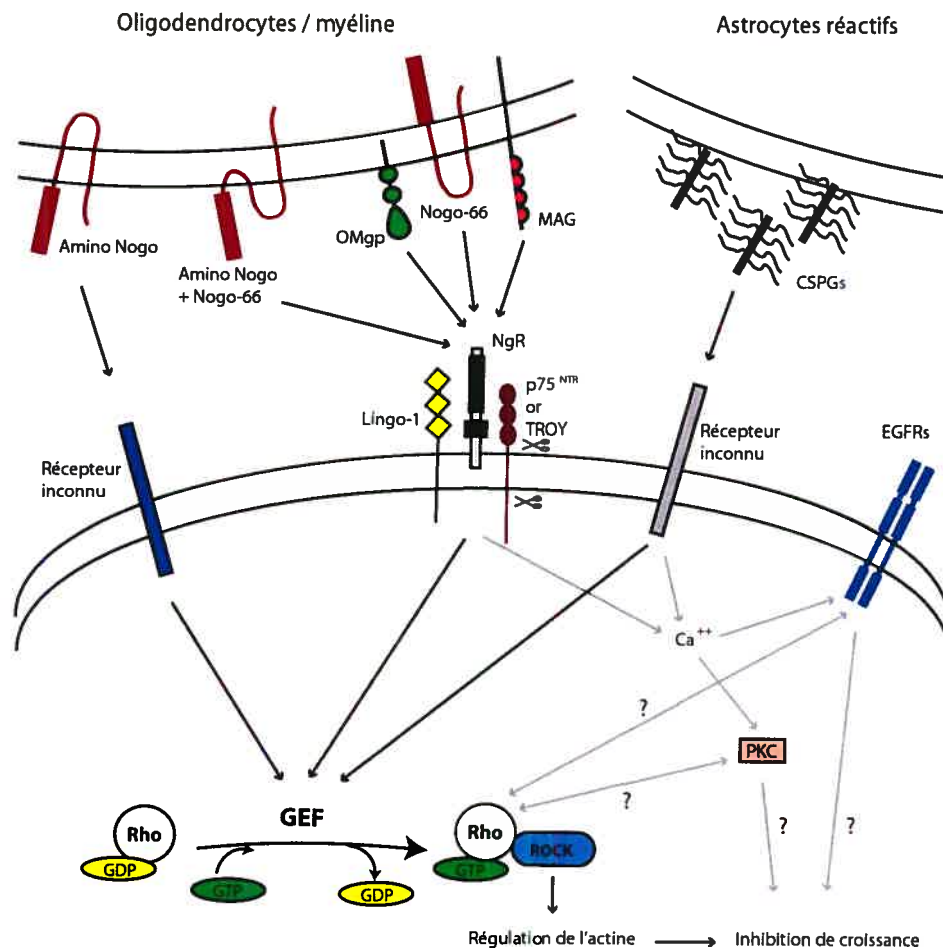
l'inhibition de croissance par MAG, suggérant que c'est la partie intracellulaire clivée de p75<sup>NTR</sup> qui contacterait RhoGDI et favoriserait sa dissociation d'avec Rho (Domeniconi et al., 2005). Dans les cellules où TROY remplace p75<sup>NTR</sup> dans le complexe de récepteur, comme c'est le cas pour les cellules ganglionnaires de la rétine, il a été montré que TROY est essentiel pour l'activation de Rho par les inhibiteurs (Park et al., 2005; Shao et al., 2005). On ne sait cependant pas si son effet passe par la liaison avec Rho-GDI, comme c'est le cas pour p75<sup>NTR</sup>.

Figure 5. Liaison p75<sup>NTR</sup> et RhoGDI.



**Figure 5. Liaison p75<sup>NTR</sup> et RhoGDI.** La liaison de MAG, Nogo et OMgp au complexe de récepteur NgR/p75<sup>NTR</sup>-TROY/LINGO-1 entraînerait le clivage de p75<sup>NTR</sup>. La portion intracellulaire de p75<sup>NTR</sup> pourrait ensuite faire contact avec RhoGDI pour favoriser sa dissociation d'avec Rho, qui pourrait ensuite être activé par des GEFs. GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor), GEF (guanine exchange factor), NgR (Nogo receptor). (Des composantes de cette figure ont été gracieusement fournies par Catherine Dubreuil).

**Figure 6. Signalisation des molécules inhibitrices.**



**Figure 6. Signalisation des molécules inhibitrices.** Les molécules inhibitrices se lient à leur récepteur et entraînent l'activation de Rho. L'activation subséquente de son effecteur ROCK inhibe la croissance via ses effets sur le cytosquelette d'actine. PKC et EGFR sont aussi impliqués dans la signalisation de certains inhibiteurs. Voir le texte pour plus de détails. PKC (protéine kinase C), EGFR (epidermal growth factor receptor). (Des composantes de cette figure ont été gracieusement fournies par Catherine Dubreuil)

On sait donc que l'activation de Rho par MAG, Nogo-66 et OMgp passe par le complexe de récepteur NgR/p75<sup>NTR</sup>-TROY/LINGO-1, mais on ne connaît pas les mécanismes par lesquels Amino-Nogo et les CSPG entraînent l'activation de Rho (**Figure 6**). En effet, les récepteurs spécifiques par lesquels passent les signaux des CSPG et d'Amino-Nogo ne sont pas identifiés, bien qu'il soit possible que Amino-Nogo puisse aussi lier NgR/p75<sup>NTR</sup>-TROY/LINGO-1 (Hu et al., 2005). De même, les GEFs qui stimulent l'activation de Rho par les molécules inhibitrices ne sont toujours pas identifiés.

L'implication de la protéine kinase C (PKC  $\alpha$  et  $\beta$ ) et du récepteur du facteur de croissance épidermal (epidermal growth factor receptor (EGFR)) dans la signalisation des molécules inhibitrices a été suggérée récemment, bien qu'on ne sache pas comment l'action de ces protéines est reliée à l'activation de Rho. Les groupes de Zhigang He et de Toshihide Yamashita ont montré *in vitro* que des molécules inhibitrices de la myéline ou des CSPGs activaient PKC et que l'inhibition de croissance causée par ces molécules était renversée ou atténuée par des inhibiteurs de PKC (Hasegawa et al., 2004; Sivasankaran et al., 2004). L'équipe de Zhigang He a également montré que l'utilisation d'un inhibiteur de PKC stimulait la régénération des axones de la colonne dorsale après une hémisection de la moelle épinière (Sivasankaran et al., 2004). L'activation des PKC conventionnelles  $\alpha$  et  $\beta$  est dépendante du calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ). L'augmentation de  $\text{Ca}^{++}$  par MAG, Nogo et les CSPG est connue (Bandtlow et al., 1993; Snow et al., 1994; Wong et al., 2002; Hasegawa et al., 2004) et pourrait donc expliquer comment elles activent la PKC. Les 2 groupes ont obtenu



des résultats différents quant au lien entre l'activation de PKC et celle de Rho. L'un observe que l'utilisation d'inhibiteurs de PKC atténue l'activation de Rho par les molécules inhibitrices, suggérant que l'activation de Rho dépend de PKC (Sivasankaran et al., 2004), alors que les résultats de l'autre groupe suggèrent que l'activation de Rho est indépendante de celle de la PKC puisque l'inhibition de la PKC ne diminue pas l'activation de Rho dans leur cas (Hasegawa et al., 2004). Cette différence devra être expliquée. L'implication de EGFR dans l'action inhibitrice des CSPGs et de la myéline a aussi été établie par l'équipe de Zhigang He (Koprivica et al., 2005). Ils ont montré *in vitro* que Nogo-66, OMgp et les CSPG activaient EGFR et que l'inhibition du récepteur stimulait la croissance sur la myéline, MAG, Nogo-66 et les CSPG. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de EGFR *in vivo* stimule la régénération des cellules ganglionnaires de la rétine après une lésion du nerf optique (Koprivica et al., 2005). Ils ont aussi démontré que l'activation de EGFR par les molécules inhibitrices était dépendante du  $Ca^{++}$  suggérant, comme pour la PKC, que c'est via l'augmentation de  $Ca^{++}$  qu'elles entraînent que les molécules inhibitrices activent EGFR (Koprivica et al., 2005). On ne sait pas s'il y a un lien direct entre l'activation de Rho et celle de EGFR à la suite de l'action de molécules inhibitrices, mais on remarque que les patrons d'activation/désactivation de EGFR et de Rho dans la rétine concordent après une lésion du nerf optique (Ahmed et al., 2006).

La signalisation des molécules inhibitrices mène finalement à l'activation de ROCK, avec ses effets sur la régulation du cytosquelette d'actine que nous avons décrits plus tôt et représenté à la **figure 4**.

### 1.2.2.6. Implication de Rho dans la mort cellulaire

En plus d'être reliée à l'inhibition de la régénération axonale, l'activation de Rho et de ROCK a aussi été associée à la mort de cellules neuronales et gliales.

Plusieurs expériences ont montré ou suggéré que l'activation de Rho ou de ROCK était impliquée dans la mort de neurones ou de cellules gliales en réponse à certains stimuli. Par exemple, la thrombine est une protéase impliquée entre autres dans la coagulation sanguine et capable d'activer Rho (Jalink et al., 1994). Cette protéase peut induire l'apoptose d'astrocytes et de neurones de l'hippocampe en culture, et l'utilisation de C3 a permis à Donovan et al de diminuer l'apoptose et de montrer que celle-ci était associée à l'activation de Rho (Donovan et al., 1997). L'utilisation de C3 ou de Y-27632 a aussi diminué l'apoptose induite par l'éthanol dans des astrocytes en culture (Minambres et al., 2006). Des expériences effectuées avec des cellules PC12 ou des neurones granulaires du cervelet (cerebellar granule neurons CGN) en culture sur la myéline suggèrent cependant que l'activation de Rho n'est pas suffisante pour induire la mort neuronale. En effet, bien que la présence de la myéline augmente l'activation de Rho en comparaison avec la poly-L-lysine, il n'y a aucune diminution de la survie des neurones (Winton et Dubreuil, manuscrit en préparation), suggérant que l'activation de Rho n'est pas en soi un stimulus apoptotique.

D'autres expériences suggèrent que l'activation de Rho pourrait être une conséquence du processus apoptotique. L'activation de Rho a en effet été associée

spécifiquement au cloquage des membranes (« membrane blebbing »), une importante caractéristique des cellules apoptotiques. Dans des cellules de type PC12, l'inactivation de Rho avec C3 inhibe le cloquage des membranes associé à l'apoptose induite par retrait de sérum (Mills et al., 1998).

Au cours des dernières années, quelques articles associant l'activation de Rho ou de ROCK avec la mort/survie cellulaire *in vivo* ont été publiés. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un résultat confirmé par plusieurs études, il est intéressant de noter que, chez l'animal en développement, l'activation de Rho ou de ROCK est associée à la survie cellulaire (Kobayashi et al., 2004), alors qu'elle est liée à la mort cellulaire chez l'animal adulte (Laufs et al., 2000; Dubreuil et al., 2003; Fischer et al., 2004b; Kitaoka et al., 2004). Dans une étude sur le développement des motoneurones de la moelle épinière, l'utilisation de dominant négatif de RhoA ou de ROCK a diminué le nombre de motoneurones en augmentant l'apoptose, suggérant que l'activation de RhoA et de ROCK est nécessaire pour assurer la survie d'un nombre suffisant de motoneurones en développement (Kobayashi et al., 2004). Chez l'animal adulte, l'utilisation de C3 peut diminuer la mort apoptotique de neurones et cellules gliales après une lésion de la moelle épinière (Dubreuil et al., 2003) ou celle de cellules ganglionnaires de la rétine après lésion du nerf optique (Fischer et al., 2004b), suggérant cette fois que l'activation de Rho contribue à la mort cellulaire chez l'adulte. C'est aussi ce que suggèrent des expériences de Laufs et al, où l'utilisation de C3 a permis de diminuer la taille de l'infarctus après occlusion de l'artère cérébrale médiane (Middle cerebral artery occlusion) (Laufs et al., 2000). De même, dans un modèle

d'excitotoxicité causée par l'injection intraoculaire de NMDA et associée à la mort des cellules ganglionnaires de la rétine et à une augmentation de l'expression de RhoA dans la rétine, l'utilisation de fasudil, un inhibiteur de ROCK, a entraîné la diminution de l'expression de RhoA et limité la mort des cellules ganglionnaires de la rétine (Kitaoka et al., 2004).

Ces données montrent bien que Rho peut contribuer à la mort de neurones et de cellules gliales, en particulier après des lésions du SNC chez l'adulte. Comme l'activation de Rho par les molécules inhibitrices n'est pas suffisante pour induire la mort neuronale, il est probable qu'un autre stimulus apoptotique, associé à la lésion, soit nécessaire pour activer Rho d'une façon qui entraînerait la mort cellulaire.

La GTPase Rho est donc impliquée dans la mort cellulaire en plus d'être associée à l'action des molécules inhibitrices de croissance axonale. Elle peut donc jouer un rôle important après une lésion du SNC.

### **1.3. Lésion du nerf optique : modèle de blessure du SNC pour l'étude de la survie et de la régénération**

La lésion du nerf optique est un modèle très utilisé pour étudier les impacts d'une blessure du SNC. Il présente de nombreux avantages par rapport à la lésion de la moelle épinière, particulièrement pour la quantification de la survie et de la régénération neuronales. Plusieurs stratégies visant à stimuler la survie et/ou la régénération axonale ont

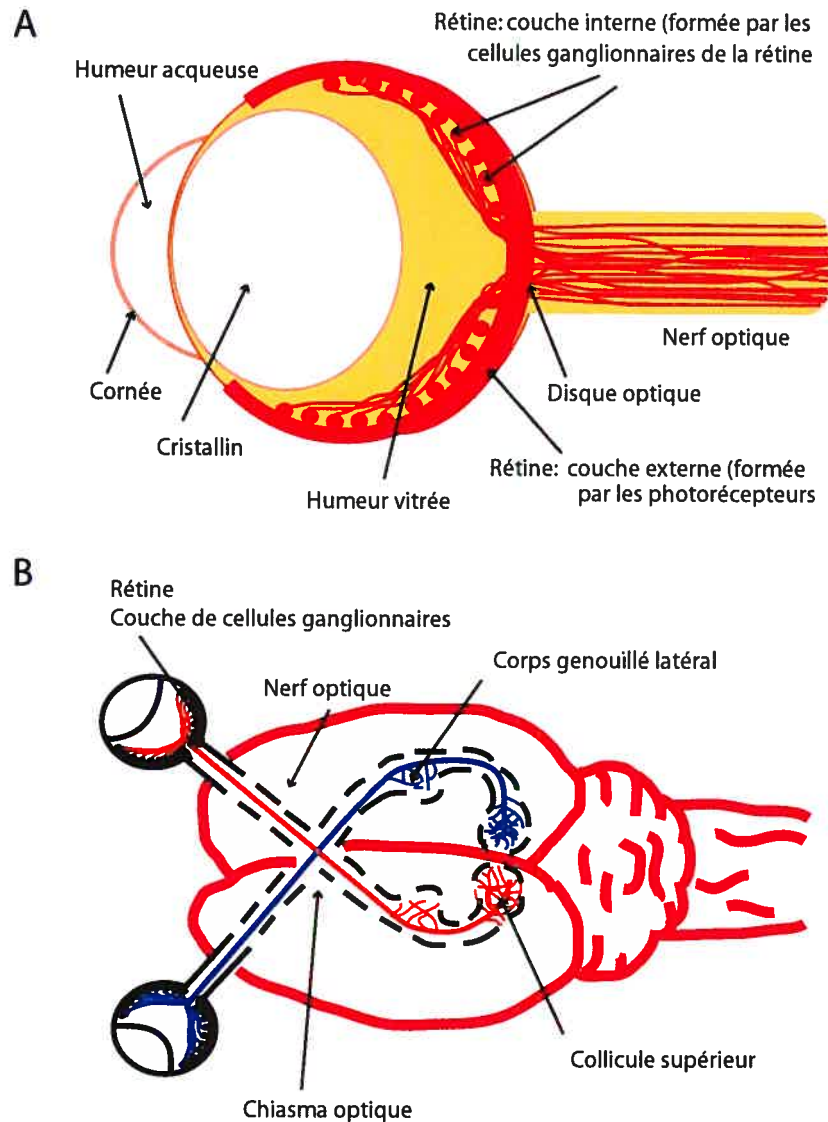
donc été testées dans ce modèle de lésion, et nous présenterons celles qui se sont avérées les plus intéressantes.

### 1.3.1. Présentation globale du modèle

La rétine est une fine structure de tissu cellulaire qui transforme l'énergie lumineuse en influx nerveux. Les photorécepteurs, qui forment la couche externe de la rétine, captent la lumière et transmettent un signal aux cellules ganglionnaires de la rétine (CGR), qui forment la couche interne de la rétine, face à l'humeur vitrée (**Figure 7A**). Entre ces 2 couches, l'information transite par les cellules bipolaires, amacrines et horizontales. Ce sont les CGR qui transmettent l'information visuelle au cerveau en passant par le nerf optique, et on en dénombre environ 115,000 par œil chez le rat (Forrester and Peters, 1967). Les corps cellulaires des CGR sont répartis sur toute la surface interne de la rétine et leurs axones se rejoignent au disque optique pour former le nerf optique. Le nerf optique comprend les axones des CGR de même que des cellules gliales telles que des astrocytes, oligodendrocytes et microglies (Dezawa and Adachi-Usami, 2000).

Les axones des CGR projettent aux collicules supérieurs et, chez le rat, plus de 98% des axones des CGR traversent la ligne médiane au chiasma optique pour projeter au collicule supérieur contralatéral (**Figure 7B**) (Cellerino et al., 2000). Environ 30% des axones vont aussi émettre une branche collatérale au corps genouillé latéral (Cellerino et al., 2000; Isenmann et al., 2003).

**Figure 7. Œil et nerf optique.**



**Figure 7. Oeil et nerf optique.** (A) Les CGR forment la couche interne de la rétine, et leurs axones se rejoignent au disque optique pour former le nerf optique. (B) Les 2 nerfs optiques se rejoignent au chiasma optique. Chez le rat, 98% des CGR traversent le chiasma optique et projettent au collicule supérieur contralatéral; environ 30% des axones envoient aussi une branche au corps genouillé latéral contralatéral. (adapté de Cellerino et al., 2000). CGR (cellules ganglionnaires de la rétine).

### 1.3.1.1. Avantages du modèle du nerf optique

Les principaux avantages du système rétinocolliculaire sont la simplicité, la compartimentation et l'accessibilité. C'est un système simple, si on le compare à la moelle épinière par exemple, puisqu'il ne comprend qu'un seul type de neurones, les CGR, dont tous les axones sont orientés dans le même sens, de la rétine vers le cerveau. En effet, on ne trouverait dans le nerf optique que quelques axones de cellules projetant du cerveau vers la rétine (Itaya, 1980). Par compartimentation on entend la séparation physique entre les corps cellulaires des CGR, qui sont situées au niveau de l'œil, et les axones qui forment le nerf optique à l'arrière du disque optique de l'œil. Cette séparation permet de tester l'effet de traitements appliqués spécifiquement au niveau des corps cellulaires, ou au niveau des axones, au besoin. Finalement, l'accès au système rétinocolliculaire est facile. On peut exposer les corps cellulaires à divers produits en les injectant directement dans le corps vitré de l'œil, qui baigne les CGR. Le nerf lui-même est facile d'accès, autant au niveau intraorbital que intracrânial, par une chirurgie relativement mineure qui ne pose pas de difficultés post-opératoires pour l'animal. Le collicule supérieur, cible du nerf optique, est lui aussi facile d'accès, ce qui permet le marquage rétrograde des CGR, pour évaluer la survie. Le marquage antérograde, que l'on utilise pour évaluer la régénération, est tout aussi facile par injection d'un marqueur dans le corps vitré, d'où il sera capté par les CGR. Ces différentes possibilités de marquage font qu'il est relativement facile de quantifier la survie et la régénération des CGR. Un dernier avantage important, en comparaison avec le modèle de lésion de la moelle épinière, est qu'il est facile, dans le nerf optique, de faire une lésion

complète et d'être assuré qu'on ne confond pas la régénération d'axones lésés avec la croissance de branches colatérales provenant d'axones non lésés. Dans la moelle épinière, où on utilise souvent un modèle d'hémisection dorsale, il est plus difficile de cibler parfaitement le tractus désiré et d'être assuré de sa lésion complète, et il y a plus de risques de confondre régénération et croissance de branches colatérales provenant d'axones non lésés.

Pour toutes ces raisons, le modèle du nerf optique se prête bien à l'évaluation de traitements visant à stimuler la régénération et la survie après une lésion du SNC. Par contre, il faut noter que la récupération fonctionnelle est plus difficile à évaluer dans le modèle du nerf optique que dans celui de la moelle épinière.

### **1.3.1.2. Impacts d'une lésion du nerf optique**

Il y a deux principales méthodes pour léser le nerf optique. On peut couper le nerf (section transversale) ou l'écraser, et on utilise couramment l'expression « axotomie du nerf optique » pour représenter le résultat de l'une ou l'autre de ces méthodes. Peu importe la méthode employée, on observe les effets suivants après l'axotomie: mort importante des CGR, formation d'une cicatrice gliale, dégénérescence de la partie distale à la lésion et absence de régénération axonale au-delà du site de lésion.

Les CGR meurent rapidement après l'axotomie. Après une lésion intraorbitale, donc à 1 ou 2 mm derrière l'œil, la mort s'observe à partir du jour 5 après la lésion et progresse



ensuite très rapidement. Environ 50% des CGR sont mortes 7 jours après l'axotomie et il en reste moins de 15% une semaine plus tard (Villegas-Perez et al., 1993; Berkelaar et al., 1994; Mansour-Robaey et al., 1994; Sapielha et al., 2003; Pernet and Di Polo, 2006). Si la lésion est intracrâniale, donc à 8 ou 9 mm de l'œil, le délai avant d'observer la mort de CGR est plus long (~8 jours) et la mort se fait ensuite plus lentement (Villegas-Perez et al., 1993; Berkelaar et al., 1994). Nous aborderons plus en détail, dans une prochaine section, comment et pourquoi les CGR meurent après la lésion du nerf optique.

Après lésion du nerf optique, il y a formation d'une cicatrice au site de lésion (Dezawa and Adachi-Usami, 2000; Selles-Navarro et al., 2001; Isenmann et al., 2003). Bien que le site de lésion soit dépourvu d'astrocytes pendant les premiers jours, ceux-ci vont ensuite envahir le site, devenir réactifs et se joindre à d'autres cellules comme des cellules précurseurs d'oligodendrocytes, des cellules des méninges et des microglies pour former la cicatrice gliale (Frank and Wolburg, 1996; Selles-Navarro et al., 2001; Isenmann et al., 2003). On observe la présence de CSPGs au site de lésion, probablement sécrétées par les astrocytes réactifs ou les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (Fawcett and Asher, 1999; Selles-Navarro et al., 2001). On note aussi une invasion de macrophages au site de lésion peu de temps après l'axotomie (Zeng et al., 1994; Frank and Wolburg, 1996).

Peu après la lésion, la partie du nerf optique distale au site de blessure commence à se dégrader. Les axones et la gaine de myéline se fractionnent dans un processus de dégénérescence wallérienne (Grafstein and Ingoglia, 1982; Kiernan, 1985a; Stoll et al.,

1989). Le nerf s'atrophie et la diminution du diamètre du nerf est évidente 14 jours après la lésion.

Dans la semaine qui suit la lésion, on peut observer un important bourgeonnement à l'extrémité des axones lésés (Richardson et al., 1982; Zeng et al., 1994, 1995; Selles-Navarro et al., 2001). Cette tentative de régénération, qualifiée de « vigoureuse » dans Zeng et al, est cependant infructueuse puisque, en absence de traitement, on n'observe pratiquement aucun axone qui régénère dans la partie distale du nerf optique (Zeng et al., 1994; Lehmann et al., 1999; Selles-Navarro et al., 2001; Sapieha et al., 2003).

Des expériences effectuées à la suite d'une axotomie intracrânienne ont aussi permis de démontrer que la lésion entraîne un arrêt presque complet du transport axonal lent (McKerracher et al., 1990). Cette observation est importante puisque le transport axonal lent est responsable de l'acheminement des composants du cytosquelette, qui sont essentiels pour la régénération (Lasek et al., 1984). Finalement, parmi les autres effets observés au niveau du nerf à la suite d'une axotomie, mentionnons l'augmentation de  $TNF\alpha$  (Tezel et al., 2004), de même qu'une augmentation de l'expression de EphB3 et d'éphrineB3 (Liu et al., 2006).

Au niveau de l'œil et de la rétine, on observe aussi des effets de l'axotomie du nerf optique en plus de la mort des CGR dont on a déjà parlé. Le nombre et le niveau d'activation des microglies et des macrophages sont augmentés (Thanos et al., 1993;

Raibon et al., 2002; Zhang and Tso, 2003; Tezel et al., 2004; Garcia-Valenzuela et al., 2005). L'augmentation des niveaux de glutamate (Yoles and Schwartz, 1998a), de Sema3A (Shirvan et al., 2002), de TNF $\alpha$  (Tezel et al., 2004) et de Rho actif (Ahmed et al., 2006) a aussi été rapportée.

### **1.3.1.3. Le modèle de microlésion du nerf optique**

Ce modèle de lésion, que nous appelons communément « microlésion », a été développé et caractérisé dans notre laboratoire (Selles-Navarro et al., 2001). Tout comme l'axotomie par section transversale ou par écrasement à l'aide d'une pince, il s'agit d'une lésion complète de tous les axones du nerf optique. Dans ce modèle, on écrase le nerf optique à l'aide d'un fil de suture 10-0. On utilise le fil pour faire un nœud autour du nerf optique, et on maintient ce nœud fermement serré pendant au moins 60 secondes avant de retirer le fil. Des tests utilisant un marquage rétrograde ont permis de prouver que cette technique permettait de léser tous les axones. Tout comme l'écrasement du nerf, la microlésion ne crée pas un vide entre les parties proximales et distales du nerf, mais son avantage supplémentaire est qu'il abîme moins les tissus situés de chaque côté de la lésion, produisant un site de lésion bien défini, plus net que celui qu'on obtient en écrasant le nerf avec une pince. Il est donc facile de bien identifier où se trouve le site de lésion, ce qui rend la quantification de la régénération plus précise.

Parce qu'il nous permet une lésion complète et reproductible, un accès facile aux corps cellulaires pour les traitements et une possibilité de quantifier survie et régénération

de façon précise, la microlésion du nerf optique est le modèle que nous avons choisi pour la recherche présentée dans cette thèse.

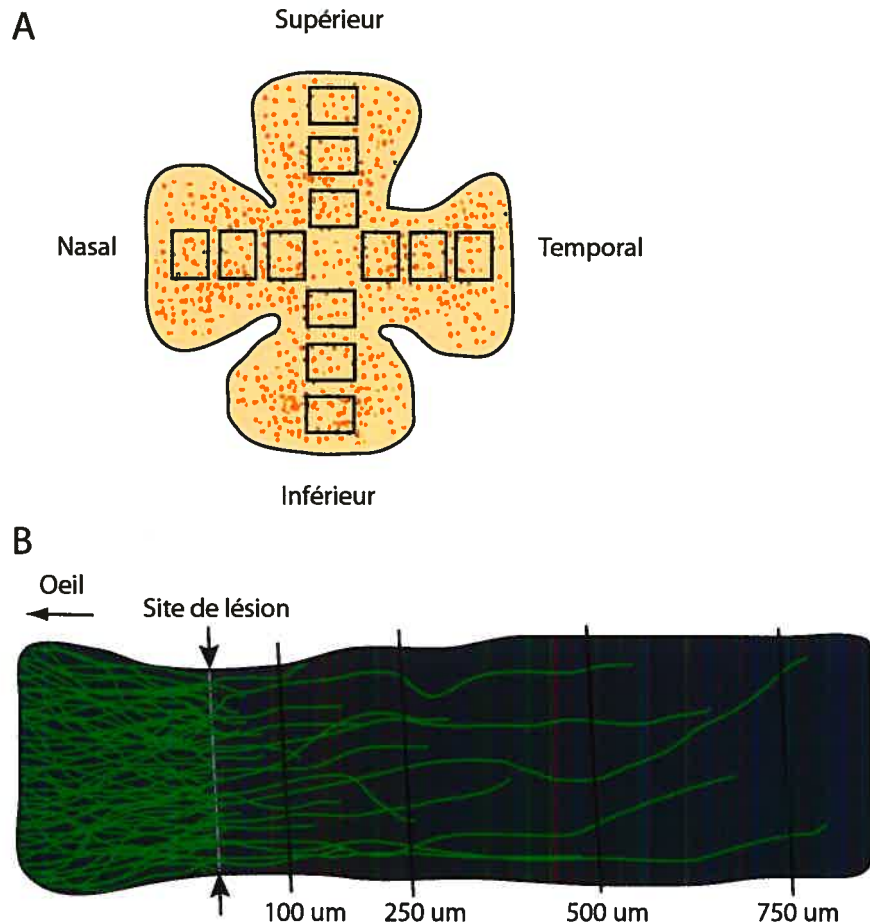
### 1.3.2. Quantification de la survie et de la régénération des CGR

Pour quantifier la survie des CGR, il faut d'abord les marquer, ce que nous faisons en appliquant une molécule fluorescente, le Fluorogold, sur le collicule supérieur contralatéral au nerf lésé quelques jours avant la lésion du nerf optique (Bertrand et al., 2005). Le Fluorogold est capté par l'extrémité des axones et transporté de façon rétrograde jusqu'aux corps cellulaires situés dans la rétine. Au moment où nous voulons évaluer la survie, la rétine est enlevée et étalée sur une lame, et nous comptons le nombre de CGR fluorescentes dans 12 sections réparties dans les 4 quadrants de la rétine, totalisant 1 mm<sup>2</sup> (Bertrand et al., 2007) (**Figure 8A**). C'est cette valeur moyenne de CGR/mm<sup>2</sup> qui sera comparé d'un groupe de traitement à l'autre.

Pour quantifier la régénération, nous commençons par injecter une solution contenant la sous-unité  $\beta$  de la toxine du choléra (Cholera toxin subunit  $\beta$  - CT $\beta$ ) dans le corps vitré, 24 heures avant la perfusion de l'animal (Bertrand et al., 2005). La CT $\beta$  sera captée par les CGR et ce marqueur sera transporté de façon antérograde dans les axones. Le marquage sera révélé en immunohistochimie sur des coupes longitudinales du nerf optique. Sur chaque coupe utilisée (4 à 10 par animal), nous identifierons d'abord le site de lésion, pour ensuite compter le nombre d'axones qui auront traversé des lignes parallèles à la

lésion situées à différentes distances du site de lésion (Bertrand et al., 2005) (**Figure 8B**). C'est en comparant le nombre d'axones par coupe comptés à différentes distances du site de lésion que nous comparerons la régénération entre les groupes de traitement.

**Figure 8. Quantification de la survie et de la régénération**



**Figure 8. Quantification de la survie et de la régénération.**

(A) Pour quantifier la survie, la rétine est étalée à plat sur une lame. Nous comptons les CGR dans 12 régions réparties dans les 4 quadrants de la rétine, pour une surface totale de 1 mm<sup>2</sup>. Les CGR sont fluorescentes grâce au Fluorogold appliqué au collicule supérieur avant la lésion et transporté de façon rétrograde jusqu'aux corps cellulaires des CGR. (B) Pour quantifier la régénération, nous traitons des coupes longitudinales du nerf optique par immunohistochimie pour détecter la CTB injectée dans l'oeil 24 heures avant la perfusion et transportée de façon antérograde à partir des corps cellulaires des CGR jusque dans les axones. Nous comptons le nombre d'axones qui traversent des lignes parallèles au site de lésion à diverses distance de la lésion. CGR (cellules ganglionnaires de la rétine), CTB (choléra toxine Beta).

### **1.3.3. Mort et survie des CGR après lésion du nerf optique**

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les CGR meurent rapidement après une axotomie du nerf optique. On comprend assez bien aujourd'hui comment les CGR meurent, mais on sait toujours peu de choses sur les mécanismes qui entraînent leur mort.

#### **1.3.3.1. Comment les CGR meurent-elles? Nécrose et apoptose**

La conclusion prépondérante des études portant sur la mort des CGR après lésion du nerf optique est qu'elle se produit principalement par apoptose. On a d'abord observé des caractéristiques morphologiques typiques à l'apoptose telles que la condensation de la chromatine ou la fragmentation de l'ADN (Berkelaar et al., 1994; Garcia-Valenzuela et al., 1994). Par la suite, on a observé après la lésion une diminution des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL (Levin et al., 1997; Isenmann et al., 1999), de même qu'une augmentation des protéines pro-apoptotiques Bim et Bax (Isenmann et al., 1997; Napankangas et al., 2003). On a aussi montré la libération de cytochrome c après la lésion (He et al., 2004), de même que l'activation des caspases-3 (Kermer et al., 1999b; He et al., 2004), caspases-8 (Weishaupt et al., 2003) et caspases-9 (Kermer et al., 2000). La conclusion de mort apoptotique est également appuyée par le fait que la mort des CGR est diminuée significativement chez des souris surexprimant le gène Bcl-2, de même que chez des rats traités avec des inhibiteurs de caspases ou des bloqueurs de protéines pro-apoptotiques (Bonfanti et al., 1996; Chierzi et al., 1998; Kermer et al., 1998; Chaudhary et al., 1999; Chierzi et al., 1999; Isenmann et al., 1999; Kermer et al., 2000).

Cependant, bien des auteurs s'accordent pour dire qu'un certain pourcentage de perte de CGR est associé à une mort nécrotique (Goldberg and Barres, 2000; Isenmann et al., 2003), associée possiblement à des phénomènes d'inflammation ou d'excitotoxicité dans la rétine à la suite de la lésion (Thanos et al., 1993; Bien et al., 1999).

### **1.3.3.2. Pourquoi les CGR meurent-elles?**

Les mécanismes qui initient la mort des CGR après une lésion du nerf optique ne sont toujours pas identifiés. L'hypothèse la plus probable avancée à ce jour associe la mort des cellules ganglionnaires à une combinaison de deux facteurs. Le premier est que la lésion de leur axone diminuerait le support trophique dont elles ont besoin et le deuxième est que leur capacité intrinsèque à répondre à la présence de facteurs trophiques serait diminuée par la lésion (Goldberg and Barres, 2000; Isenmann et al., 2003).

Une multitude d'expériences ont montré que l'apport exogène de facteurs trophiques augmente la survie des CGR après axotomie du nerf optique, appuyant l'hypothèse voulant que la lésion prive les CGR d'un apport trophique nécessaire (So and Yip, 1998; Heiduschka and Thanos, 2000; Isenmann et al., 2003). Le fait que les cellules ganglionnaires meurent plus lentement si la lésion est éloignée du corps cellulaire appuie aussi cette hypothèse puisque les cellules gliales présentes dans le nerf peuvent être une source de support (Villegas-Perez et al., 1993; Berkelaar et al., 1994). Les CGR lésées sont aussi privées de tout apport trophique provenant de leur cible, le collicule supérieur (CS),



mais l'importance de cet apport est controversée chez l'animal adulte. On sait que les CGR adultes peuvent transporter, de manière rétrograde, du BDNF (Brain-derived neurotrophic factor ou facteur neurotrophique dérivé du cerveau) provenant du CS (Fournier and McKerracher, 1997), mais il a été montré, avec des expériences où on enlevait le CS, que si l'apport trophique provenant de la cible du nerf optique est essentiel pour la survie des CGR chez le rat en développement ou nouveau-né, il n'en est pas de même chez le rat adulte sain (Perry and Cowey, 1982; Harvey and Robertson, 1992). Ces résultats ne permettent cependant pas de conclure que l'apport trophique du CS est inexistant puisqu'il pourrait être compensé, chez l'animal adulte à qui on enlève le CS, par des sources alternatives provenant des axones voisins ou des cellules gliales du nerf optique.

La capacité des CGR à répondre aux facteurs trophiques est affectée d'au moins deux façons à la suite d'une lésion du nerf optique. D'une part, l'équipe d'Adriana Di Polo a montré que l'expression du récepteur de BDNF, TrkB, était fortement régulée à la baisse après une axotomie et qu'un transfert du gène de TrkB dans les CGR stimulait la survie en présence de BDNF (Cheng et al., 2002). D'autre part, l'équipe de Ben Barres a montré que la réponse des CGR aux facteurs trophiques était pratiquement abolie après une axotomie (Shen et al., 1999). Ce changement dans la réponse neuronale pourrait être dû à une baisse de l'activité électrique dans les neurones lésés et peut être compensé par un apport exogène d'AMPC (Shen et al., 1999). Ensemble, ces changements observés à la suite de l'axotomie du nerf optique pourraient expliquer pourquoi les stratégies d'augmentation de la survie basées sur l'apport externe de facteurs trophiques ont seulement des effets transitoires.

Il semble aussi que la cytokine pro-inflammatoire  $TNF\alpha$  et le glutamate contribuent à la mort des CGR après une lésion du nerf optique. Tezel et al ont noté une augmentation de  $TNF\alpha$  à 2 semaines après une lésion intraorbitale du nerf optique chez des souris (Tezel et al., 2004). Ils ont aussi observé une réduction de la mort des CGR chez des souris knock-out pour le gène du récepteur 1 du TNF ( $TNF-R1$ ), suggérant une contribution de  $TNF\alpha$  à la mort des CGR (Tezel et al., 2004). L'augmentation du glutamate a quant à elle été observée 24 heures après une lésion partielle du nerf optique chez le rat adulte pour une augmentation maximale 7 jours après la lésion (Yoles and Schwartz, 1998b; Vorwerk et al., 2004). L'utilisation d'antagonistes des récepteurs ionotropes du glutamate de type AMPA ou NMDA a permis de diminuer significativement la mort des CGR (Yoles et al., 1997; Schuettauf et al., 2000). Le  $TNF\alpha$  et le glutamate s'ajoutent donc aux facteurs pouvant contribuer à la mort des CGR après lésion du nerf optique.

### **1.3.3.3. Stratégies utilisées pour stimuler la survie des CGR**

Plusieurs stratégies ont été utilisées pour stimuler la survie des CGR après l'axotomie du nerf optique, telles que : apport exogène de neurotrophines et autres facteurs trophiques (Mey and Thanos, 1993; Mansour-Robaey et al., 1994; Di Polo et al., 1998), blocage de protéines apoptotiques ou surexpression de protéines anti-apoptotiques (Bonfanti et al., 1996; Chierzi et al., 1998; Chierzi et al., 1999; Isenmann et al., 1999; Malik et al., 2005), ou modulation de l'inflammation (Thanos et al., 1993; Leon et al., 2000). Plusieurs articles de revue donnent un sommaire plus détaillé et des références plus

complètes (So and Yip, 1998; Heiduschka and Thanos, 2000; Isenmann et al., 2003), mais, à ce jour, c'est l'apport exogène de BDNF qui semble offrir la meilleure protection contre la perte des CGR après axotomie (Mansour-Robaey et al., 1994; Peinado-Ramon et al., 1996; Klocker et al., 1998; Yan et al., 1999). L'utilisation de BDNF assure une protection complète des CGR, 7 jours après la lésion, et la survie après 2 semaines se situe entre 40 et 50% avec une seule injection faite au jour 0, 3 ou 5 après la lésion (Mansour-Robaey et al., 1994). On a donc une bonne protection, même si l'apport trophique ne suit pas immédiatement la lésion, et la protection peut être encore augmentée (67%) avec des injections multiples s'étendant à la deuxième semaine après la lésion (Mansour-Robaey et al., 1994). Cette réponse au BDNF est cependant transitoire. La survie n'est que de 15% après 4 semaines après une injection unique de BDNF (Mansour-Robaey et al., 1994), et même avec une livraison continue entraînée par l'infection des cellules de Müller, les cellules gliales supportant la rétine, avec un adénovirus porteur du gène de BDNF, l'amélioration de la survie dépasse à peine 2 semaines (Di Polo et al., 1998). Même si la survie obtenue avec le facteur de croissance ciliaire (ciliary neurotrophic factor (CNTF)) est généralement moins élevée qu'avec le BDNF, il est intéressant de mentionner un résultat récent de l'équipe de Alan Harvey avec ce facteur trophique. En utilisant un virus adénoassocié (Adeno-Associated Virus ou AAV) porteur du gène de CNTF, ils ont obtenu une survie significativement plus élevée que chez les animaux témoins, jusqu'à 7 semaines après la lésion du nerf optique (Leaver et al., 2006).

### **1.3.4. Inhibition de croissance et régénération des CGR après lésion du nerf optique**

Les CGR ne régénèrent pas spontanément leur axone après une lésion du nerf optique, et nous verrons que cette réalité s'explique par une combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques. La pose d'un greffon de nerf périphérique a été la première approche pour stimuler la régénération des CGR puisqu'elle donnait aux axones un environnement plus permissif à la croissance, mais plusieurs stratégies sont aujourd'hui testées pour stimuler la régénération directement dans le tissu du nerf optique.

#### **1.3.4.1. Pourquoi les CGR ne régénèrent-elles pas spontanément?**

On peut être tenté d'attribuer l'absence de régénération au très faible taux de survie des CGR après une axotomie du nerf optique, mais ce n'est pas une bonne justification. Si la survie est évidemment essentielle pour que la régénération se produise, plusieurs expériences ont prouvé que ça n'est pas suffisant. Mentionnons d'abord les traitements à base de BDNF, qui augmentent fortement la survie des CGR sans aucunement stimuler la régénération de leur axone (Mansour-Robaey et al., 1994; Pernet and Di Polo, 2006). De même, la surexpression de Bcl-2 chez des souris augmente grandement la survie des CGR après une lésion, sans qu'on observe de régénération chez des souris à P5 ou adultes (Chierzi et al., 1999; Lodovichi et al., 2001; Inoue et al., 2002).

Le nerf optique, particulièrement après une axotomie, n'est pas un environnement permissif pour la croissance axonale. Parmi les facteurs qui peuvent contribuer au blocage de la régénération des CGR adultes, il y a bien sûr des facteurs extrinsèques comme la cicatrice gliale au site de lésion de même que les molécules inhibitrices de la myéline et de la cicatrice, dont nous avons parlé au début de cette introduction. La réduction intrinsèque du niveau d'AMPC, un autre facteur déjà mentionné qui, dans les CGR, se produit à la fin de la période embryonnaire (Cai et al., 2001), contribue à amplifier l'effet inhibiteur de l'environnement du nerf optique. Mais en plus de ces facteurs généraux, qui peuvent s'appliquer à plusieurs types de neurones, y a-t-il des raisons spécifiques aux CGR pour expliquer pourquoi elles ne régénèrent pas?

Dans un article très intéressant paru en 2002, Jeffrey Goldberg a démontré que l'absence de croissance axonale des CGR adultes n'était pas simplement liée à l'environnement du nerf optique (Goldberg et al., 2002). Déjà, en 1995, il avait été montré que la croissance de CGR de hamsters à P2 diminuait considérablement même sur des substrats embryonnaires non inhibiteurs alors que des CGR plus jeunes que P2 croissaient facilement même sur des substrats plus matures, donc plus inhibiteurs (Chen et al., 1995). Les expériences de Jeffrey Goldberg ont montré *in vitro* que la vitesse d'élongation axonale chutait drastiquement à partir de P0 chez le rat pour plus de 99% des CGR (Goldberg et al., 2002). Les axones des CGR, à P8, s'allongent 10 fois moins vite qu'à E20, et cette vitesse à P8 n'est pas augmentée par l'ajout de neurotrophines ou d'AMPC, ni par la présence d'un

substrat favorable à la croissance ou la surexpression de Bcl-2, ce qui suggère que la différence de vitesse n'est pas due à l'environnement mais bien à un changement de la capacité intrinsèque de croissance des CGR. Des expériences subséquentes ont permis d'associer ce changement à un signal provenant des cellules amacrines qui se produirait au moment où les CGR passent d'un mode de croissance axonale à un mode de croissance dendritique (Goldberg et al., 2002).

Peut-on contrer ces signaux intrinsèques et environnementaux et arriver à stimuler la régénération des CRG?

#### **1.3.4.2. Stimuler la régénération dans un greffon de nerf périphérique**

C'est d'abord en greffant un morceau de nerf périphérique (NP) autologue à l'extrémité du nerf optique coupé qu'on a réussi à stimuler la régénération des CGR (Bray et al., 1987; Villegas-Perez et al., 1988). La greffe a stimulé à la fois la survie et la régénération. La survie des CGR a été multipliée par un facteur variant entre 2 et 4 en fonction du temps écoulé depuis la lésion (Bray et al., 1987; Villegas-Perez et al., 1988). Entre 2 semaines et 3 mois après lésion et greffe de NP, 14 à 20% des cellules ganglionnaires qui survivent régénèrent un axone dans le greffon sur une distance d'au moins 2 cm (Villegas-Perez et al., 1988). C'est une moyenne d'environ 3% du nombre total de CGR qui régénèrent un axone dans le NP, et la vitesse d'élongation a été évaluée entre 1 et 2 mm par jour (Vidal-Sanz et al., 1987; So and Yip, 1998). Quand la partie terminale du greffon de NP est apposée sur le collicule supérieur (CS), la cible normale de la majorité

des CGR, certains axones régénérés peuvent pénétrer sur plusieurs centaines de microns dans le CS et former des synapses fonctionnelles (Carter et al., 1989; Keirstead et al., 1989; Vidal-Sanz et al., 1991).

Lorsque la section transversale du nerf optique est faite à plusieurs millimètres du corps cellulaire, les greffes de NP ne stimulent pas la régénération, possiblement parce que les CGR ont besoin du support trophique provenant des cellules de Schwann du NP pour se mettre en mode de croissance (Richardson et al., 1982; So and Yip, 1998; Heiduschka and Thanos, 2000; You et al., 2000). Il a d'ailleurs été démontré qu'un NP dépourvu de cellules de Schwann viables ne pouvait pas supporter la régénération des CGR (Berry et al., 1988).

Le greffon de NP facilite la régénération en fournissant aux CGR un environnement de croissance plus permissif que ne l'est le nerf optique. De plus, les cellules de Schwann assurent un apport important de différents facteurs trophiques (NGF, FGF (fibroblast growth factor ou facteur de croissance fibroblastique, CNTF, BDNF, GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor ou facteur neurotrophique dérivé de cellules gliales) et de molécules d'adhésion (L1, intégrines, laminine) qui pourraient faciliter l'élongation des axones en croissance (So and Yip, 1998; Dezawa and Adachi-Usami, 2000; Heiduschka and Thanos, 2000). La greffe de NP a aussi été combinée à d'autres traitements dans le but de stimuler la régénération d'un plus grand nombre d'axones. L'injection intravitréenne de CNTF a augmenté la régénération de façon significative (Cui et al., 1999; Cui et al., 2003), mais d'autres facteurs trophiques tels que le facteur de croissance fibroblastique-2 (FGF2

ou fibroblast growth factor-2), NGF, BDNF, neurotrophine 3 (NT-3) ou neurotrophine 4/5 (NT-4/5) n'ont eu aucun effet (Mansour-Robaey et al., 1994; Cui et al., 1999). L'effet du CNTF a été amplifié par l'utilisation simultanée d'un analogue de l'AMPc (CPT-cAMP) (Cui et al., 2003) et, récemment, l'utilisation de AAV-CNTF a permis à l'équipe d'Alan Harvey d'obtenir non seulement une survie importante des CGR à 7 semaines, mais aussi la régénération de près de 50% des cellules survivantes à une distance de 1 à 1.5 cm dans le NP greffé (Leaver et al., 2006). L'augmentation de l'activation des macrophages par injection intravitréenne de Zymosan ou par blessure du cristallin (Fischer et al., 2000; Yin et al., 2003), de même que l'utilisation d'inhibiteurs d'activation microgliale (Thanos et al., 1993; Raibon et al., 2002) ont aussi permis d'augmenter la régénération des CGR dans un greffon de NP.

La greffe d'un NP favorise donc la régénération des CGR en fournissant un support trophique et un environnement plus permissif à la croissance, et il est possible de stimuler davantage la régénération dans le NP par l'ajout de facteurs trophiques ou d'AMPc, ou par l'activation de macrophages. Mais si l'utilisation de greffe de NP est intéressante, l'objectif ultime reste la régénération des axones dans leur tissu d'origine, et différentes approches ont été utilisées pour stimuler la régénération des CGR dans l'environnement complètement myélinisé et donc très inhibiteur du nerf optique.



#### **1.3.4.3. Stimuler la régénération dans le nerf optique**

Différents facteurs trophiques ont été testés avec une lésion du nerf optique, mais dans plusieurs cas les résultats ont été décevants. L'utilisation de FGF2 (Sapieha et al., 2003) ou d'une combinaison de FGF2/NT-3/BDNF (Logan et al., 2006) a entraîné une augmentation modérée mais significative du nombre de CGR régénérant leur axone au-delà du site de lésion, mais aucun effet régénératif n'a été obtenu avec BDNF ou NT-3 (Leaver et al., 2006; Logan et al., 2006; Pernet and Di Polo, 2006), malgré l'effet reconnu de BDNF sur la survie des CGR. Malgré son effet positif sur la survie des CGR (Mey and Thanos, 1993; Leaver et al., 2006), CNTF a eu peu (Cui et al., 2004) ou pas (Leon et al., 2000; Pernet and Di Polo, 2006) d'effet sur leur régénération, sauf lorsque le gène de CNTF a été transfecté dans les CGR via un AAV (AAV-CNTF), permettant un apport continu du CNTF (Leaver et al., 2006). Une régénération significative a alors été observée 7 semaines après la lésion (Leaver et al., 2006). Ces résultats suggèrent, d'une part, que les CGR requièrent plus qu'un simple support trophique pour régénérer et, d'autre part, que certains facteurs trophiques pourraient activer un programme de croissance dans les CGR en plus de stimuler leur survie.

Une autre approche pour stimuler la régénération consiste à implanter ou activer des macrophages. L'implantation de macrophages activés au site de lésion du nerf optique s'est avérée capable de stimuler la régénération de CGR (Lazarov-Spiegler et al., 1996). L'activation de macrophages dans la rétine, induite par une blessure du cristallin ou par une

injection intraoculaire de Zymosan, a quant à elle entraîné la régénération d'un plus grand nombre de CGR que l'utilisation de facteurs trophiques (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003; Fischer et al., 2004a; Fischer et al., 2004b; Lorber et al., 2005; Pernet and Di Polo, 2006). Après plusieurs années de recherche pour identifier le(s)quel(s) des facteurs sécrétés par les macrophages étai(en)t responsable(s) de la régénération des CGR, l'équipe de Larry Benowitz a récemment trouvé qu'il s'agissait de l'oncomoduline (OM), une protéine de liaison du calcium (Yin et al., 2006). Ils ont d'abord montré que cette protéine, exprimée faiblement dans la rétine adulte saine, est fortement exprimée et sécrétée par les macrophages, et qu'elle se lie à des récepteurs des CGR par un processus qui requiert de l'AMPc. Ils ont ensuite prouvé son efficacité à stimuler la régénération après une lésion du nerf optique. Après la lésion, ils ont injecté dans l'œil des microsphères libérant de l'OM et de l'AMPc de façon continue et ont obtenu une régénération significative après 2 semaines (Yin et al., 2006). L'activation de macrophage ou l'utilisation de facteurs pro-régénératifs sécrétés par les macrophages comme l'OM peuvent donc aussi stimuler la régénération dans le nerf optique.

Puisque la cicatrice gliale et la myéline font du nerf optique lésé un environnement inhibiteur de croissance, des stratégies visant à limiter l'effet des molécules inhibitrices ont été testées à la suite d'une lésion. L'utilisation de IN-1, un anticorps anti-Nogo, a faiblement stimulé la régénération, mais l'effet a été augmenté quand IN-1 a été combiné à CNTF (Cui et al., 2004). L'inhibition de la GTPase Rho, par l'application de C3 au site de lésion ou par la transfection des CGR avec AAV-C3, a aussi favorisé la régénération

axonale dans le nerf optique (Lehmann et al., 1999; Fischer et al., 2004b), mais l'utilisation d'un dominant négatif de NgR (AAV-NgR<sup>DN</sup>), le récepteur des inhibiteurs MAG, Nogo-66 et OMgp, n'a pas eu d'effet sur la régénération (Fischer et al., 2004a). Cependant, lorsque AAV-C3 ou AAV-NgR<sup>DN</sup> ont été combinés avec une blessure du cristallin, la régénération a été fortement augmentée. La combinaison AAV-C3 et blessure du cristallin a multiplié par 5 le nombre de CGR qui régénèrent avec l'un ou l'autre des traitements (Fischer et al., 2004b), alors que la combinaison AAV-NgR<sup>DN</sup> et blessure du cristallin a multiplié par 3 la régénération obtenue avec la lésion du cristallin seule (Fischer et al., 2004a). Ces résultats suggèrent que l'activation des macrophages induite par la blessure du cristallin pourrait stimuler les CGR à se mettre en mode croissance, permettant ensuite aux traitements qui bloquent la signalisation des molécules inhibitrices de stimuler l'élongation axonale dans le nerf optique.

Une autre approche, utilisée principalement par le groupe de Martin Berry depuis le milieu des années 1990, a aussi donné des résultats très intéressants. La technique consiste à insérer un petit segment de nerf périphérique dans le vitré au moment de la lésion du nerf optique (Berry et al., 1996). Bien qu'il puisse être difficile de comparer les résultats de laboratoires différents, cette approche semble être la plus efficace jusqu'ici pour stimuler la régénération dans le nerf optique. Son mode d'action serait double. D'une part, la greffe intravitréenne atténuerait la formation de la cicatrice gliale en augmentant l'expression de métalloprotéinases de la matrice et en diminuant l'expression d'inhibiteurs de ces métalloprotéinases (Ahmed et al., 2005). D'autre part, certains facteurs sécrétés par les

cellules de Schwann présentes dans la greffe pourraient interférer avec le complexe de récepteur des molécules inhibitrices, NgR/p75<sup>NTR</sup>-TROY/LINGO-1, et bloquer la signalisation des inhibiteurs (Ahmed et al., 2006).

Diverses approches existent donc pour stimuler la régénération dans le nerf optique, et les résultats obtenus suggèrent qu'il faudra à la fois contrer l'action des inhibiteurs et stimuler les CGR à reprendre un mode de croissance. De plus, il faudra assurer la survie à long terme des cellules lésées. Il est tentant d'envisager la combinaison de plusieurs traitements pour créer une synergie, mais le choix des traitements à combiner est difficile quand on ne connaît pas les mécanismes d'action de chacun d'eux. Par exemple, l'activation de macrophages par lésion du cristallin a été combinée avec l'injection de BDNF dans l'espoir que cette combinaison favorise à la fois la survie et la régénération (Pernet and Di Polo, 2006). La survie a effectivement été fortement augmentée en comparaison avec celle obtenue avec l'un ou l'autre des traitements, mais la régénération a été complètement abolie, alors qu'une bonne régénération est associée normalement à la blessure du cristallin (Leon et al., 2000; Pernet and Di Polo, 2006). Afin d'assurer un meilleur résultat à long terme, il sera donc important d'identifier les approches qui stimulent survie et régénération, mais aussi de comprendre leurs mécanismes d'action afin de choisir les bonnes combinaisons.

## 1.4. Objectifs de la recherche présentée dans cette thèse

À cause de la relation établie entre l'action des molécules inhibitrices et l'activation de la GTPase Rho, une stratégie basée sur l'inactivation de Rho est très intéressante pour stimuler la régénération. Nous étions aussi intéressés à savoir si Rho avait un rôle à jouer dans la mort neuronale après une lésion.

Nous avons choisi d'utiliser le modèle de lésion du nerf optique, et nous avons déterminé l'objectif global suivant : « Étudier les effets des antagonistes de Rho sur la régénération et la survie des cellules ganglionnaires de la rétine après une lésion du nerf optique ». À cette fin, 3 objectifs détaillés ont été établis.

**Objectif 1.** Déterminer si l'application d'antagonistes de Rho au niveau des corps cellulaires des CGR peut stimuler leur survie et leur régénération.

**Objectif 2.** Déterminer si les antagonistes de Rho stimulent la régénération des CGR par le rétablissement du transport axonal lent.

**Objectif 3.** Déterminer si des applications répétées d'antagonistes de Rho peuvent augmenter la survie et la régénération des CGR par rapport à une application unique, et déterminer si le moment de l'application affecte le résultat.

**Chapitre 2. Article no 1 - Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats**

Bertrand, J <sup>a</sup>, Winton M.J. <sup>a</sup>, Rodriguez-Hernandez, N. <sup>c</sup>, Campenot, R.B. <sup>b</sup>, McKerracher, L. <sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup> Département de Pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal Québec, Canada, H3T 1J4; <sup>b</sup> Department of Cell Biology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, T6G 2H7; <sup>c</sup> BioAxone Thérapeutique Inc., Montréal, Québec Canada

\* To whom correspondence should be addressed:

Université de Montréal, Dépt. de Pathologie et biologie cellulaire  
2900 Edouard Montpetit, Pavillon Roger-Gaudry, S-507  
Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4,  
Tel : 514-282-9990 ext. 123; Fax : 514-343-5755  
E-mail : [REDACTED]

Development/Plasticity/Repair Neuroscience Senior Editor: Dr. Pat Levitt

Abbreviated title: Rho antagonist at cell bodies promotes axon regeneration

Number of figures: 7 (+ 2 supplemental)

Number of pages: 34

Keywords: Axon Regeneration, Optic nerve injury, Sympathetic neuron, Compartmented culture, RGC survival, Slow axonal transport

Acknowledgements: The authors thank Charles Essagian, Karen Lund and Rozica Bolovan for technical assistance, and gratefully acknowledge the CIHR for financial support. JB is supported by a CIHR scholarship.

## 2.1. Abstract

Inactivation of Rho promotes neurite growth on inhibitory substrates and axon regeneration *in vivo*. Here we compared axon growth when neuronal cell bodies or injured axons were treated with a cell-permeable Rho antagonist (C3-07) *in vitro* and *in vivo*. In neurons plated in compartmented cultures, application of C3-07 to either cell bodies or distal axons promoted axonal growth on myelin-associated glycoprotein (MAG) substrates. *In vivo*, an injection of C3-07 into the eye promoted regeneration of retinal ganglion cell (RGC) axons in the optic nerve after microcrush lesion. Delayed application of C3-07 promoted RGC growth across the lesion scar. Application of C3-07 completely prevented RGC cell death for 1 week after axotomy. To investigate the mechanism by which Rho inactivation promotes RGC growth, we studied slow axonal transport. Reduction in slow transport of cytoskeletal proteins was observed after axotomy, but inactivation of Rho did not increase slow axonal transport rates. Together, our results indicate that application of a Rho antagonist at the cell body is neuroprotective and overcomes growth inhibition, but does not fully prime RGCs for active growth.

## 2.2. Introduction

Central nervous system (CNS) neurons fail to spontaneously regenerate their axons following injury, partly because of growth inhibitors present in myelin and at the glial scar (McKerracher and Winton, 2002; David and Lacroix, 2003). Growth inhibitory proteins

activate Rho GTPase, which leads to growth cone collapse and growth inhibition (Jalink et al., 1994; Tigyi et al., 1996; Jin and Strittmatter, 1997; Lehmann et al., 1999). *In vitro*, treatment with the Rho specific antagonist C3-transferase inactivates Rho and stimulates neurite growth on inhibitory substrates (Dergham et al., 2002; Monnier et al., 2003). Cell permeable versions of C3 have been used for more effective Rho inactivation (Winton et al., 2002; Shearer et al., 2003). From such studies, it is not known whether Rho antagonists act on the cell body or growth cone to promote neurite growth.

A simple paradigm to study CNS regeneration is the adult rat optic nerve lesion. Strategies to promote retinal ganglion cell (RGC) regeneration by blocking growth inhibition *in vivo* often use local delivery techniques after optic nerve injury (Weibel et al., 1994; Lehmann et al., 1999). In contrast, treatments aimed at boosting axonal growth capacity are successful when acting on the cell body of RGCs (Berry et al., 1996; Leon et al., 2000; Cui et al., 2003; Yin et al., 2003; Fischer et al., 2004b; Monsul et al., 2004). The relationship between regenerative effects on cell bodies versus injured axons is not well understood.

RGCs die after optic nerve injury, and this must be taken into account when studying regeneration. In rats, transection of the optic nerve close to the eye causes a delayed RGC death, with cells beginning to die approximately 4 days later. One week after injury about 50% of RGCs have died, and by 2 weeks less than 20% survive (Villegas-Perez et al., 1993; Mansour-Robaey et al., 1994).



We previously demonstrated that Rho antagonists applied to injured optic nerve promote regeneration of RGC axons (Lehmann et al., 1999). Here we determine the effect of Rho antagonist application to cell bodies versus axons. For *in vitro* studies we used compartmented cultures, a well-characterized cell culture system in which cell bodies and proximal axons of superior cervical ganglion neurons are located in a separate fluid compartment from their distal axons (Campenot, 1977; Campenot and Martin, 2001). *In vivo*, injection into the eye after microlesion of the optic nerve provides an ideal model to examine regeneration after specific treatment of the cell body. We show that Rho antagonists promote axonal growth on inhibitory substrates when applied to either cell bodies or distal axons. As well, our results show that Rho antagonists promote RGC regeneration when applied to cell bodies, as previously observed when applied to injured axons (Lehmann et al., 1999), and that delayed treatments allow RGC axons to regenerate across the lesion scar. Intravitreal application of Rho antagonists also increased RGC survival. Despite its impact on RGC survival and regeneration, C3-07 does not boost slow axonal transport rates that decrease after axotomy.

## **2.3. Materials and methods**

### **2.3.1. Rho antagonists C3-05 and C3-07**

C3-05 is a modified version of C3-ADP-ribosyltransferase from *Clostridium botulinum* with an added transport sequence that facilitates entry into cells. C3-05 was

prepared as described (Winton et al., 2002) by affinity purification and was approximately 95% pure. During the course of our experiments, a newer version of C3-05 was made to increase purity and yield. C3-07 has the same enzymatic activity and transport sequence as C3-05, and its ability to inactivate Rho was verified by Rho pull-down assay, as described for C3-05 by Dubreuil et al (Dubreuil et al., 2003) (data not shown). C3-07 differs from C3-05 because the DNA sequence for the GST tag used for affinity purification of C3-05 was removed before subcloning into a pET vector. C3-07 was purified by fast-protein liquid chromatography (FPLC), as described (Han et al., 2001), and activity verified by neurite outgrowth assay, as for C3-05 (Winton et al., 2002). The FPLC-purified protein is approximately 99% pure

### **2.3.2. Axonal regrowth after axotomy in Campenot chambers**

Superior cervical ganglion (SCG) from postnatal day 0-1 were dissociated and plated into compartmented cultures (Tyler Research, Edmonton, Alberta) as described previously (Campenot and Martin, 2001). Briefly, compartmented cultures were constructed in collagen-coated 35 mm culture dishes, using a Teflon divider that separates the neurons into individual compartments (i.e. cell bodies and distal axons) (Figure 1A). The dish floor was patterned into twenty parallel collagen tracks bordered by scratches made with a specially constructed pin rake. To form the compartments, a Teflon divider was sealed to the dish floor with silicone grease. This sealing method was shown to prevent the exchange of media between the individual compartments (Campenot, 1977, 1979;

MacInnis et al., 2003). Neurons were then plated in the center compartment and extended axons under the grease barrier into the two side compartments. The cells were maintained in L15CO<sub>2</sub> medium supplemented with 2.5 % rat serum, 20 ng/ml NGF (Cedarlanes Laboratories, Hornby, Ontario), vitamin C and 10  $\mu$ M cytosine arabinside (CA) (Sigma, Oakville, Ontario). Distal axons were axotomized 5-7 days after plating by spraying cold, sterile water through a 0.22-gauge needle into the two side chambers. This process was repeated approximately 3-4 times, until all distal axons had been axotomized (Kimpinski et al., 1997; MacInnis et al., 2003). After axotomy, 2.5  $\mu$ g/ml C3-07 was added to the various compartments (i.e. cell body compartment only, distal axon compartments only, or all 3 compartments), and axonal growth into side chambers was measured 3 days after axotomy. The media was changed every 48 hours and C3-07 was re-added to the fresh media in treated compartments. Axonal growth was measured from the grease barrier to the tip of the longest axon in a track. Measurements were made with an inverted microscope fitted with a digitizer that tracks stage movements to an accuracy of  $\pm 5$   $\mu$ m (Campenot and Martin, 2001). Experiments were completed in triplicate with a minimum of 10 tracks per culture chamber.

After axonal growth was measured and with the Teflon dividers still in place, the cultures were washed twice with cold Tris buffered saline (TBS) and lysed in modified RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ g/ml leupeptin (Roche Diagnostics, Laval, Quebec), 1  $\mu$ g/ml aprotinin (Roche Diagnostics, Laval, Quebec), 1 mM

phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF, Sigma, Oakville, Ontario)). Separate lysates from cell bodies/proximal axons and distal axons compartments were pooled across 3 cultures, clarified by centrifugation at 14,000 g for 10 minutes at 4°C, and stored at -80°C. Proteins in the lysates were separated on 12% acrylamide gels and transferred to nitrocellulose. The membranes were blocked in 5% powdered milk, incubated in blocking buffer with a polyclonal C3 antibody (1:4000) (Winton et al., 2002), and the immunoreactive bands revealed by HRP-based chemiluminescent reaction (Pierce, Rockford, IL). Protein levels were determined by protein assay and verified by Ponceau Red staining.

### **2.3.3. Axonal growth on MAG in Campenot chambers**

MAG-coated dishes were prepared one day prior to use. MAG was purified as described (McKerracher et al., 1994) and applied to collagen-coated 35 mm dishes at 4 µg total protein per dish, and allowed to dry overnight in a laminar flow hood. MAG was applied only in areas that would correspond to the side chambers of the compartmented culture. After the MAG substrate had dried, the dishes were washed with water, the compartmented cultures were assembled, and dissociated SCG neurons were plated in the center compartments. After 1 day in culture, C3-07 (2.5 µg/ml) was added to either the cell body/proximal axon compartment only, the distal axon compartments only, or all 3 compartments, and axonal growth into the side compartments was measured for 3 consecutive days. The media was changed after 48 hours, at which time the C3-07 was

replenished in the fresh media in treated compartments. Experiments were completed in triplicate with a minimum of 10 tracks measured per culture chamber.

#### **2.3.4. Intraorbital microlesion surgery and C3-05/07 treatment**

Intraorbital microlesions effectively axotomize all RGC axons and provide a well-defined lesion site (Selles-Navarro et al., 2001). Microlesions were performed on female Sprague-Dawley rats (180-200 g) (Charles River, St-Constant, Québec), under gas anesthesia with 2.5-3% isoflurane in oxygen. The left optic nerve was exposed, the dural sheath was slit longitudinally, and the nerve was crushed 1 mm from the globe by holding a tight knot made with a 10-0 suture for 60 seconds. The suture was then completely removed. Treated animals were injected intravitreally with 10 µg of C3-05 or 1 µg of C3-07, in 5 µl of PBS, immediately after the microlesion or 4 days later. Control animals were injected with 5 µl of PBS. The injections were made with a fine glass tube attached to a 10 µl Hamilton syringe. Care was taken not to touch the lens during the injection, and animals that showed signs of lens injury were excluded from the study. The needle was slowly removed, and the injection site was sealed with surgical glue (Indermill, Tyco Health Care Canada, Montréal, Québec). The skin was sutured with 4-0 silk. The vascular integrity of the retina was verified by fundus examination, and animals whose retina showed ischemic damage were excluded from the study. Rats were examined for regeneration 2 or 4 weeks later. To quantify regeneration 2 weeks after optic nerve injury and immediate treatment, 11 animals were treated with the Rho antagonists, C3-05 or

C3-07, and 10 animals served as buffer and lesion controls. We used 5 C3-07 treated and 10 control rats in similar experiments where regeneration was allowed to continue for 4 weeks. We used 8 C3-07 treated and 5 control rats to evaluate regeneration 2 weeks after lesion when application of C3-07 was delayed until 4 days after lesion. All animals were given a dose of 0.015 mg/kg of buprenorphine as analgesic after surgery. Animals were kept in a controlled environment where they were exposed to a 12 hour light/dark cycle and had *ad libitum* access to food and water. All animal procedures followed guidelines from Canadian Council of Animal Care.

### **2.3.5. Anterograde labeling, immunohistochemistry and quantification of axon growth**

Regenerating axons in the optic nerve were identified by anterograde labeling. Animals received an intravitreal injection of 5  $\mu$ l of 1% cholera toxin  $\beta$  subunit (CT $\beta$ ) (Sigma, Oakville, Ontario) 24 hours before sacrifice. Animals were deeply anesthetized with a 7% chloral hydrate overdose, followed immediately by intracardial perfusion with saline, then 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 (PB). The eyes were dissected in cold PBS, and the optic nerve was separated from the eye behind the globe. The nerves were cryoprotected overnight in 30% sucrose in PBS, embedded in Tissue-Tek (VWR, Montréal, Québec) and frozen in 2-methylbutane in a liquid nitrogen bath. Longitudinal cryostat sections of optic nerves (14  $\mu$ m) were mounted on Superfrost Plus slides (Fisher, Montréal, Québec) and stored at  $-80^{\circ}$  C.

To detect CT $\beta$  in RGC axons, slides were post-fixed in 4% PFA in 0.1 M PB and blocked for 1 hour with 5% normal rabbit serum, 3% bovine serum albumine (BSA), 0,2% Triton X-100 and 1 mM sodium azide. Slides were then incubated overnight with a goat choleraenoid antibody (1:4000) from List Biological Laboratories (Cedarlanes Laboratories, Hornby, Ontario), followed by a 1 hour incubation with an anti-goat biotinylated antibody (1:200) (Vector Laboratories, Burlington, Ontario), and a 1 hour incubation with streptavidin conjugated to dichlorotriazinyl amino fluorescein (DTAF) (1:400) from Jackson Immuno Research (Cedarlanes Laboratories, Hornby, Ontario).

Four to ten sections per animal were examined by epifluorescence microscopy, to detect CT $\beta$ -labeled axons, and photographed. The lesion site was identified using both the CT $\beta$  staining and dark field microscopy. Regeneration was measured by counting the number of CT $\beta$ -positive axons crossing a line parallel to the lesion site at distances of 50, 100, 250 and 500  $\mu$ m. The longest axon was measured for each animal. Statistical significances were established using Student's *t*-test (\*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ). Statistical tests were performed using In Stat (Graph Pad, San Diego, California).

### **2.3.6. Western blots of retina and optic nerve homogenates**

Microlesion of the left optic nerve was performed as described above, and 5  $\mu$ g of C3-07 was injected intravitreally. Animals were sacrificed 3 days later by a 7% chloral

hydrate overdose, followed by an intracardial perfusion with saline. The retina and first 2 mm segment of the optic nerve were removed, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Tissues were homogenized in 160  $\mu\text{l}$  (retinas) or 20  $\mu\text{l}$  (optic nerve segments) of Np40 lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 137.5 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Np40, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin (Roche Diagnostics, Laval, Quebec), 1 mM PMSF). Lysates were clarified by high speed centrifugation for 5 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatants were removed and centrifuged at high speed for 15 minutes. Samples (20  $\mu\text{l}$ ) were separated on a 12% acrylamide gel and transferred to nitrocellulose. Membranes were blocked in 5% powdered milk and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with a polyclonal C3 antibody (1:25000). The signals were revealed by HRP-based chemiluminescent reaction (Pierce, Rockford, IL).

### **2.3.7. Retrograde labeling and quantitation of RGC survival.**

RGCs were retrogradely labeled from the superior colliculus with Fluorogold (Fluorochrome, Denver, CO). The right midbrain was exposed, the pia matter overlying the superior colliculus removed, and small pieces of gelfoam soaked in a 2% solution of Fluorogold in 0,9% saline containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, Oakville, Ontario) were applied to the surface of the superior colliculus. One week later, the left optic nerve was transected 1 mm from the globe, and the left eye was injected intravitreally with 1  $\mu\text{g}$  or 10  $\mu\text{g}$  of C3-07 in 5  $\mu\text{l}$  of vehicle or with vehicle only (5 mM HEPES). Whole mounts of retinas were prepared from perfused animals at 7 days or 14 days after optic



nerve injury. Labeled RGCs were counted under fluorescence microscopy in 2 regions, located 1 and 2 mm from the optic disc, of 2 quadrants of the retina, and average density of RGCs was evaluated in RGCs/mm<sup>2</sup>.

### **2.3.8. Radiolabeling and intracranial optic nerve crush**

To radiolabel RGC proteins in the left eye, intraocular injection of 250 uCi of <sup>35</sup>S-methionine (ICN Canada, Montréal, Québec) in 5 µl saline was performed on female Sprague-Dawley rats (180-200 g), under gas anesthesia with 2.5-3% isoflurane in oxygen. Intracranial crush was performed on the left optic nerve by aspirating a portion of the left frontal lobe. The RGC axons were severed just in front of the chiasma, approximately 9 mm from the optic disc, by crushing the optic nerve 2 to 3 times, for 5 to 10 seconds, with fine forceps. Treated animals were injected in the left eye with 1 µg of C3-07, diluted in 5 µl of PBS, while control animals were injected with 5 µl of PBS. In groups subjected to a crush and treatment, the injection was performed immediately after the crush. Intravitreal injections, skin suturing, verification of vascular integrity and administration of post surgery analgesic were performed as described above. Animals were injected subcutaneously with 10 ml of saline after optic nerve crush surgery.

Animals were separated in 5 groups for axonal transport experiments. Two groups were sacrificed 6 (n = 3) or 14 days (n = 3) after labeling, without nerve crush or treatment. The remaining groups were all sacrificed 14 days after labeling, following an intracranial crush performed 6 days after labeling. One group received a C3-07 injection right after the

lesion (n = 4), another received a PBS injection (n = 3), and the last group had no injection (n = 4).

In another experiment, animals did not have an optic nerve crush, but received a C3-07 injection 6 days after labeling and were sacrificed 8 days later (n = 3).

### **2.3.9. Evaluation of slow axonal transport**

Six or 14 days after radiolabeling, animals used for slow axonal transport experiments were sacrificed by a 7% chloral hydrate overdose, followed immediately by intracardial perfusion with saline. The left optic nerve was removed, cut into 2 mm segments and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Each 2 mm segment of optic nerve was homogenized in 60  $\mu\text{l}$  of SDS-PAGE sample buffer using a motorized Teflon-in-glass homogenizer. The samples were clarified by high speed microcentrifugation for 5 minutes, and 40  $\mu\text{l}$  of supernatant per sample were boiled for 3 minutes and clarified again by high speed microcentrifugation for 15 minutes. Samples were then loaded on 7.5% acrylamide gels for electrophoretic separation. The gels were stained with Coomassie blue, destained in 10% acetic acid, impregnated with Amplify (Amersham, Montréal, Québec), dried and exposed to pre-flashed Hyperfilm MP (Amersham, Montréal, Québec) for periods varying from 1 to 6 days. Slow axonal transport was assessed by following the advance of the 150 kDa middle neurofilament subunit (NF-M) labeling front across the 5 optic nerve segments. The position of the front was determined as the segment preceding the one where the protein density dropped to 10% of its highest value for that animal. The expression level of NF-M

is 85% of controls 2 weeks after an intracranial crush of the optic nerve (McKerracher et al., 1993). NF-M lanes of an autoradiograph were scanned for densitometry using an Epson perfection 1200U scanner, transferred to Adobe Photoshop 6.0 and the images were analysed with the densitometry IQ MAC 1.2 software (Molecular Dynamics)..

## **2.4. Results**

### **2.4.1. Localized application of C3-07 after axotomy**

To determine any effects of C3-07 on normal axon growth, we applied cell-permeable Rho antagonist C3-07 to cell bodies or distal axons in sympathetic neurons plated in compartmented cultures (Fig. 1A). The cultures were maintained for 5 to 7 days at which time axons in the distal chambers were axotomized. Immediately after axotomy, media with C3-07 (2.5 µg/ml) was added to selected compartments, and axonal regrowth was measured 3 days later. C3-07 did not significantly increase the rate that axons extended along the tracks after axotomy, but there was approximately 15% enhancement of growth rate, independently of the site of application (Fig. 1B). Treatment of both cell bodies and axons did not further increase the response to the treatment.

After axonal regrowth was measured in the above experiment, lysates from cell body compartments and distal axon compartments were prepared and the proteins separated by electrophoresis. Western blot analysis revealed that the preponderance of C3-07 localized to the cellular regions within the compartments in which it was directly applied,

although a relatively small amount of C3-07 applied to cell bodies traveled into distal axons and vice versa (Fig. 1C).

#### **2.4.2. Localized application of C3-07 promotes axonal growth on MAG substrate**

Inactivation of Rho stimulates neurite outgrowth on inhibitory substrates when neurons in culture are exposed to Rho antagonists (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002; Winton et al., 2002; Monnier et al., 2003). We determined if C3-07 application to either the cell body compartment or the distal axon compartments was sufficient to overcome growth inhibition by myelin-associated glycoprotein (MAG). The MAG substrate was added to the side compartments of collagen-coated dishes, in areas that would correspond to the side chambers of the compartmented cultures. Sympathetic neurons were plated in the center compartment, and after 1 day in culture, when axons were just entering the side compartments, C3-07 (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) was added to the culture media of the cell body compartment, or both distal axon compartments or all 3 compartments. Without C3-07 treatment, most axons contacting the MAG substrate collapsed, inhibiting neurite outgrowth (Fig. 2A, B). With C3-07 treatment however, axonal growth on MAG (Fig. 2C) was similar to growth of control axons on collagen (Fig. 2D). Addition of C3-07 to either the cell body compartment or the distal axon compartments was sufficient to induce growth on MAG, but axonal length was not further increased when all compartments were exposed to C3-07 (Fig. 2E). After 3 days, treatment of the cell body compartment resulted in an

average growth of 2.3 mm, compared to 2.5 mm for treatment of the distal axons compartments or for treatment of all compartments. At the same time point, the axons of control neurons plated on collagen without MAG had grown about 25% farther than the axons of C3-07 treated neurons growing on the MAG substrate (Fig. 2E). Most of this difference occurred between days 2 and 3 of growth. Since the C3-07 had been replenished on day 2, this was not likely produced by a reduction of the effect of C3-07. Rather, it seems likely that the growth promoting effect of C3-07 does not last indefinitely. Therefore, we conclude that C3-07 promotes axonal growth on inhibitory MAG substrate, irrespective of the site of application.

#### **2.4.3. Intravitreal injection of C3-05 or C3-07 stimulates regeneration in the optic nerve**

Previous results demonstrated that in the adult rat, an application of C3 at the site of an optic nerve lesion promotes axon regeneration (Lehmann et al., 1999). To test if treatment of the RGC cell bodies promoted regeneration *in vivo*, we injected Rho antagonists into the vitreous immediately after microlesion of the optic nerve 1 mm behind the optic disc. In the first experiments, we used C3-05 (n = 4), an affinity-purified cell permeable variant of C3, until a more highly purified version, C3-07 (n = 7), became available. Both have the same enzymatic activity and transport sequence. Control animals received a PBS injection (n = 5), or microlesion alone (n = 5). Axon regeneration in the

optic nerve was evaluated 14 days later, following an injection of the anterograde tracer cholera toxin  $\beta$  subunit (CT $\beta$ ).

Two weeks after microlesion, virtually no CT $\beta$ -positive axons were detectable in control animals (Fig. 3A), while a large number of axons were visible past the lesion site in C3-05 (Fig. 3B) and C3-07 treated rats (Fig. 3C). The microcrush injury model provides a clearly defined lesion site with little or no cavitation (Selles-Navarro et al., 2001), and the lesion site was identified by dark field microscopy and/or CT $\beta$  staining. The number of axons present at different distances past the lesion site were then counted. Animals treated with C3-05 (Fig. 3D) or C3-07 (Fig. 3E) had a significantly higher number of regenerating axons per section than controls, at distances of 50, 100 and 250  $\mu$ m from the lesion site. Regeneration in animals injected with C3-07 was similar to that of C3-05 treated animals, but we observed a greater number of longer axons in some animals treated with the more highly purified C3-07 (Fig. 3C).

C3-05 was also used to evaluate regeneration four weeks after microlesion. At that time point, we still observed significantly more axons growing past the lesion site in the C3-05 treated group (n = 5) than in the control groups (PBS n = 5, or microlesion alone n = 5) at distances of 50, 100 and 250  $\mu$ m (Fig. 4).

These results indicate that application of Rho antagonists C3-05/07 to RGC cell bodies can promote optic nerve regeneration after microlesion. To examine if treatment had

a sustained effect on axon growth, we compared the average length of the longest axon in treated optic nerves 2 and 4 weeks after axotomy. No significant differences in axon length were detected at 4 weeks compared to 2 weeks (not shown), suggesting that a single treatment does not result in sustained long-term growth.

To examine the localization of C3-07 after injection in the eye, we injected 5  $\mu$ g of C3-07 in the eye after microlesion of the optic nerve. We prepared retina and optic nerve homogenates for Western blots 3 days later, and probed them with an anti-C3 antibody. The specific C3-07 band was compared with recombinant C3-07 protein run in a separate lane (not shown). We observed full length C3-07 in optic nerve lysates when C3-07 was injected in the eye (Supplemental figure no 1, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org)), in agreement with *in vitro* studies with compartmented cultures.

#### **2.4.4. Delayed treatment with C3-07 stimulates regeneration through the lesion scar**

By 24 hours after microlesion, a CSPG positive scar is well formed (Selles-Navarro et al., 2001). To determine if a delayed treatment with C3-07 stimulated regeneration of RGCs through the lesion scar, we injected C3-07 (n = 8) in the vitreous 4 days after microlesion of the optic nerve, and examined regeneration 10 days later. Control animals were injected with PBS (n = 5). A large number of CT $\beta$ -positive axons could be seen past the lesion site in treated animals, while very few were observed in PBS controls (Fig. 5A). Animals treated with C3-07 had a significantly higher number of regenerating axons per

section than controls, at distances of 50, 100, 250 and 500  $\mu\text{m}$  from the lesion site (Fig. 5B). A comparison of number of axons per section showed similar numbers of regenerating axons in animals treated with an immediate (Fig. 3D) or delayed (Fig. 5B) injection of C3-07. The average longest axon was significantly longer in animals receiving either an immediate or delayed C3-07 treatment than in PBS controls (Fig. 5C). These results demonstrate the existence of a therapeutic window for a Rho antagonist treatment after optic nerve injury, and indicate that inactivation of Rho allows RGC axons to grow across the lesion scar.

#### **2.4.5. Intravitreal injection of C3-07 increases RGC survival**

We previously reported that inactivation of Rho prevented apoptotic cell death after spinal cord injury (Dubreuil et al., 2003). After injury of the optic nerve approximately half of the RGCs die by apoptosis by 1 week. To determine if a single intravitreal injection of C3-07 protected RGC from cell death, we examined RGC survival in retinal whole mounts. RGCs were retrogradely labeled with Fluorogold one week prior to optic nerve axotomy, and surviving RGCs were counted 7 or 14 days later in animals treated with C3-07 (n=7 at 7 days, n=5 at 14 days) or vehicle control (n=3 at 7 days, n=4 at 14 days). Treatment with C3-07 completely rescued RGCs 1 week after axotomy, compared to 40 % survival in vehicle injected animals (Fig. 6). RGC survival after a single injection was not sustained and RGC numbers decreased after one week. However, at 14 days, cell survival was still



significantly better with C3-07 treatment, with more than twice the number of RGCs in treated animals compared to controls.

#### **2.4.6. Slow axonal transport after C3-07 treatment**

Axonal transport in normal and injured optic nerve of adult rat has been well described (McQuarrie et al., 1986, 1989; McKerracher et al., 1990) and is detected by examining the movement of  $^{35}\text{S}$ -methionine-labeled proteins along 2 mm optic nerve segments. In uninjured optic nerve the rate of slow axonal transport of neurofilament, as detected by the 150 kDa middle neurofilament subunit (NF-M), is approximately 0.5 mm/day (McQuarrie et al., 1986), and the transport rate decreases significantly when the optic nerve is crushed intracranially near the optic chiasma (McKerracher et al., 1990). To determine if C3-07 had an impact on slow axonal transport, the optic nerve was crushed 6 days after labeling, a time when tubulin and neurofilament proteins enter the optic nerve (Fig. 7A). Control animals received no injection or were injected with PBS, and treated animals received an intraocular injection of C3-07 immediately after the crush. Optic nerves were removed 8 days after crush, a total of 14 days after labeling, and were cut into 5 segments of 2 mm each (Supplemental figure no 2, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org)).

The NF-M front in uninjured control animals reached the second segment 6 days after labeling (Fig. 7A) and progressed to the fifth segment by 14 days after labeling (Fig. 7B). In untreated animals whose nerve was crushed 6 days after labeling, the NF-M front reached the third segment 14 days after labeling (Fig. 7C and D). This distance is similar to

that observed in animals who were sacrificed 6 days after labeling (Fig. 7A), showing a dramatic decrease in slow axonal transport after optic nerve crush. When C3-07 was injected in the vitreous immediately after the optic nerve crush (Fig. 7E), the NF-M front traveled no further than it did in control axotomized animals with no injection (Fig. 7C) or PBS injection (Fig. 7D). Therefore, C3-07 did not increase slow axonal transport after injury. We also tested if C3-07 affected slow axonal transport in uninjured nerve. The distance traveled by the NF-M front in uninjured animals after C3-07 injection at day 6 after labeling was not changed at 14 days (data not shown).

## 2.5. Discussion

These findings show that C3-based Rho antagonists have a growth-promoting effect on distal axons even when applied to neuronal cell bodies. Our *in vitro* experiments with compartmented cultures indicate that C3-07 promotes axonal growth on inhibitory substrates, when applied to either cell bodies or distal axons. Previous treatments tested in compartmented cultures, such as NGF (Campenot, 1994) or glial cell-conditioned medium (Hayashi et al., 2004), promoted axonal growth when applied in distal axon compartments, but not when applied in the cell body chamber. *In vivo*, treatment of cell bodies with an intraocular application of C3-05 or C3-07 promoted axon regeneration similar to that obtained with an application of C3 to injured optic nerve (Lehmann et al., 1999). Therefore, both *in vitro* and *in vivo* experiments suggest that the site of application of Rho antagonists

is not determinant for promoting axonal growth and regeneration in the presence of growth inhibitors.

We are the first to directly compare the effect of the application of a Rho antagonist to cell bodies versus injured axons. Other studies show growth promoting factors are effective in stimulating axonal regeneration when applied to the eye, such as factors secreted in the retina following lens injury or intravitreal implantation of peripheral nerve graft (So and Aguayo, 1985; Leon et al., 2000). Intravitreal grafting of acellular peripheral nerve has a small regenerative effect on RGCs (Berry et al., 1996) while acellular grafts connected to the cut end of the optic nerve do not (Berry et al., 1988; Hall and Berry, 1989). By contrast, inhibitors of Nogo have only been tested after application to the injured optic nerve (Weibel et al., 1994; Cui et al., 2004).

The similarity of results on axonal growth and regeneration when C3-07 is applied at the cell bodies or injured axons can be explained, at least in part, by diffusion or active transport of C3-07 between cell body and axon. C3-07 initially applied to the cell body was later detected in untreated axons in both our *in vitro* and *in vivo* experiments. Therefore, the effect of Rho antagonists on regeneration could result from known actions on the actin cytoskeleton at the growth cones. C3-07 might prevent growth cone collapse through its known action on blocking inhibitory signaling. The increased survival observed 2 weeks after lesion in C3-07-treated animals might also contribute to the higher level of

regeneration, although survival strategies alone are not sufficient to promote regeneration (Mansour-Robaey et al., 1994; Inoue et al., 2002).

We report here that treatment with C3-07 prevented death of RGCs for at least one week, a finding consistent with a recent report on RGCs transfected in vivo with a C3-construct where increased RGC survival was reported (Fischer et al., 2004b). One difference in the two studies however, is that Fischer et al reported only a partial increase in RGC survival, perhaps explained by transfection efficiency. Possibly, the application of cell permeable C3-07 in our study affected other cells, such as Muller cells, that might also influence cell survival. It is important to note that the survival rates that we report here are comparable to the best results obtained when the neurotrophic factor BDNF is injected in the vitreous after axotomy (Mansour-Robaey et al., 1994; Peinado-Ramon et al., 1996). BDNF is also able to rescue all RGCs from axotomy at 1 week after intraocular injection, and RGCs begin to die between 7 days and 14 days. Similarly, the effect of C3-07 is not sustained after a single application, and RGCs begin to die between one and two weeks after axotomy.

We have previously shown that CSPG immunoreactive proteins are expressed at the optic nerve lesion site as early as 24 hours after the injury (Selles-Navarro et al., 2001). The axonal regeneration observed when application of C3-07 was delayed for 4 days after optic nerve injury demonstrates that RGC can grow past the scar when Rho is inactivated. This observation supports studies showing that Rho inactivation with C3-07 promotes axon

growth through scars formed *in vitro* with meningeal cells that express CSPGs (Shearer et al., 2003).

Our results clearly show that inactivating Rho with C3-07 applied to the cell bodies promotes regeneration of RGC axons. However, regenerating axons did not grow for long distances after crossing the lesion site, a result consistent with findings from most studies on regeneration in the rat optic nerve (Lehmann et al., 1999; Leon et al., 2000; Ellezam et al., 2003; Sapieha et al., 2003; Fischer et al., 2004a). Treatments such as vaccination with a spinal cord homogenate or application of C3 to the lesion site can induce a much longer regeneration in the spinal cord (Huang et al., 1999; Dergham et al., 2002) than in the optic nerve (Lehmann et al., 1999; Ellezam et al., 2003), a finding not well understood. The number of regenerating axons is another important determinant when examining regeneration. Although numbers of regenerating RGCs are significant after Rho inactivation, the number of RGCs that regenerate are small, even though C3-07 has a survival-promoting effect. We estimate that only 0.5% of RGC axons extend past the lesion site. This small number could be explained in part by the finding that less than 1% of postnatal RGCs retain rapid axonal elongation capabilities (Goldberg et al., 2002a). By contrast, many more RGCs can grow in the permissive environment of a PN graft (Villegas-Perez et al., 1988; Cui et al., 2003). It was recently shown that the combination of Rho inactivation with lens injury could increase dramatically the success of regeneration, compared with C3 alone, even though not all RGCs were transfected with the C3 construct (Fischer et al., 2004b). It has been suggested that combination therapies offer the best hope

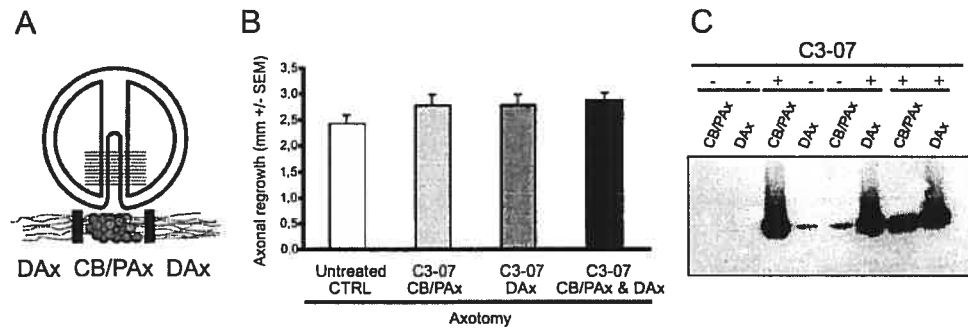
for robust and substantial regeneration, a suggestion supported by other recent investigations of RGC regeneration. Combining CNTF treatment with Nogo-neutralizing antibody IN-1 (Cui et al., 2004) was more effective than either strategy alone. Dominant negative Nogo receptor expressed in RGCs *in vivo* does not promote regeneration, but when combined with lens injury, there was a robust regeneration, better than lens injury alone (Fischer et al., 2004a). RGCs lose their trophic responsiveness following axotomy (Shen et al., 1999) and RGCs require “priming”, such as by treatment with cAMP, to help increase their responsiveness to neurotrophic factors (Goldberg et al., 2002b). Taken together, current studies suggest that combining Rho inactivation with treatments that prime mature RGCs into a growth mode enhances the number of RGCs regenerating over long distances into an inhibitory environment.

Our experiments confirmed a previous report that slow axonal transport is almost completely stopped after an intracranial crush of the optic nerve (McKerracher et al., 1990). Typically, RGCs do not regenerate with intracranial injury, even when a peripheral nerve graft is provided (Richardson et al., 1982; You et al., 2000). However, combining intraocular growth factors with a peripheral nerve graft promotes RGC regeneration after distal axotomy (Cui et al., 1999). Slow axonal transport is critical to regeneration because it supplies cytoskeletal proteins that are required to support axon elongation. To test the effect of Rho inactivation on slow axonal transport we axotomized optic nerves near the chiasma, which is almost 1 cm farther than the site of axotomy used for our regeneration experiments. This change was necessary to provide a sufficient length of optic nerve for the

transport experiments, but it should be noted that there are differences in RGC survival and regenerative ability with intraorbital and intracranial axotomy (Villegas-Perez et al., 1993; You et al., 2000). C3-07 did not prevent the decrease in slow axonal transport after intracranial axotomy, suggesting that, under these conditions, C3-07 does not have a “priming” effect, even though it can promote RGC survival.

## 2.6. Figures

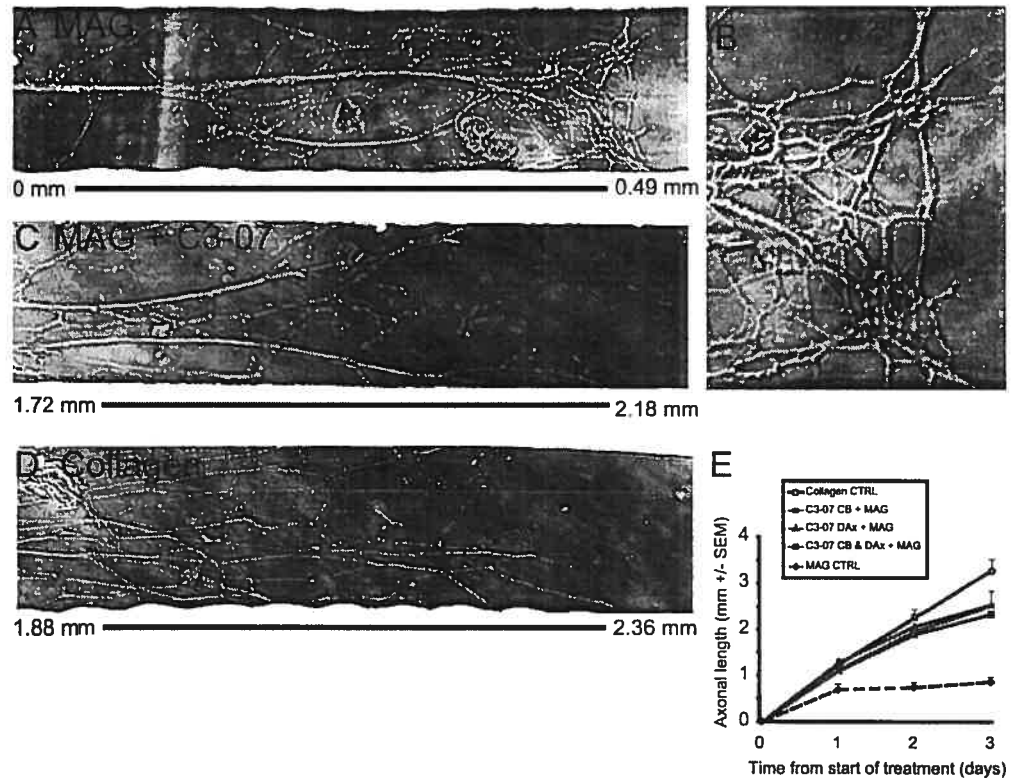
**Figure 1. C3-07 and axonal regrowth *in vitro* after axotomy.**



**Figure 1. C3-07 and axonal regrowth *in vitro* after axotomy.** (A) Diagram of compartmented culture showing the Teflon divider and an enlargement of the neurons on a single track among the 16-20 tracks in an individual culture. Compartmented cultures isolate cells bodies and proximal axons (CB/PAx) and distal axons (DAx) of neurons in isolated fluidic compartments. (B) Axonal regrowth of axotomized axons following application of C3-07 to cell bodies, distal axons, or both. Data represents the average of three or more experiments each employing triplicate cultures. (C) Location of C3-07 3 days after application to the cell bodies, distal axons, or both. Four experiments on a Western blot are shown (dashed line), with + and - indicating where C3-07 was applied or not. Each lane shows pooled lysates from 3 chambers, probed with a polyclonal anti-C3 antibody.

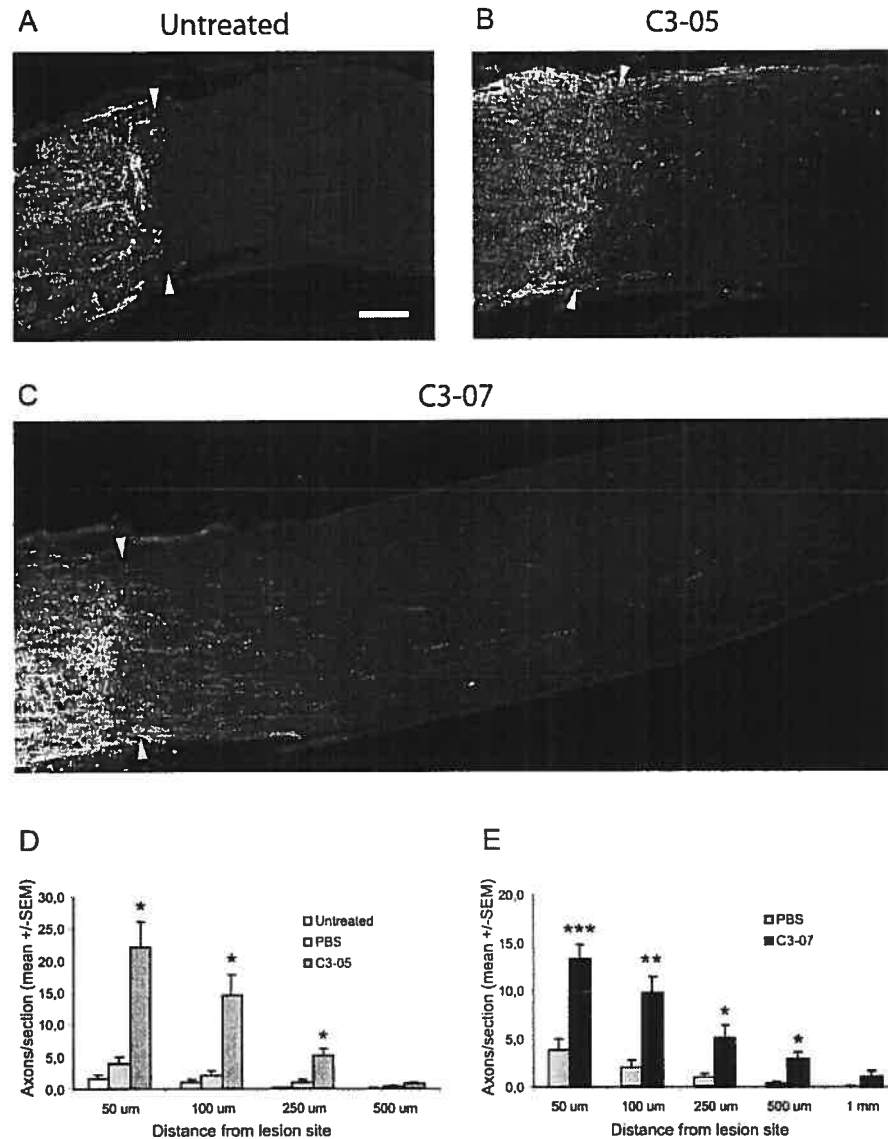


**Figure 2. C3-07 promotes axonal growth on MAG substrates, independently of the cellular location of application.**



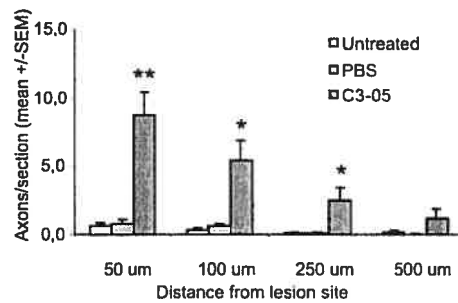
**Figure 2. C3-07 promotes axonal growth on MAG substrates, independently of the cellular location of application.** (A-D) Micrographs of the most distal region of axons of rat sympathetic neurons plated in Campenot chambers, with the measurement bar to show the distance of axon growth. (A) Axons on MAG substrates which stop at 0.49 mm; (B) higher magnification of same micrograph as in (A) showing distal axons as they contact MAG substrates; (C) axons on MAG substrates and treated with C3-07 grow over 2 mm; (D) axons plated on collagen substrates grow over 2 mm (E) Measurement of the average axonal length. Data represents the average of four or more experiments performed in triplicate

**Figure 3. Immediate treatment with intravitreal injection of C3-05 or C3-07 stimulates regeneration in the optic nerve after 2 weeks.**



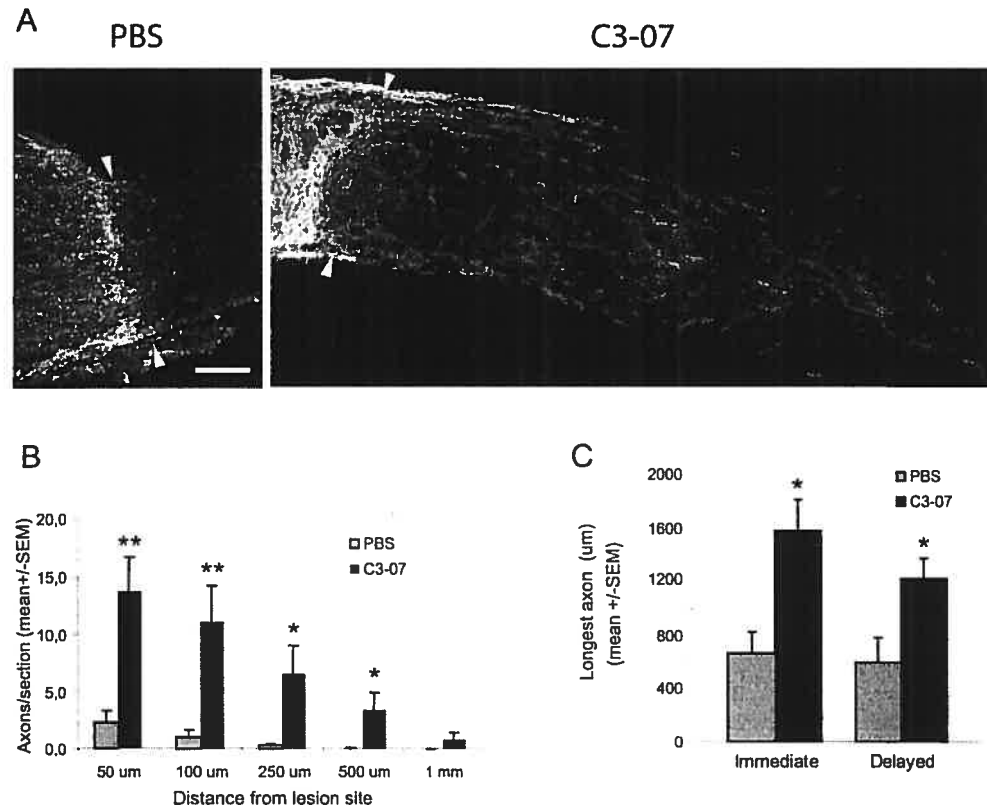
**Figure 3. Immediate treatment with intravitreal injection of C3-05 or C3-07 stimulates regeneration in the optic nerve after 2 weeks.** (A-C) Photographs of optic nerve sections immunostained with a CT $\beta$  antibody to reveal axons regenerating distally to the lesion site (arrowheads) 2 weeks after microlesion in untreated (A), C3-05 (B) or C3-07 (C) treated animal. (D-E) Quantification of regeneration, 2 weeks after microlesion, in C3-05 (D) and C3-07 (E) treated animals, compared to controls. Scale bar (in A) for A-C: 100  $\mu$ m. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  Student's t-test.

**Figure 4. Immediate treatment with intravitreal injection of C3-05 stimulates regeneration in the optic nerve after 4 weeks.**



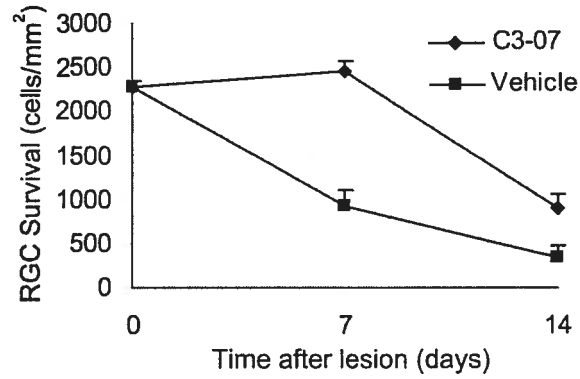
**Figure 4. Immediate treatment with intravitreal injection of C3-05 stimulates regeneration in the optic nerve after 4 weeks.** Quantification of regeneration, 4 weeks after microlesion, in C3-05 treated animals compared to controls. \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  Student's t-test.

**Figure 5. Delayed treatment with C3-07 promotes regeneration past the lesion site.**



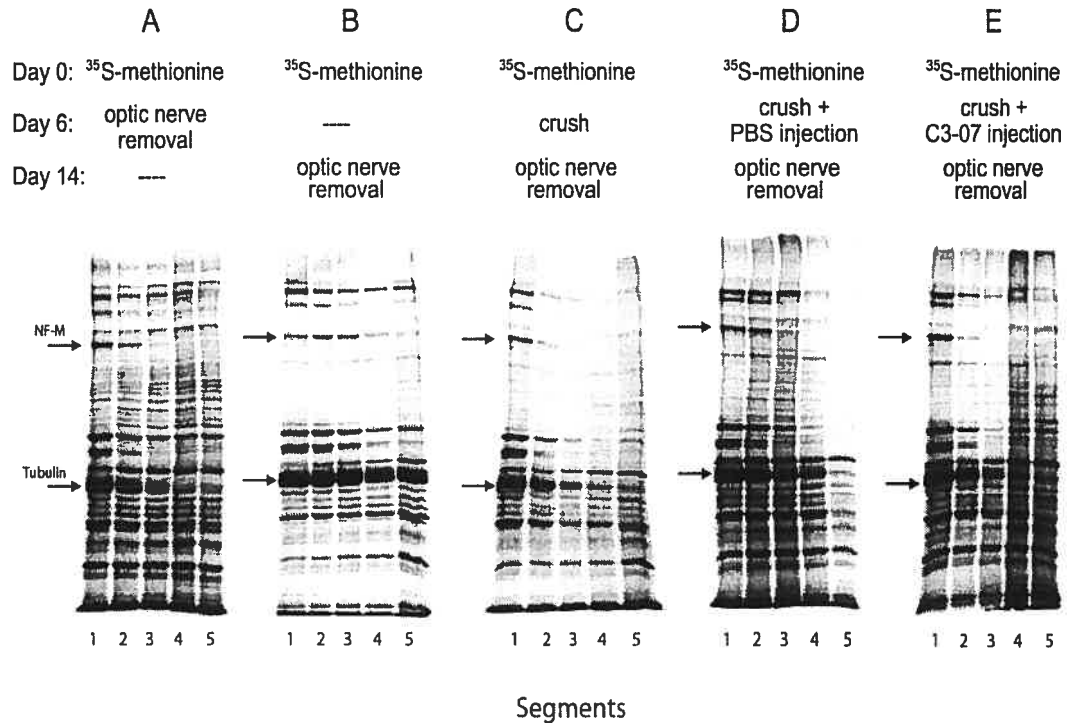
**Figure 5. Delayed treatment with C3-07 promotes regeneration past the lesion site.** (A) Photographs of optic nerve sections immunostained with CT $\beta$  antibody to reveal axons regenerating distally to the lesion site (arrowheads) 2 weeks after microlesion in C3-07 treated animals and PBS controls. C3-07 or PBS was injected into the vitreous 4 days after optic nerve injury. Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) Quantification of regeneration in C3-07 treated animals compared to controls. (C) Comparison of average longest axon in each treatment group, following an immediate or delayed treatment. \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  Student's t-test

**Figure 6. C3-07 promotes survival of axotomized RGCs.**



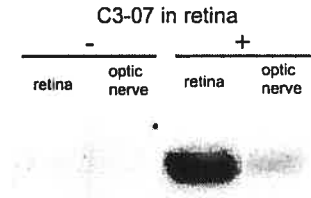
**Figure 6. C3-07 promotes survival of axotomized RGCs.** RGCs were retrogradely labeled one week before optic nerve injury. C3-07 or vehicle were injected into the vitreous after optic nerve transection, and retrogradely labeled RGCs were counted in retinal whole mounts prepared 7 days or 14 days after axotomy.

**Figure 7. C3-07 does not accelerate slow axonal transport after intracranial optic nerve crush.**



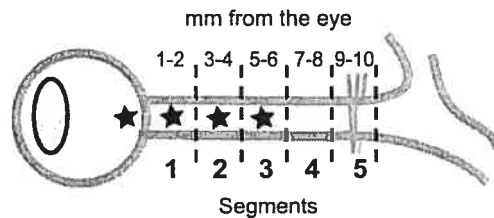
**Figure 7. C3-07 does not accelerate slow axonal transport after intracranial optic nerve crush.** Detection of slowly transported tubulin and NF-M (arrows) after <sup>35</sup>S-methionine-labeling shows the labeling front as these proteins are transported into the optic nerve with time. (A-B) Transport in normal optic nerve detected at day 6 (A) and day 14 (B). (C-E) Axonal transport after optic nerve injury alone (C), injury and PBS injection (D) or injury and C3-07 injection (E).

**Supplemental figure 1. Detection of C3-07 in retinal and optic nerve Western blot.**



**Supplemental figure 1. Detection of C3-07 in retinal and optic nerve by Western blot.** Tissue homogenates were prepared from untreated retinas and optic nerves, and retinas and optic nerves 3 days after injection with C3-07. Western blots were probed with anti-C3 antibody.

**Supplemental figure 2. Diagram of sample collection for axonal transport experiments.**



**Supplemental figure 2. Diagram of sample collection for axonal transport experiments.** Optic nerves are removed and cut into 5 segments of 2 mm each to study axonal transport after injection of  $^{35}\text{S}$ -methionine into the eye. The optic nerve crush is performed intracranially, near the chiasma, 6 days after labeling.

## 2.7. References

- Berry M, Carlile J, Hunter A (1996) Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. *J Neurocytol* 25:147-170.
- Berry M, Hall S, Follows R, Rees L, Gregson N, Sievers J (1988) Response of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts. *J Neurocytol* 17:727-744.
- Campenot RB (1977) Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:4516-4519.
- Campenot RB (1979) Independent control of the local environment of somas and neurites. *Methods Enzymol* 58:302-307.
- Campenot RB (1994) NGF and the local control of nerve terminal growth. *J Neurobiol* 25:599-611.
- Campenot RB, Martin G (2001) Construction and Use of Compartmented Cultures for Studies of Cell Biology of Neurons. In: *Protocols for Neural Cell Culture* (Federoff A, Richardson A, eds), pp 49-57. Totowa, NJ, USA: Humana Press.
- Cui Q, Lu Q, So KF, Yip HK (1999) CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:760-766.
- Cui Q, Cho KS, So KF, Yip HK (2004) Synergistic effect of Nogo-neutralizing antibody IN-1 and ciliary neurotrophic factor on axonal regeneration in adult rodent visual systems. *J Neurotrauma* 21:617-625.
- Cui Q, Yip HK, Zhao RC, So KF, Harvey AR (2003) Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Mol Cell Neurosci* 22:49-61.



- David S, Lacroix S (2003) Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu Rev Neurosci* 26:411-440.
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L (2002) Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* 22:6570-6577.
- Dubreuil CI, Winton MJ, McKerracher L (2003) Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J Cell Biol* 162:233-243.
- Ellezam B, Bertrand J, Dergham P, McKerracher L (2003) Vaccination stimulates retinal ganglion cell regeneration in the adult optic nerve. *Neurobiol Dis* 12:1-10.
- Fischer D, He Z, Benowitz LI (2004a) Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci* 24:1646-1651.
- Fischer D, Petkova V, Thanos S, Benowitz LI (2004b) Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *J Neurosci* 24:8726-8740.
- Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, Barres BA (2002a) Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells. *Science* 296:1860-1864.
- Goldberg JL, Espinosa JS, Xu Y, Davidson N, Kovacs GT, Barres BA (2002b) Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron* 33:689-702.
- Hall S, Berry M (1989) Electron microscopic study of the interaction of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts. *J Neurocytol* 18:171-184.
- Han S, Arvai AS, Clancy SB, Tainer JA (2001) Crystal structure and novel recognition motif of rho ADP-ribosylating C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum*: structural insights for recognition specificity and catalysis. *J Mol Biol* 305:95-107.

- Hayashi H, Campenot RB, Vance DE, Vance JE (2004) Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *J Biol Chem* 279:14009-14015.
- Huang DW, McKerracher L, Braun PE, David S (1999) A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 24:639-647.
- Inoue T, Hosokawa M, Morigiwa K, Ohashi Y, Fukuda Y (2002) Bcl-2 overexpression does not enhance in vivo axonal regeneration of retinal ganglion cells after peripheral nerve transplantation in adult mice. *J Neurosci* 22:4468-4477.
- Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol* 126:801-810.
- Jin Z, Strittmatter SM (1997) Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci* 17:6256-6263.
- Kimpinski K, Campenot RB, Mearow K (1997) Effects of the neurotrophins nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on neurite growth from adult sensory neurons in compartmented cultures. *J Neurobiol* 33:395-410.
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci* 19:7537-7547.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 20:4615-4626.
- MacInnis BL, Senger DL, Campenot RB (2003) Spatial requirements for TrkA kinase activity in the support of neuronal survival and axon growth in rat sympathetic neurons. *Neuropharmacology* 45:995-1010.

- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1632-1636.
- McKerracher L, Winton MJ (2002) Nogo on the go. *Neuron* 36:345-348.
- McKerracher L, Essagian C, Aguayo AJ (1993) Temporal changes in beta-tubulin and neurofilament mRNA levels after transection of adult rat retinal ganglion cell axons in the optic nerve. *J Neurosci* 13:2617-2626.
- McKerracher L, Vidal-Sanz M, Essagian C, Aguayo AJ (1990) Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J Neurosci* 10:2834-2841.
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13:805-811.
- McQuarrie IG, Brady ST, Lasek RJ (1986) Diversity in the axonal transport of structural proteins: major differences between optic and spinal axons in the rat. *J Neurosci* 6:1593-1605.
- McQuarrie IG, Brady ST, Lasek RJ (1989) Retardation in the slow axonal transport of cytoskeletal elements during maturation and aging. *Neurobiol Aging* 10:359-365.
- Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, Henke-Fahle S, Mueller BK (2003) The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci* 22:319-330.
- Monsul NT, Geisendorfer AR, Han PJ, Banik R, Pease ME, Skolasky RL, Jr., Hoffman PN (2004) Intraocular injection of dibutyryl cyclic AMP promotes axon regeneration in rat optic nerve. *Exp Neurol* 186:124-133.
- Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (1996) Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived

- neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:489-500.
- Richardson PM, Issa VM, Shemie S (1982) Regeneration and retrograde degeneration of axons in the rat optic nerve. *J Neurocytol* 11:949-966.
- Sapieha PS, Peltier M, Rendahl KG, Manning WC, Di Polo A (2003) Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 24:656-672.
- Selles-Navarro I, Ellezam B, Fajardo R, Latour M, McKerracher L (2001) Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve. *Exp Neurol* 167:282-289.
- Shearer MC, Niclou SP, Brown D, Asher RA, Holtmaat AJ, Levine JM, Verhaagen J, Fawcett JW (2003) The astrocyte/meningeal cell interface is a barrier to neurite outgrowth which can be overcome by manipulation of inhibitory molecules or axonal signalling pathways. *Mol Cell Neurosci* 24:913-925.
- Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA (1999) Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* 23:285-295.
- So KF, Aguayo AJ (1985) Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res* 328:349-354.
- Tigyi G, Fischer DJ, Sebok A, Yang C, Dyer DL, Miledi R (1996) Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca<sup>2+</sup> signaling and Rho. *J Neurochem* 66:537-548.
- Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ (1988) Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 8:265-280.
- Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ (1993) Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 24:23-36.

- Weibel D, Cadelli D, Schwab ME (1994) Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain Res* 642:259-266.
- Winton MJ, Dubreuil CI, Lasko D, Leclerc N, McKerracher L (2002) Characterization of new cell permeable C3-like proteins that inactivate Rho and stimulate neurite outgrowth on inhibitory substrates. *J Biol Chem* 277:32820-32829.
- Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 23:2284-2293.
- You SW, So KF, Yip HK (2000) Axonal regeneration of retinal ganglion cells depending on the distance of axotomy in adult hamsters. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3165-3170.

### **Chapitre 3. Article 2 - Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists.**

Les expériences présentées dans ce deuxième article visaient d'abord à déterminer si une inactivation soutenue de Rho, par des injections répétées d'antagonistes de type C3, pouvait augmenter la survie et la régénération des cellules ganglionnaires de la rétine après une lésion du nerf optique, par comparaison avec les résultats obtenus avec une injection unique d'antagonistes de Rho, présentés dans le premier article.

Nous étions aussi intéressés à savoir si le moment où les injections d'antagonistes de Rho étaient faites influençait les résultats de survie et de régénération.

Bertrand, J<sup>a</sup>, Di Polo A.<sup>a\*</sup>, McKerracher, L.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Département de Pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal Québec, Canada, H3T 1J4

\* To whom correspondence should be addressed: Dr. Adriana Di Polo

Université de Montréal, Département de Pathologie et biologie cellulaire

2900 Edouard Montpetit, Pavillon Roger-Gaudry, S-520

Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4,

Tel : (514) 343-6109 Fax : (514) 343-5755

E-mail [REDACTED]

### 3.1. Abstract

Inactivation of Rho GTPase with a single intraocular injection of Rho antagonists stimulates survival and regeneration of retinal ganglion cells (RGCs) after optic nerve injury. However, this effect is short-lived. Here we tested the impact of multiple injections of C3-like Rho antagonists on RGC viability and axon regeneration after optic nerve lesion. Our data show that both neuronal survival and axon regeneration were enhanced with repeated delivery of cell-permeable C3. We found a ~1.5 fold increase in RGC survival when additional Rho antagonist injections were performed after the first week from the time of lesion. In contrast, increased regeneration required early inactivation of Rho and injections performed in the second week did not further enhance regenerative outcome. These results reveal differences in the length of the therapeutic windows through which Rho inactivation acts on RGC survival or regeneration after axotomy.

Keywords: Rho GTPase, retinal ganglion cell (RGC), optic nerve, neuroprotection, regeneration, C3

### 3.2. Introduction

Lesions to the central nervous system (CNS) lead to neuronal death and recovery is limited because surviving neurons fail to regenerate their axons. Strategies to promote both neuroprotection and axon regeneration are necessary to stimulate recovery after injury. The rat retinocollicular pathway is an excellent system to test neuroprotective and regenerative strategies following nerve lesion. In the adult rat, retinal ganglion cells (RGCs) die rapidly when their axons are severed close to the optic disc (Berkelaar et al., 1994). Without treatment, less than 15% of all RGCs survive at 2 weeks after injury (Berkelaar et al., 1994, Mansour-Robaey et al., 1994, Sapieha et al., 2003, Pernet and Di Polo, 2006), and very few regenerating axons are observed in the optic nerve, distal to the lesion (Lehmann et al., 1999, Selles-Navarro et al., 2001, Sapieha et al., 2003). Lack of regeneration is largely attributed to growth inhibitors present in myelin (Filbin, 2003, Grados-Munro and Fournier, 2003) and in the glial scar that forms at the lesion site (Morgenstern et al., 2002, Silver and Miller, 2004). Growth inhibitory proteins exert their intracellular effect through a variety of pathways that converge on the activation of Rho GTPase (Dergham et al., 2002, Niederost et al., 2002, Winton et al., 2002, Fournier et al., 2003, Monnier et al., 2003) leading to growth cone collapse (Jalink et al., 1994, Tigyi et al., 1996).

Rho GTPase can be inactivated with C3 ADP-ribosyltransferase from *C. botulinum*, and application of C3 at the lesion site stimulates RGC axon regeneration after optic nerve lesion (Lehmann et al., 1999). C3 has very poor membrane permeability, therefore we



recently generated cell permeable variants of C3 to facilitate its entry into mammalian cells (Winton et al., 2002). Furthermore, we recently demonstrated that a single intraocular injection of these C3 derivatives stimulated significant RGC axon regeneration after optic nerve axotomy (Bertrand et al., 2005). In addition, Rho inactivation markedly increased survival of axotomized RGCs (Bertrand et al., 2005). However, the effect of those C3-derived compounds on neuroprotection and regeneration was only transient, suggesting that a single dose of these C3 derivatives did not inactivate Rho long enough to sustain RGC survival and axon regeneration. Therefore, we hypothesized that sustaining Rho inactivation through increased delivery of Rho antagonists would improve RGC viability and axon growth after optic nerve injury.

To test this hypothesis, we delivered Rho antagonists by a multiple injection protocol, a strategy that also allowed us to determine how the timing of Rho inactivation affected survival and regeneration outcome. Our results demonstrate that repeated delivery of cell-permeable Rho antagonists markedly improves RGC survival and axon regeneration over single injection treatment. We also establish that repeated doses of C3 derivatives increase the number of regenerating axons only when performed early after injury, while additional injections in the second week do not promote additional axon growth. Further, our results reveal an important difference in the length of the therapeutic windows for the effect of Rho inactivation on neuronal survival or regeneration. Although both survival and regeneration are stimulated when Rho is inactivated in the first week, only survival is increased by late injections of Rho antagonists.

### **3.3. Materials and methods**

#### **3.3.1. Rho antagonists C3-07 and C3-11**

C3 is an ADP-ribosyltransferase from *Clostridium botulinum* with the ability to inactivate the GTPase Rho. To facilitate its entry into cells, modified versions of C3 were prepared (Winton et al., 2002). In the current study, we used C3-07 (Bertrand et al., 2005) and C3-11, which are cell-permeable variants of C3 with the same enzymatic activity. C3-11 was modified from C3-07 when non-essential amino acids containing a proteolytic site were removed to facilitate purification by fast protein liquid chromatography (FPLC) (BioAxone Therapeutics, personal communication). Similar biological activity of C3-07 and C3-11 was previously confirmed by neurite outgrowth assay and Rho pull-down assay, as described for C3-05 (Winton et al., 2002). C3-07 was provided in PBS, while C3-11 was in saline. Therefore, vehicle used in control experiments was either PBS or saline, depending on the C3 variant used.

#### **3.3.2. Intraorbital microlesion surgery and treatment with Rho antagonists**

All animal procedures followed guidelines from the Canadian Council of Animal Care. Intraorbital optic nerve microcrush lesions effectively axotomize all RGC axons and provide a well-defined lesion site (Selles-Navarro et al., 2001). Nerve microcrush lesions were performed on female Sprague-Dawley rats (180-200 g, Charles River, St-Constant,

Québec), under gas anesthesia (2.5-3% isoflurane in oxygen). The left optic nerve was exposed, the dural sheath was slit longitudinally, and the nerve was crushed 1 mm from the globe by holding a tight knot made with a 10-0 suture for 60 seconds, after which the suture was completely removed. Animals were treated with C3-07 (regeneration studies), C3-11 (survival studies) or vehicle (PBS or saline) by intravitreal injection in a total volume of 5  $\mu$ l, a volume commonly used (Mansour-Robaey et al., 1994, Clarke et al., 1998, Kermer et al., 2001). The injection schedules are outlined in Figures 1 and 3. When an injection was scheduled on day 0, it was performed immediately after the optic nerve lesion, in the posterior retina at approximately 2 mm from the optic nerve head. Any injection scheduled later than day 0 was performed through a single anterior injection site, accessed after the conjunctival tissue was first cut to reach the peripheral sclera. Therefore, a maximum of 2 punctures of the sclera and retina were needed, even when 3 or more injections were performed. Intraocular injections were made with a fine glass tube attached to a 10  $\mu$ l Hamilton syringe. The needle was removed slowly over ~5 seconds, and the injection site was sealed with surgical glue (Indermill, Tyco Health Care Canada, Montréal, Québec). Care was taken not to damage the lens during the injection, as lens injury has been reported to stimulate survival and regeneration of RGCs (Fischer et al., 2000, Leon et al., 2000). The vascular integrity of the retina was verified by fundus examination. Animals that showed signs of lens injury or compromised blood supply were excluded from the study.

### **3.3.3. Retrograde labeling and analysis of RGC survival.**

Surviving RGCs in the retina were identified by retrograde labeling with 2% Fluorogold (Fluorochrome, Denver, CO) applied to the right superior colliculus as described (Bertrand et al., 2005). Microcrush lesion surgery was performed 5 to 7 days later on the left optic nerve. Fourteen days after injury, animals were intracardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.2), and retinal whole-mounts were prepared. Photographs of 12 standard retinal areas located 1, 2 and 3 mm from the optic disc in each of the ocular quadrants (Villegas-Perez et al., 1993) were taken with a CCD camera (Retiga, Qimaging, ON, Canada) and Fluorogold-positive RGCs were counted in all 12 areas using Northern Eclipse image analysis software (Empix Imaging, Mississauga, ON, Canada). Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), and Tukey-Kramer tests were used as post-tests.

### **3.3.4. Anterograde labeling, immunohistochemistry and analysis of axon regeneration**

In all cases, axon regeneration was analyzed at 14 days after optic nerve lesion and regenerating axons were identified by anterograde labeling with cholera toxin  $\beta$  subunit (CT $\beta$ ) (Sigma, Oakville, Ontario). Animals received an intravitreal injection of 5  $\mu$ l of 1% CT $\beta$  24 hrs prior to intracardial perfusion with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.2). The left optic nerve was removed, cryoprotected overnight

in 30% sucrose in PBS, embedded in Tissue-Tek (VWR, Montréal, Québec) and frozen in 2-methylbutane in a liquid nitrogen bath. Longitudinal cryostat sections of optic nerves (14  $\mu\text{m}$ ) were mounted on Superfrost Plus slides (Fisher, Montréal, Québec). To detect CT $\beta$  in RGC axons, slides were post-fixed in 4% PFA in 0.1 M PB and blocked for 1 hr with 5% normal rabbit serum, 3% bovine serum albumine (BSA) and 0.2% Triton X-100. Slides were then incubated overnight with goat CT $\beta$  antibody (1:4000) from List Biological Laboratories (Cedarlanes Laboratories, Hornby, Ontario), followed by incubation with anti-goat biotinylated antibody (1:200) (Vector Laboratories, Burlington, Ontario), and subsequently with streptavidin-conjugated dichlorotriazinyl amino fluorescein (DTAF) (1:400) from Jackson Immuno Research (Cedarlanes Laboratories, Hornby, Ontario).

Four to ten sections per animal were examined by epifluorescence microscopy, to detect CT $\beta$ -labeled axons, and photographed using a CCD camera (Retiga, Qimaging, ON, Canada). Images were then processed with Northern Eclipse image analysis software (Empix Imaging, Mississauga, ON, Canada). The lesion site was accurately identified by visualization of optic nerves in dark field microscopy as described (Sapieha et al., 2003). Regeneration was quantified by counting the number of CT $\beta$ -positive axons crossing a line parallel to the lesion site at distances of 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 750  $\mu\text{m}$  and 1000  $\mu\text{m}$ . Statistical analysis was performed using the In Stat software (Graph Pad, San Diego, California) by one-way analysis of variance (ANOVA), and Tukey-Kramer tests were used as post-tests.

## **3.4. Results**

### **3.4.1. Repeated delivery of a Rho antagonist increases RGC survival**

We previously demonstrated that Rho inactivation using C3-based Rho antagonists increased RGC survival at 7 and 14 days following optic nerve injury (Bertrand et al., 2005). However, this neuroprotective effect was transient as treatment with a single injection of antagonist delayed but did not prevent RGC death. We speculated that sustained Rho inactivation via multiple intraocular injections of C3-11 may boost RGC survival compared to a single application. We tested this hypothesis by quantifying densities of RGCs at 2 weeks after axotomy in eyes that received 1, 2 or 3 injections of 1  $\mu\text{g}$  of C3-11 (Fig. 1A). The following C3-11 treatment regimens were performed: i) single injection at the time of optic nerve lesion (day 0) ( $n = 5$ ), ii) 2 injections (day 0 and day 5 after nerve injury) ( $n = 6$ ), and iii) 3 injections (days 0, 5 and 10) ( $n = 4$ ). We limited the number of punctures through the sclera to a maximum of 2 by using the same injection site for all injections performed after day 0. This is an important issue because retinal injury such as a cut or puncture through the retina can increase the level of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in rodents (Wen et al., 1995, Cao et al., 1997, Cao et al., 2001), and both CNTF and bFGF have been shown to promote RGC survival (Weise et al., 2000, Zhang et al., 2005, Leaver et al., 2006) or regeneration (Sapieha et al., 2003, Leaver et al., 2006) following optic nerve lesion.

Our results indicate a significant effect of the number of injections on RGC survival (Fig. 1B, ANOVA,  $F(2,12) = 5.013$ ,  $P = 0.0262$ ). A regimen of 2 injections did not increase survival compared to a single C3-11 application (Fig. 1B, Table 1). However, RGC survival markedly increased with 3 injections of Rho antagonist. The 3-injection regimen led to a 20% survival rate, representing a ~1.5-fold increase with respect to eyes treated with single or double injections ( $p < 0.05$ , ANOVA, Tukey-Kramer post test) and a ~3.5-fold increase with respect to vehicle-treated control eyes. Images of flat-mounted retinas showing Fluorogold-labeled RGCs after treatment with 1 or 3 injections of C3-11 are presented in Figure 2, compared to intact or saline-injected retinas. Figure 1C compares treatment with a single C3-11 injection to all controls (ANOVA,  $F(4,15) = 14.340$ ,  $P < 0.0001$ ) and shows that each control group had a significantly lower survival rate compared to animals treated with a single C3-11 injection ( $p < 0.001$ , ANOVA, Tukey-Kramer post test) (Fig. 1C, Table 1). Multiple injections of saline (vehicle) did not increase survival compared to nerve microlesion-only or single injection of saline, showing that the additional injections by themselves had no effect on survival (Fig. 1C, Table 1).

Next, we sought to determine whether a lower dose of Rho antagonist ( $0.1 \mu\text{g}$  instead of  $1 \mu\text{g}$ ) and a more frequent delivery regimen (up to 5 injections instead of 3) over the same 2-week administration period would further improve neuronal survival (Fig. 1D). For this purpose, C3-11-treated animals received either: i) a single injection at the time of optic nerve injury (day 0) ( $n = 4$ ), ii) 3 injections (days 0, 5 and 10 after nerve lesion) ( $n =$

5), or iii) 5 injections (days 0, 3, 6, 9 and 12) ( $n = 7$ ). Again, we limited the number of injection sites to 2, even when 5 injections were performed. Treatment with this lower dose of C3-11 significantly increased survival after lesion (Fig 1F, ANOVA,  $F(3,12) = 10.122$ ,  $P = 0.0013$ ). A single injection of  $0.1 \mu\text{g}$  of C3-11 provided significant RGC survival compared to microlesion-only and all saline-treated control groups ( $p < 0.01$ , ANOVA, Tukey-Kramer post test), and resulted in a similar survival rate ( $\sim 13\%$ ) as that observed with a single injection of  $1 \mu\text{g}$  of C3-11 (Figs. 1B, E, F, Table 1). Our results show a significant effect of the number of injections of  $0.1 \mu\text{g}$  on survival results (Fig. 1E, ANOVA,  $F(2,13) = 3.955$ ,  $P = 0.0455$ ). Treatment with 3 injections of C3-11 ( $0.1 \mu\text{g}$ ) did not significantly increase RGC survival compared to a single application, but a regimen of 5 injections resulted in a  $\sim 1.5$ -fold increase over a single injection ( $p < 0.05$ , ANOVA, Tukey-Kramer post test) (Fig. 1E, Table 1) and a  $\sim 3.5$ -fold increase over vehicle-injected controls. However, the almost continuous supply of Rho antagonist provided by 5 injections of C3-11 ( $0.1 \mu\text{g}$ ) did not further increase the maximum survival rate obtained with 3 injections of the higher dose ( $1 \mu\text{g}$ ) (Figs. 1B and 1E). Together, these data demonstrate that repeated delivery of Rho antagonists markedly increase RGC survival over a single administration.



### **3.4.2. Repeated delivery of a Rho antagonist increases RGC regeneration**

In a previous study, we showed that a single intravitreal injection of 1  $\mu\text{g}$  of C3-07 stimulated RGC axon regeneration at 2 weeks after optic nerve microcrush lesion (Bertrand et al., 2005). To determine if repeated injections of the Rho inhibitor further enhanced axon regeneration, we established an experimental protocol in which multiple injections of C3-07 (1  $\mu\text{g}$ ) were performed over a 2-week period (Fig. 3A). Microlesion of the optic nerve was always performed on day 0 and the treatment groups were as follows: i) 3 injections (days 0, 5 and 10 after nerve injury) ( $n = 4$ ), ii) 2 late injections (days 4 and 10) ( $n = 5$ ), and iii) 2 early injections (days 0 and 5) ( $n = 5$ ). The 2-injection protocol was designed based on an early and late administration schedules because we previously found that the extent of regeneration was similar when a single injection was performed either on day 0 or on day 4 (Bertrand et al., 2005). A maximum of 2 injection sites were used, even when animals received 3 injections. Figure 3B shows that regeneration is differently affected by the various injections regimen (ANOVA,  $F(4,15)$  varies from 36.962 to 5.513, and  $P$  varies from  $<0.0001$  to 0.0062, depending on the distance from the lesion site). Our data demonstrate that axon regeneration was highest in the group treated with 2 injections administered according to the early schedule (days 0 and 5), and represented an increase between 2.4-fold to 4-fold over a single injection, depending on the distance from the lesion site (Table 2). Approximately 4.5% of RGCs that survived on this early injection schedule regenerated an axon across the lesion site, and  $\sim$ half of those reached 500  $\mu\text{m}$  into the distal

optic nerve. Surprisingly, optic nerves from animals treated with 2 injections of C3-07 on the late schedule (days 4 and 10) did not show increased axon regeneration compared to those treated with a single dose (Table 2). Figure 4 shows optic nerve sections representative of axon regeneration observed with 2 injections, provided on an early or late schedule, compared to multiple injections of vehicle. The group treated with 3 injections of C3-07 had an increase in axon growth over the single-injection group that ranged from 1.8- to 3.4-fold depending on the distance from the lesion site (Table 2). At all distances from the lesion site, regeneration was higher in C3-07-treated groups than in PBS-injected controls (Fig. 3B). Multiple injections of vehicle did not stimulate regeneration compared to microlesion-only or single injection of vehicle (Table 2). Together, our data indicate that the number of regenerating axons is enhanced if Rho antagonist delivery is increased early after injury.

### **3.5. Discussion**

In this study, we inactivated intracellular signaling by Rho GTPase with multiple injections of cell-permeable C3 derivatives after complete lesion of the optic nerve and evaluated RGC survival and regeneration. Our data demonstrate that repeated intraocular delivery of Rho antagonists enhances both neuronal survival and axon growth compared to a single injection, suggesting that a 1-injection treatment is not sufficient to maintain Rho inactivation over a 2-week period. Importantly, the choice of multiple injections as a method for increased delivery of C3 derivatives allowed us to determine that survival and

regeneration of RGCs were differently affected by the timing of Rho inactivation. We observed that while both RGC survival and regeneration improved with more injections, the schedule that best increased RGC survival was not the same as the one providing optimal regeneration. Injections performed early after nerve lesion markedly enhanced axon regeneration, while an additional late application was required to increase RGC survival. Specifically, regeneration was significantly increased when Rho antagonist injections were performed on days 0 and 5, but survival remained unchanged. In contrast, there was no increase in regeneration when injections were performed on days 4 and 10, and no additional gain was observed when a third injection (day 10) was added to the early application schedule (days 0 and 5). RGC survival, on the other hand, was clearly increased when a third injection was added, on day 10, to those performed on days 0 and 5.

The difference in our optimal schedules leading to RGC axon growth or survival suggests that Rho GTPase acts on these processes through different pathways or mechanisms, or that the turnover of active Rho differs in cell bodies and axons. For example, while Rho could block RGC axonal regeneration through its activation at the growth cone by inhibitory proteins present in myelin or at the lesion scar, it more likely affects RGC death and survival through its action at the cell body. A recent study showed that Rho activation is increased in RGC cell bodies after optic nerve crush (Ahmed et al., 2006), but the precise stimuli that activate Rho in the retina after nerve injury is presently unknown. There is no myelin in the retina, and because RGC bodies are located several mm away from the lesion site, they are protected from direct contact with myelin- and scar-

derived inhibitory molecules present in the optic nerve. A possible Rho activator in our lesion model is tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF). TNF is a pro-inflammatory cytokine known to activate Rho in neuronal cells (Neumann et al., 2002). As well, Rho activation by TNF through TNF Receptor-1 (TNFR-1) has been reported in non-neuronal cells (Hunter et al., 2003). Tezel et al. recently showed that levels of TNF increased in the optic nerve and retina following partial crush of the optic nerve in mice (Tezel et al., 2004). They also showed that TNF increased significantly at 2 weeks after injury, and that TNFR-1 participated in RGC death after optic nerve crush (Tezel et al., 2004). Thus, it is likely that TNF increase in the retina during the second week of injury leads to additional Rho activation, which may underlie our observation that late Rho inactivation enhances RGC survival.

In contrast to our findings on neuroprotection, axon regeneration was only increased when a second injection was performed within the first week, and was not further enhanced by a late injection (day 10). The first week coincides with the time when growth cones reform and abortive sprouting is observed along with vigorous growth attempts (Zeng et al., 1994, So and Yip, 1998, Selles-Navarro et al., 2001). It is possible that Rho inactivation must act in synergy with this initial growth burst to promote regeneration. Typically, RGCs grow a single axon, but we cannot rule out a possible effect of Rho inactivation on branching. The rate of slow axonal transport drops dramatically at ~1 week after optic nerve intracranial crush injury (McKerracher et al., 1990). The inability to increase RGC axon regeneration with Rho antagonist injection in the second week might reflect the

failure of C3-07 to prevent or reverse the decrease in slow axonal transport (Bertrand et al., 2005). Slow axonal transport is critical to regeneration because it supplies cytoskeleton proteins required for axon elongation.

RGC survival and regeneration were evaluated following injections of 1  $\mu$ g of cell-permeable Rho antagonist on days 0 and 5. The average number of regenerating axons more than doubled compared to a single injection on day 0, while the number of surviving RGCs remained unchanged. This clearly shows that enhanced regeneration is not just a consequence of more survival and supports the idea that the mechanisms by which Rho acts on RGC survival or regeneration may differ. The relative independence between regeneration and survival in RGCs following optic nerve injury was also observed in experiments using combination therapies. For example, the combination of lens injury and virally-mediated expression of dominant negative Nogo receptor, the common receptor for myelin-associated growth inhibitory proteins, greatly enhanced regeneration without any increase in RGC survival (Fischer et al., 2004a). Conversely, a recent study demonstrated that lens injury and brain-derived neurotrophic factor interacted synergistically to promote robust RGC survival, but inhibited axon growth and led to optic nerve dystrophy (Pernet and Di Polo, 2006).

At 2 weeks post-lesion, RGC survival peaked at 20% with repeated Rho antagonists delivery. Although significantly increased compared to single-injection treatment, this modest survival clearly indicates that the Rho-signaling pathway is not the only or the main

apoptotic route for axotomized RGCs. The effect of sustained Rho inactivation on RGC axon regeneration was also significant. With our most efficient schedule for regeneration, i.e. injections on days 0 and 5, ~ 4.5 % of surviving RGCs were able to extend an axon across the lesion site and half of those reached 500  $\mu\text{m}$  into the distal optic nerve. The relatively short distance covered by regenerating axons is consistent with previous studies demonstrating that RGCs lose their intrinsic growth ability during post-natal development (Goldberg et al., 2002). Thus our results, and those of others, suggest that Rho inactivation is not enough to prime adult RGCs into an active growth mode (Fischer et al., 2004b, Bertrand et al., 2005).

At present, there are few treatments that have been shown to stimulate both survival and regeneration of RGCs into the distal optic nerve after axotomy (Leon et al., 2000, Fischer et al., 2004b, Leaver et al., 2006). The results from our study suggests that sustained Rho inactivation benefits RGCs following optic nerve injury as it increases both survival and regeneration compared to a single injection performed at the time of lesion. Furthermore, we demonstrate that RGC axon regeneration requires early injections of Rho antagonists, while survival benefits from an additional late administration of Rho antagonists. This finding indicates that the therapeutic window during which inactivating Rho can promote RGC survival after optic nerve injury is longer than the window available to stimulate regeneration with Rho antagonists. The challenge now is to stimulate the rapid growth of more axons in the distal optic nerve and to permanently rescue as many RGCs as

possible. These goals might be attained by combining Rho inactivation with treatments that boost the intrinsic growth program in RGCs and/or their survival.

### **3.6. Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) for financial support. JB is supported by a CIHR scholarship. We also thank Annie Salesse, Kathleen Deschamps and Eve Boileau for their technical assistance.

### 3.7. Tables

**Table 1. RGC survival: quantitative analysis.**

Treatment	Number of injections	Days of injections	Number of animals	RGC Survival (RGCs/mm <sup>2</sup> ± SEM)	RGC Survival (% of intact ± SEM)
Intact	n/a	n/a	4	2209±42	100
Microlesion (ML) only	n/a	n/a	3	111±29	5.0±1.3
ML + C3-11 (0.1 µg)	1	0	4	288±27	13.1±1.2
ML + C3-11 (0.1 µg)	3	0, 5, 10	5	350±42	15.8±1.9
ML + C3-11 (0.1 µg)	5	0, 3, 6, 9, 12	7	445±40	20.2±1.8
ML + C3-11 (1 µg)	1	0	5	291±19	13.2±0.9
ML + C3-11 (1 µg)	2	0, 5	6	282±40	12.8±1.8
ML + C3-11 (1 µg)	3	0, 5, 10	4	445±53	20.1±2.4
ML + saline	1	0	4	132±19	6.0±0.9
ML + saline	2	0, 5	3	81±14	3.7±0.6
ML + saline	5	0, 3, 6, 9, 12	5	129±26	5.8±1.2

**Table 2. Axon regeneration: quantitative analysis.**

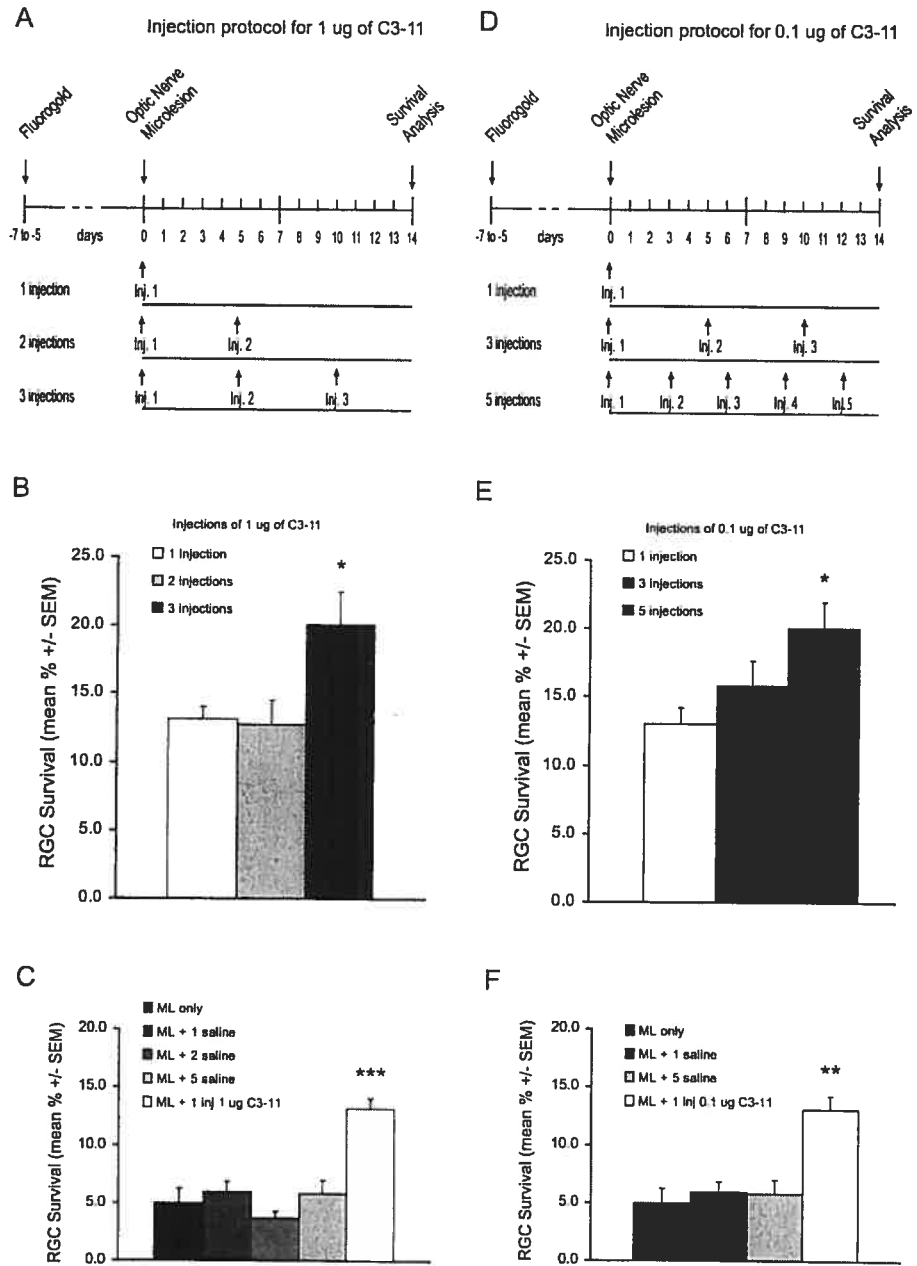
Treatment	Number of injections	Days of injections	Number of animals	Number of axons/section ± SEM at different distances from the lesion site				
				100 µm	250 µm	500 µm	750 µm	1000 µm
Microlesion (ML) only*	n/a	n/a	5	0.9±0.4	0.1±0.1	0.0	0.0	0.0
ML + C3-07 (1 µg)*	1	0	5	9.8±1.7	5.1±1.3	2.9±0.7	1.6±0.8	1.0±0.6
ML + C3-07 (1 µg)	2 (early)	0, 5	5	23.8±2.1	16.4±2.7	11.6±3.2	6.1±1.3	3.4±0.7
ML + C3-07 (1 µg)	2 (late)	4, 10	5	11.1±1.8	6.7±1.4	4.5±0.9	2.3±0.5	1.4±0.4
ML + C3-07 (1 µg)	3	0, 5, 10	4	17.3±1.5	14.5±1.1	9.8±1.4	5.2±1.1	2.7±0.8
ML + PBS*	1	0	5	2.0±0.8	0.9±0.4	0.3±0.2	0.0	0.0
ML + PBS	2	4, 10	3	2.0±1.0	0.9±0.6	0.6±0.6	0.2±0.2	0.4±0.4
ML + PBS	3	0, 5, 10	3	0.9±0.6	0.3±0.2	0.0	0.0	0.0

\*Reported by Bertrand et al., 2005.



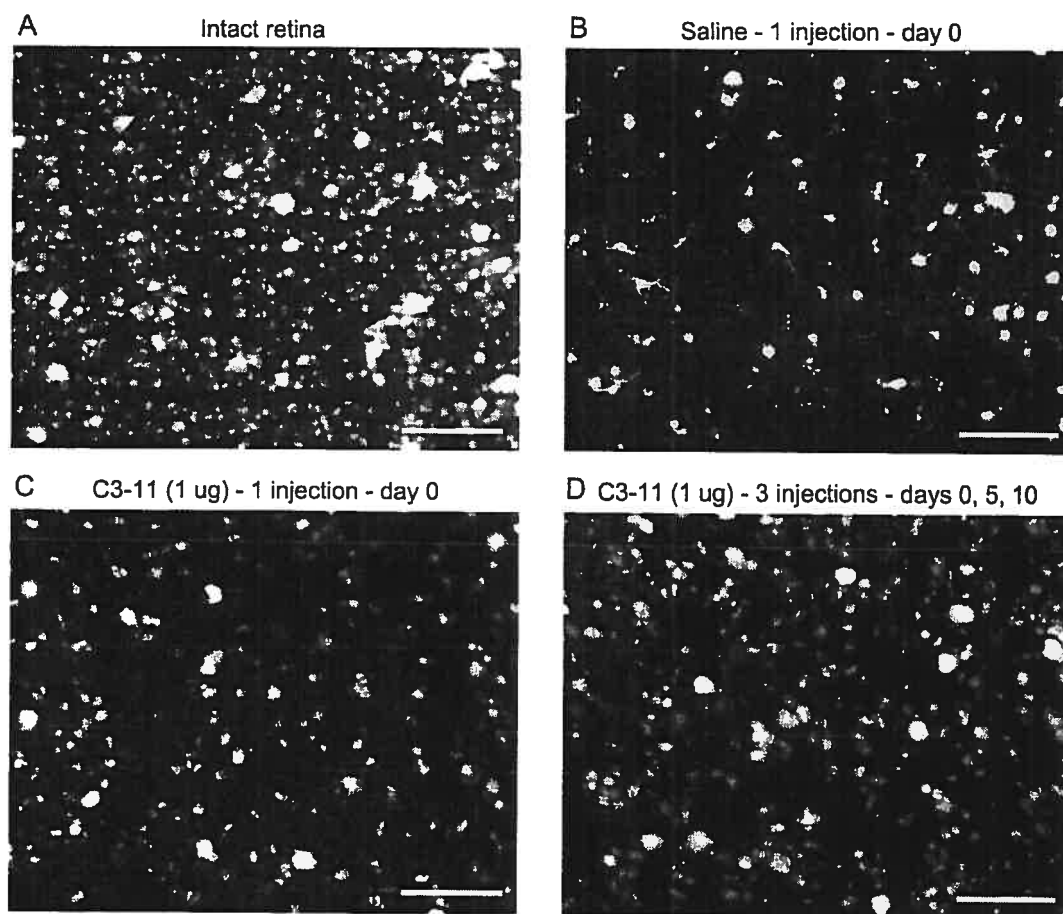
### 3.8. Figures

**Figure 1. Repeated delivery of Rho antagonists increases RGC survival.**



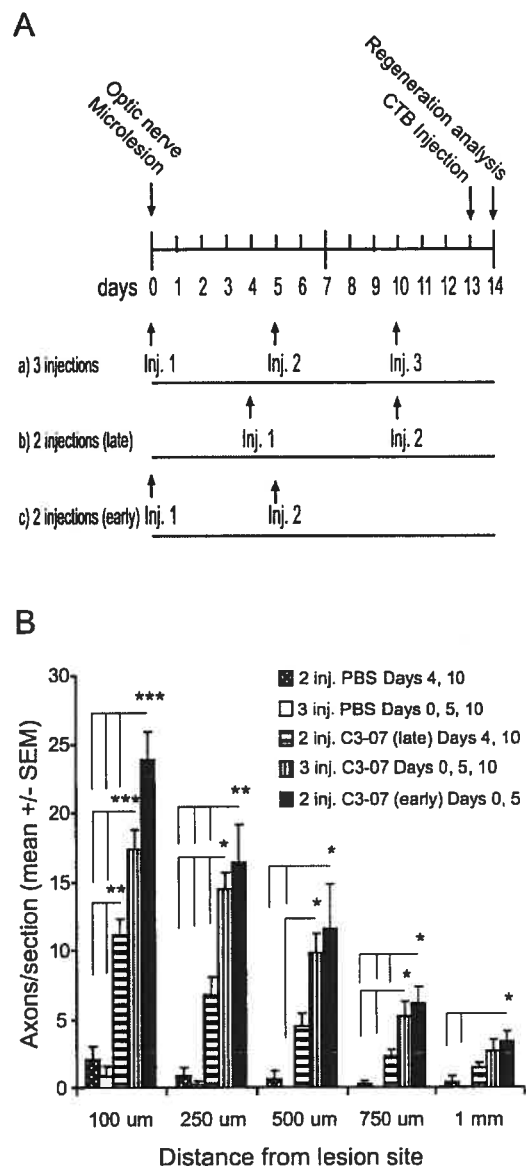
**Figure 1. Repeated delivery of Rho antagonists increases RGC survival.** (A) Experimental protocol for animals treated with doses of 1  $\mu\text{g}$  of C3-11 or with saline. (B) Quantification of RGC survival (% of normal retina), for groups treated with 1 (white bar), 2 (gray bar) or 3 (black bar) injections of 1  $\mu\text{g}$  of C3-11 (ANOVA,  $F(2,12) = 5.013$ ,  $P = 0.0262$ ). (C) Quantification of RGC survival (% of normal retina), for control groups compared to a single injection of 1  $\mu\text{g}$  of C3-11 (white bar) (ANOVA,  $F(4,15) = 14.340$ ,  $P < 0.0001$ ). (D) Experimental protocol for animals treated with doses of 0.1  $\mu\text{g}$  of C3-11 or with saline. (E) Quantification of RGC survival (% of normal retina), for groups treated with 1 (white bar), 3 (gray bar) or 5 (black bar) injections of 0.1  $\mu\text{g}$  of C3-11 (ANOVA,  $F(2,13) = 3.955$ ,  $P = 0.0455$ ). (F) Quantification of RGC survival (% of normal retina), for control groups compared to a single injection of 0.1  $\mu\text{g}$  of C3-11 (white bar) (ANOVA,  $F(3,12) = 10.122$ ,  $P = 0.0013$ ). (B-C and E-F: (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$  ANOVA, Tukey-Kramer post test). See table 1 for detailed results and number of animals ( $n = 3-7$  per group).

**Figure 2. Repeated injections of 1  $\mu$ g of C3-11 increase RGC survival.**



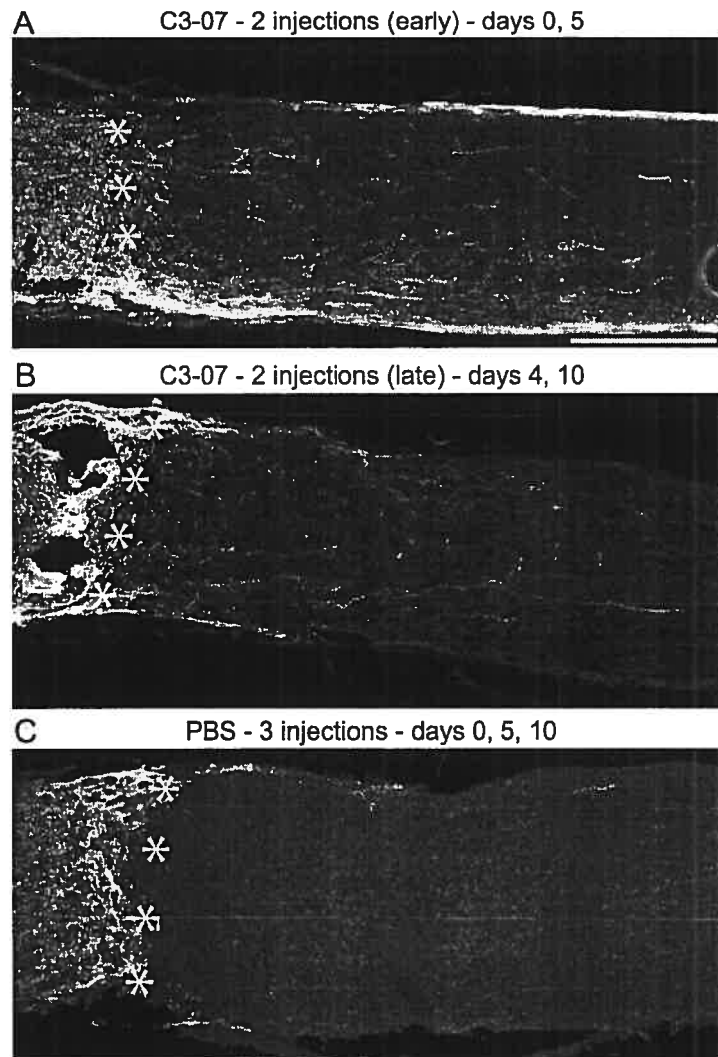
**Figure 2. Repeated injections of 1  $\mu$ g of C3-11 increase RGC survival.** Representative photographs of flat-mounted retinas show Fluorogold-labeled surviving RGCs in an intact retina (A), and in retinas treated with a single injection of saline (B) or of 1  $\mu$ g of C3-11 (C) or with 3 injections of 1  $\mu$ g of C3-11 (D). Scale bar: 100  $\mu$ m

**Figure 3. Repeated delivery of Rho antagonists increases RGC axon regeneration.**



**Figure 3. Repeated delivery of Rho antagonists increases RGC axon regeneration.** (A) Schematic of protocol for regeneration studies with multiple injections of 1  $\mu$ g C3-07 or of PBS. (B) Quantification of axonal regeneration at different distances from the lesion site for groups treated with multiple injections of PBS or of 1  $\mu$ g of C3-07 (ANOVA,  $F(4,15)$  varies from 36.962 to 5.513, and  $P$  varies from <0.0001 to 0.0062, depending on the distance from the lesion site). (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$  ANOVA, Tukey-Kramer post test). See table 2 for detailed results and number of animals ( $n = 3-5$  per group).

**Figure 4. Multiple injections of Rho antagonist C3-07 increase RGC regeneration when performed early after optic nerve lesion.**



**Figure 4. Multiple injections of Rho antagonist C3-07 increase RGC regeneration when performed early after optic nerve lesion.** Representative photographs of optic nerve sections immunostained with a CT $\beta$  antibody to reveal axons regenerating distally to the lesion site. The lesion site is identified with asterisks. (A-B) Animals injected with 1  $\mu$ g of C3-07 (A) on days 0 and 5 or (B) on days 4 and 10. (C) Control animal injected with PBS on days 0, 5 and 10. Scale bar: 250  $\mu$ m.

### 3.9. References

- Ahmed, Z., Suggate, E. L., Brown, E. R., Dent, R. G., Armstrong, S. J., Barrett, L. B., Berry, M. and Logan, A., 2006. Schwann cell-derived factor-induced modulation of the NgR/p75NTR/EGFR axis disinhibits axon growth through CNS myelin in vivo and in vitro. *Brain*. 129, 1517-1533.
- Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M. and Aguayo, A. J., 1994. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci*. 14, 4368-4374.
- Bertrand, J., Winton, M. J., Rodriguez-Hernandez, N., Campenot, R. B. and McKerracher, L., 2005. Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats. *J Neurosci*. 25, 1113-1121.
- Cao, W., Li, F., Steinberg, R. H. and Lavail, M. M., 2001. Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF, bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina. *Exp Eye Res*. 72, 591-604.
- Cao, W., Wen, R., Li, F., Lavail, M. M. and Steinberg, R. H., 1997. Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina. *Exp Eye Res*. 65, 241-248.
- Clarke, D. B., Bray, G. M. and Aguayo, A. J., 1998. Prolonged administration of NT-4/5 fails to rescue most axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *Vision Res*. 38, 1517-1524.

- Dergham, P., Ellezam, B., Essagian, C., Avedissian, H., Lubell, W. D. and McKerracher, L., 2002. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci.* 22, 6570-6577.
- Filbin, M. T., 2003. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci.* 4, 703-713.
- Fischer, D., He, Z. and Benowitz, L. I., 2004a. Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci.* 24, 1646-1651.
- Fischer, D., Pavlidis, M. and Thanos, S., 2000. Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 3943-3954.
- Fischer, D., Petkova, V., Thanos, S. and Benowitz, L. I., 2004b. Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *J Neurosci.* 24, 8726-8740.
- Fournier, A. E., Takizawa, B. T. and Strittmatter, S. M., 2003. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci.* 23, 1416-1423.
- Goldberg, J. L., Klassen, M. P., Hua, Y. and Barres, B. A., 2002. Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells. *Science.* 296, 1860-1864.
- Grados-Munro, E. M. and Fournier, A. E., 2003. Myelin-associated inhibitors of axon regeneration. *J Neurosci Res.* 74, 479-485.
- Hunter, I., Cobban, H. J., Vandenabeele, P., MacEwan, D. J. and Nixon, G. F., 2003. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced activation of RhoA in airway smooth muscle cells: role in the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization of myosin light chain20 phosphorylation. *Mol Pharmacol.* 63, 714-721.
- Jalink, K., van Corven, E. J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S. and Moolenaar, W. H., 1994. Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol.* 126, 801-810.

- Kermer, P., Klocker, N., Weishaupt, J. H. and Bahr, M., 2001. Transection of the optic nerve in rats: studying neuronal death and survival in vivo. *Brain Res Brain Res Protoc.* 7, 255-260.
- Leaver, S. G., Cui, Q., Plant, G. W., Arulpragasam, A., Hisheh, S., Verhaagen, J. and Harvey, A. R., 2006. AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells. *Gene Ther.*
- Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G. and McKerracher, L., 1999. Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci.* 19, 7537-7547.
- Leon, S., Yin, Y., Nguyen, J., Irwin, N. and Benowitz, L. I., 2000. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci.* 20, 4615-4626.
- Mansour-Robaey, S., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M. and Aguayo, A. J., 1994. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 1632-1636.
- McKerracher, L., Vidal-Sanz, M., Essagian, C. and Aguayo, A. J., 1990. Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J Neurosci.* 10, 2834-2841.
- Monnier, P. P., Sierra, A., Schwab, J. M., Henke-Fahle, S. and Mueller, B. K., 2003. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci.* 22, 319-330.
- Morgenstern, D. A., Asher, R. A. and Fawcett, J. W., 2002. Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res.* 137, 313-332.
- Neumann, H., Schweigreiter, R., Yamashita, T., Rosenkranz, K., Wekerle, H. and Barde, Y. A., 2002. Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *J Neurosci.* 22, 854-862.



- Niederost, B., Oertle, T., Fritsche, J., McKinney, R. A. and Bandtlow, C. E., 2002. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci.* 22, 10368-10376.
- Pernet, V. and Di Polo, A., 2006. Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy in vivo. *Brain.* 129, 1014-1026.
- Sapieha, P. S., Peltier, M., Rendahl, K. G., Manning, W. C. and Di Polo, A., 2003. Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. *Mol Cell Neurosci.* 24, 656-672.
- Selles-Navarro, I., Ellezam, B., Fajardo, R., Latour, M. and McKerracher, L., 2001. Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve. *Exp Neurol.* 167, 282-289.
- Silver, J. and Miller, J. H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 5, 146-156.
- So, K. F. and Yip, H. K., 1998. Regenerative capacity of retinal ganglion cells in mammals. *Vision Res.* 38, 1525-1535.
- Tezel, G., Yang, X., Yang, J. and Wax, M. B., 2004. Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice. *Brain Res.* 996, 202-212.
- Tigyi, G., Fischer, D. J., Sebok, A., Yang, C., Dyer, D. L. and Miledi, R., 1996. Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca<sup>2+</sup> signaling and Rho. *J Neurochem.* 66, 537-548.
- Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G. M. and Aguayo, A. J., 1993. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol.* 24, 23-36.
- Weise, J., Isenmann, S., Klocker, N., Kugler, S., Hirsch, S., Gravel, C. and Bahr, M., 2000. Adenovirus-mediated expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) rescues

axotomized rat retinal ganglion cells but does not support axonal regeneration in vivo. *Neurobiol Dis.* 7, 212-223.

- Wen, R., Song, Y., Cheng, T., Matthes, M. T., Yasumura, D., LaVail, M. M. and Steinberg, R. H., 1995. Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *J Neurosci.* 15, 7377-7385.
- Winton, M. J., Dubreuil, C. I., Lasko, D., Leclerc, N. and McKerracher, L., 2002. Characterization of new cell permeable C3-like proteins that inactivate Rho and stimulate neurite outgrowth on inhibitory substrates. *J Biol Chem.* 277, 32820-32829.
- Zeng, B. Y., Anderson, P. N., Campbell, G. and Lieberman, A. R., 1994. Regenerative and other responses to injury in the retinal stump of the optic nerve in adult albino rats: transection of the intraorbital optic nerve. *J Anat.* 185 ( Pt 3), 643-661.
- Zhang, C. W., Lu, Q., You, S. W., Zhi, Y., Yip, H. K., Wu, W., So, K. F. and Cui, Q., 2005. CNTF and BDNF have similar effects on retinal ganglion cell survival but differential effects on nitric oxide synthase expression soon after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46, 1497-1503.

## Chapitre 4. Discussion

Au cours de la recherche dont les résultats sont présentés dans cette thèse, nous avons étudié les effets d'inhibiteurs de la GTPase Rho sur la survie et la régénération des CGR après une lésion du nerf optique du rat adulte. Pour simplifier le texte, l'expression « C3 perméable » désignera tout aussi bien les inhibiteurs C3-05 que C3-07 ou C3-11, qui sont des versions modifiées de C3 que nous avons utilisées dans nos expériences. La modification, commune aux 3 versions, consistait en l'ajout d'une séquence de transport pour faciliter le passage de C3 à travers les membranes cellulaires.

L'inactivation de Rho par injection(s) intraoculaire(s) de C3 perméable a stimulé la survie et la régénération des CGR à la suite d'une lésion du nerf optique (Bertrand et al., 2005). D'une part, ce résultat montre, pour la première fois, que Rho est impliqué dans la mort des CGR après une lésion. D'autre part, en plus de confirmer l'implication de Rho dans l'inhibition de croissance des CGR, ce résultat nous montre que l'injection d'inhibiteurs de Rho au niveau des corps cellulaires peut stimuler la régénération aussi bien qu'une application au site de lésion (Lehmann et al., 1999). Nous avons montré que C3 perméable injecté dans l'œil est transporté jusqu'au nerf optique (Bertrand et al., 2005). Il peut donc inactiver Rho au site de lésion, au niveau du cône de croissance.

Le fait que la survie et la régénération à 2 semaines soient augmentées par des injections répétées nous indique aussi qu'une injection unique n'est pas suffisante pour bloquer complètement l'activation de Rho pendant la période étudiée, et suggère fortement que Rho reste activé pendant les 2 semaines qui suivent la lésion du nerf optique (Bertrand

et al., 2007). Cette hypothèse vient d'être confirmée dans un article de l'équipe de Martin Berry et Ann Logan qui montre, par des essais « pull down » de Rho actif, que l'activation de Rho dans la rétine persiste au moins jusqu'à 20 jours après un écrasement intraorbital du nerf optique (Ahmed et al., 2006). Ce résultat suggère que des molécules capables d'activer Rho sont présentes dans la rétine pendant plusieurs semaines après la lésion.

La démonstration que des inhibiteurs de Rho peuvent stimuler à la fois la survie des CGR et leur régénération dans le nerf optique est très intéressante parce qu'il y a jusqu'ici peu d'approches qui ont un effet positif sur ces 2 processus. Les autres techniques qui ont amélioré à la fois la survie et la régénération dans le nerf optique mature sont l'utilisation de CNTF, injecté dans le vitré (Cui et al., 2004) ou transfecté via AAV (Leaver et al., 2006), et la blessure du cristallin (Leon et al., 2000; Fischer et al., 2004b; Pernet and Di Polo, 2006). Un traitement avec l'oncomoduline, le facteur identifié comme étant le principal responsable de la régénération après la blessure du cristallin, stimule la régénération mais n'a pas d'effet sur la survie (Yin et al., 2006). On ne peut cependant pas, à ce moment, comparer adéquatement les résultats quantitatifs de survie et de régénération obtenus avec ces différents traitements, puisque les mesures ont été prises à des temps différents ou avec des approches de mesure différentes.

Nous avons testé plusieurs calendriers d'injections de C3 perméable, ce qui nous a permis de détecter que le calendrier le plus efficace pour favoriser la régénération est différent de celui qui stimule le plus la survie (Bertrand et al., 2007). La régénération est

stimulée par des injections répétées précoces (c.-à-d. première semaine), et les injections tardives (c.-à-d. deuxième semaine) n'ont aucun effet supplémentaire. En contraste, la meilleure survie nécessite des injections tardives, puisque des injections précoces répétées n'ont pas été suffisantes pour stimuler la survie au-delà du résultat obtenu avec une seule injection. Cette différence dans les calendriers d'injection optimums nous indique tout d'abord que la fenêtre thérapeutique permettant d'agir sur la survie est plus longue que celle qui est disponible pour stimuler la régénération, et nous suggère ensuite que les mécanismes par lesquels Rho agit sur la mort des CGR sont différents de ceux par lesquels il bloque la croissance, ou à tout le moins qu'ils sont actifs à des temps différents après la lésion. Plus important encore, ce résultat nous fournit des informations sur le moment où l'activation de Rho agit sur la survie et la régénération des CGR, qui pourront nous aider à comprendre comment Rho agit sur ces 2 processus.

#### **4.1. Rho et régénération des CGR**

Avec le calendrier d'injection de C3 perméable le plus favorable pour la régénération, ~4.5% des CGR survivantes (soit 620 des 14,080 CGR qui survivent) ont régénéré un axone et ~50% de ces axones ont atteint une distance de 500  $\mu\text{m}$  au-delà du site de lésion. Bien que ce soit significativement plus élevé que les témoins, où ~ 1% des CGR survivantes (soit 66 des 6,600 CGR qui survivent avec 1 injection de saline) régénèrent un axone, comment expliquer que la régénération avec C3 perméable ne soit pas plus élevée?

Puisque la signalisation de l'ensemble des molécules inhibitrices identifiées à ce jour dans le nerf optique passe par l'activation de Rho, et en présumant que Rho est largement, sinon complètement, inactivé par les injections répétées au long de notre période d'étude de 2 semaines, il nous semble peu probable que la régénération soit limitée par l'action des inhibiteurs connus présents dans la myéline ou la cicatrice gliale. De plus, nous avons démontré que C3 perméable est transporté de la rétine au nerf, ce qui devrait assurer l'inactivation de Rho là où c'est important pour la régénération c.-à-d. au cône de croissance.

La régénération pourrait être limitée par un ralentissement du transport axonal lent, une composante du transport nécessaire pour le transit des molécules du cytosquelette vers l'axone en croissance (Lasek et al., 1984). Nous avons montré qu'une axotomie intracrânienne entraîne un arrêt presque complet du transport axonal lent et qu'une injection unique de C3 perméable ne rétablissait pas ce transport (Bertrand et al., 2005). Il n'est pas démontré qu'une lésion intraorbitale ait le même effet sur le transport axonal lent, mais il est certain que s'il était ralenti cela pourrait limiter la régénération axonale.

Une hypothèse pouvant expliquer pourquoi on n'a pas plus de régénération malgré un blocage de la signalisation des inhibiteurs de croissance par l'inactivation de Rho avec C3 perméable, est que celui-ci pourrait être efficace seulement sur les CGR qui ont un programme de croissance actif, sans avoir lui-même la capacité d'activer ce programme. Ce programme de croissance comprendrait l'expression de gènes associés à la croissance, tel

GAP-43 (growth-associated protein-43 ou protéine associée à la croissance-43), dont l'expression est associée au développement des neurones du SNC de même qu'à la régénération des neurones du SNP (Skene, 1989; Benowitz and Routtenberg, 1997). L'expression de GAP-43 est augmentée de façon transitoire après une axotomie du nerf optique (Fournier and McKerracher, 1997; Leon et al., 2000) et est associée au bourgeonnement observé à l'extrémité lésée des CGR au cours de la première semaine suivant la lésion (Zeng et al., 1994). En absence de traitement, ce bourgeonnement se résorbe à peu près complètement dans la deuxième semaine, au même moment où l'expression de GAP-43 redescend (Zeng et al., 1994; Fournier and McKerracher, 1997; Leon et al., 2000). La capacité de croissance des CGR serait donc stimulée pendant la première semaine après l'axotomie pour chuter ensuite de façon importante dès la deuxième semaine. Le fait que seules les injections de C3 perméable faites au cours de la première semaine contribuent à la régénération supporte cette hypothèse que l'inhibition de Rho stimule uniquement la régénération des CGR dont le programme de croissance est activé, et suggère qu'il faut stimuler ce programme de croissance pour profiter davantage des effets de C3 perméable.

Jusqu'ici, c'est l'activation de macrophages, soit par une blessure du cristallin ou soit par une injection intraoculaire de Zymosan, qui s'est avérée l'approche la plus efficace pour mettre les CGR en mode de croissance (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003). Les résultats de l'équipe de Larry Benowitz, qui a combiné une blessure du cristallin avec l'utilisation de C3 transfecté dans les CGR par un AAV, appuient notre hypothèse qu'un

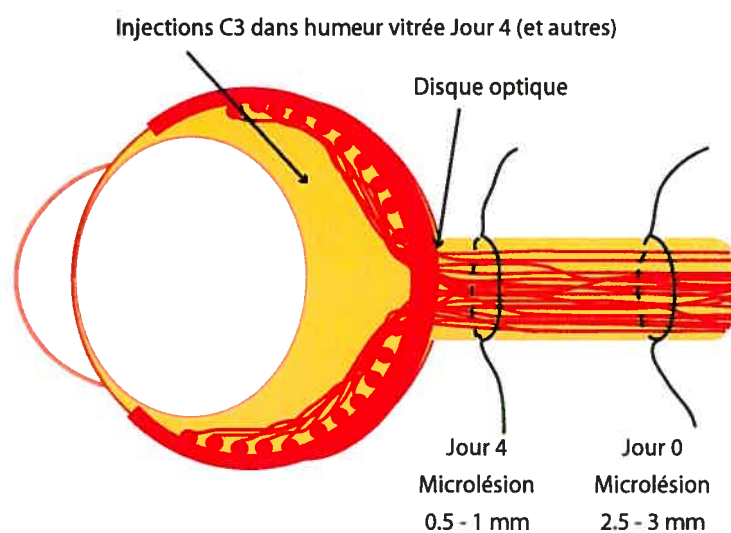
programme de croissance doit être activé pour que l'inactivation de Rho puisse stimuler la régénération (Fischer et al., 2004b). Ils ont d'abord montré que la combinaison d'une blessure du cristallin avec l'axotomie augmente l'expression de plusieurs gènes associés à la croissance axonale, dont GAP-43. Ensuite, ils ont démontré que le nombre d'axones régénérés est 6 fois plus élevé lorsque AAV-C3 est combiné à une blessure du cristallin que lorsque AAV-C3 est utilisé seul. Cette même combinaison d'AAV-C3 et de blessure du cristallin a aussi fortement augmenté le nombre d'axones régénérés obtenu après 2 semaines en comparaison avec une blessure du cristallin seule, soulignant l'importance d'inactiver Rho pour stimuler la régénération. Le blocage de l'action des molécules inhibitrices est donc important, mais il faut d'abord que les CGR soient capables de croître. L'ensemble de ces résultats suggère que C3 perméable ne stimulerait pas le déclenchement de la croissance, mais serait très efficace pour empêcher l'élongation d'être arrêtée par les molécules inhibitrices.

Une façon autre que la blessure du cristallin pour stimuler les CGR à se mettre en mode de croissance avant d'inactiver Rho avec C3 pourrait être de faire une lésion préalable (conditioning lesion) du nerf optique. Dans les neurones des ganglions des racines dorsales, il a été démontré qu'une lésion de la branche périphérique, préalable à la lésion de la branche centrale, pouvait stimuler la capacité de croissance des axones de la branche centrale et leur régénération (Neumann and Woolf, 1999). Un des effets de cette lésion préalable est de stimuler l'augmentation de l'expression de GAP-43 (Van der Zee et al., 1989; Filbin, 1999; Cafferty et al., 2004). Dans le nerf optique, un essai de lésion préalable



a déjà été fait, sans que la régénération ne soit améliorée (Kiernan, 1985b). Cependant, la première lésion a été faite au-delà du chiasma optique, donc à une distance d'au moins 11-12 mm, alors qu'il avait été démontré que la lésion devait être à 3 mm ou moins de l'œil pour stimuler l'augmentation de l'expression de GAP-43 (Doster et al., 1991). Dans notre modèle, la lésion préalable serait une microlésion faite ~2.5 à 3 mm derrière l'œil, suivie quelques jours plus tard d'une microlésion plus rapprochée, soit ~0,5 à 1 mm derrière l'œil, au même endroit où nous la faisons aujourd'hui (**Figure 1**). La première lésion stimulerait l'expression des gènes impliqués dans le bourgeonnement passager observé après une lésion, et ce programme de croissance déjà activé pourrait stimuler davantage la croissance des axones après la deuxième lésion, surtout en présence de C3 perméable.

**Figure 1. Modèle de lésion préalable dans le nerf optique.**



**Figure 1. Modèle de lésion préalable dans le nerf optique.**  
La microlésion faite au Jour 0 sera la lésion préalable (ou "conditioning lesion"). Les traitements commenceront après la deuxième microlésion, et nous évaluerons la régénération au-delà du site de cette deuxième lésion.

## 4.2. Rho et survie des CGR

L'utilisation de C3 perméable pendant 2 semaines suivant une lésion nous a donné ~20% de survie des CGR, comparé aux ~4 à 6% obtenus chez les témoins (Bertrand et al., 2007). Une hypothèse que nous suggère cette augmentation de seulement 15% est que Rho ne serait pas impliqué dans la principale voie de mort des CGR induite par la lésion du nerf optique, mais serait dans la voie de signalisation de molécules responsables de la mort d'une partie seulement des CGR. On ne connaît pas l'identité des « activateurs » de Rho dans la rétine elle-même, mais puisque les corps cellulaires sont dans l'œil, protégés des molécules inhibitrices de la myéline ou de la cicatrice par une distance de plusieurs millimètres, il semble peu probable que ces inhibiteurs soient responsables de l'activation de Rho associée à la mort des CGR. On ne peut toutefois pas exclure complètement un signal rétrograde associé à la présence de ces molécules inhibitrices.

Les stimuli spécifiques induisant l'apoptose des CGR après une lésion du nerf optique ne sont pas déterminés. Il y a cependant 2 molécules qui ont été associées à la mort des CGR et qui sont connues pour activer Rho dans des cellules neuronales. De plus, leur expression augmente pendant les périodes où nous avons montré que l'inactivation de Rho stimulait la survie. Ces 2 activateurs potentiels de Rho sont le  $\text{TNF}\alpha$  et le glutamate.

$\text{TNF}\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire dont le niveau est très rapidement augmenté après une lésion du SNC (Fan et al., 1996; Shohami et al., 1997; Lee et al., 2000;

Morganti-Kossmann et al., 2002). Sa présence a été associée à la mort par apoptose de neurones et de cellules gliales, entre autres dans des modèles de lésion de la moelle épinière (Lee et al., 2000; Yune et al., 2003). L'augmentation du TNF $\alpha$  a été détectée dans le nerf optique et dans la rétine après une lésion intraorbitale du nerf optique et sa présence est principalement associée à des cellules gliales (Tezel et al., 2004). On ne sait pas si l'augmentation du TNF $\alpha$  se fait rapidement dans ce modèle de lésion puisque l'évaluation du niveau de la cytokine a été faite seulement après 2 semaines. Tezel et al ont utilisé des souris knock-out pour le gène de TNF-R1, et ont démontré que la mort des CGR était diminuée chez ces mutants par rapport aux souris témoins de type sauvage (Tezel et al., 2004). Cette diminution était observée à partir de la deuxième semaine et se maintenait au moins jusqu'à 6 semaines après la lésion, avec 37% de mort de CGR chez les mutants par rapport à 61 % chez les souris lésées de types sauvage. Ces résultats suggèrent que TNF $\alpha$  contribue à la mort des CGR via son action sur le récepteur TNF-R1 et qu'on peut sauver les CGR de façon permanente en bloquant l'action du TNF $\alpha$ .

L'activation de Rho par TNF $\alpha$  a été détectée dans des cellules neuronales (Neumann et al., 2002a) et non neuronales (Hunter et al., 2003) et TNF-R1 était impliqué dans ce dernier cas. Le fait que TNF $\alpha$  soit encore élevé 2 semaines après une lésion du nerf optique (Tezel et al., 2004), combiné à notre résultat montrant que l'inactivation de Rho dans la deuxième semaine augmente davantage la survie des CGR, suggère que TNF $\alpha$  pourrait être un activateur de Rho après une lésion du nerf optique.

L'autre activateur potentiel de Rho que nous considérons est le glutamate. C'est un acide aminé excitateur pour les neurones, et une trop forte augmentation du glutamate extracellulaire peut entraîner la mort neuronale (Beal, 1992; Isenmann et al., 2003; Arundine and Tymianski, 2004). L'augmentation du niveau de glutamate dans l'humeur aqueuse et l'humeur vitrée a été rapportée après une lésion par écrasement intraorbital du nerf optique chez le rat (Yoles and Schwartz, 1998b; Vorwerk et al., 2004). La hausse était observable dès le jour 1, maximale vers le jour 7, et les niveaux étaient revenus à la normale à la fin de la deuxième semaine (Yoles and Schwartz, 1998b; Vorwerk et al., 2004).

Le glutamate a des récepteurs métabotropes (mGluR) et ionotropes (iGluR), ces derniers étant de type AMPA ou NMDA. Après une lésion du nerf optique, l'utilisation de différents modulateurs des récepteurs mGluRs n'a entraîné aucun changement dans la survie des CGR, suggérant que les récepteurs métabotropes du glutamate ne sont pas impliqués dans la mort des CGR dans ce modèle de lésion (Kermer et al., 2001). Cependant, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA (MK-801) ou AMPA (DNQX) a permis d'augmenter la survie des CGR après une lésion du nerf optique, suggérant un rôle pour ces 2 récepteurs dans la mort des CGR (Yoles et al., 1997; Schuettauf et al., 2000).

L'activation de Rho a été associée à l'activité des récepteurs AMPA et NMDA dans quelques études. D'une part, dans des expériences *in vitro* portant sur le lien entre le

glutamate et l'activation de la méosine, une protéine impliquée dans la liaison du cytosquelette d'actine à la membrane, des essais « pull down » ont montré que le glutamate pouvait activer RhoA dans des cellules neuronales, par l'intermédiaire de récepteurs AMPA (Jeon et al., 2002; Kim et al., 2004b). D'autre part, *in vivo*, Kitaoka et al ont observé une augmentation du niveau d'expression de RhoA dans les CGR dans un modèle de neurotoxicité induite par injection de NMDA (Kitaoka et al., 2004). Ils ont aussi noté que la mort des CGR résultant de l'injection de NMDA était diminuée par l'utilisation de fasudil, un inhibiteur de ROCK, suggérant que l'activation des récepteurs NMDA peut entraîner l'activation de Rho (Kitaoka et al., 2004). Ces résultats suggèrent que le glutamate peut entraîner l'activation de Rho via ses récepteurs de type NMDA et AMPA, les 2 types de récepteurs potentiellement impliqués dans la mort des CGR après une lésion du nerf optique (Yoles et al., 1997; Schuettauf et al., 2000).

TNF $\alpha$  et le glutamate sont donc 2 candidats potentiels pour activer Rho dans la rétine et entraîner la mort de CGR pendant la période où l'inactivation de Rho par C3 perméable stimule la survie. Une prochaine étape à réaliser serait de déterminer si TNF $\alpha$  ou le glutamate sont effectivement impliqués dans la mort des CGR associée à l'activation de Rho. Pour ce faire, on devrait déterminer si TNF $\alpha$  ou le glutamate (1) sont augmentés après la lésion dans notre modèle, (2) augmentent le niveau d'activation de Rho, et (3) causent la mort des CGR d'une manière dépendante de Rho.

Dans cette première hypothèse envisagée pour déterminer comment Rho est impliqué dans la mort des CGR, Rho serait activé tôt dans le processus apoptotique, à un moment où sa désactivation pourrait empêcher la cellule de mourir. Mais le fait que l'inactivation de Rho ne sauve que 20% des CGR après 2 semaines peut aussi suggérer une deuxième hypothèse, où l'activation de Rho se ferait beaucoup plus tard dans le processus apoptotique.

Par leur rôle dans la régulation de l'actine, en particulier leur action sur la chaîne légère de la myosine (Myosin light chain ou MLC), Rho et son effecteur ROCK ont été impliqués dans le cloquage des membranes (membrane blebbing) de cellules de type neuronal (PC12) en culture, après induction de l'apoptose par retrait de sérum (Mills et al., 1998). L'activation de Rho induit celle de ROCK, qui phosphoryle et active la MLC pour entraîner la contraction membranaire nécessaire à la formation de cloques dans la membrane. ROCK activé phosphoryle aussi la MLC phosphatase et l'inactive, contribuant à garder MLC activée. Cette étape de cloquage des membranes est une des étapes finales de l'exécution de l'apoptose, avec la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. La cellule est donc déjà engagée à mourir à ce moment. Dans notre modèle de lésion, il est admis que la majorité des CGR meurent par apoptose (Berkelaar et al., 1994). Dans cette hypothèse où Rho serait activé comme effecteur tardif de l'apoptose, son inactivation continue ne ferait probablement que retarder la mort des CGR puisqu'elles seraient déjà condamnées à mourir à cette étape, ce qui expliquerait le faible pourcentage

de CGR sauvées à 2 semaines. On pourrait en conséquence s'attendre à ce que ce taux de survie ne soit pas maintenu dans le temps même si on continuait à livrer du C3 perméable pendant une plus longue période.

Il serait donc intéressant de déterminer si un apport continu de C3 perméable pendant 4 semaines permet ou non de maintenir la différence de 15% observée après 2 semaines. Pour ces tests, il pourrait être préférable de choisir une autre approche que celle des injections répétées, qui sont trop invasives pour être utilisées sur une longue période. Une approche plus appropriée pourrait être l'utilisation de AAV-C3, telle que testée dans le laboratoire de Larry Benowitz (Fischer et al., 2004b), puisque la transfection d'un gène par un AAV injecté dans le vitré permet l'expression par les CGR sur une période de plusieurs mois (Dudus et al., 1999; Sapiha et al., 2003). Dans l'hypothèse où Rho est un effecteur tardif de l'apoptose, on devrait s'attendre à ce que la différence devienne presque nulle entre les témoins et les animaux traités 4 semaines après la lésion, puisque la survie est passablement stable après 2 semaines chez les animaux non traités. Par contre, si l'activation de Rho provient de  $\text{TNF}\alpha$  ou de glutamate, et se produit tôt dans le processus d'apoptose, le maintien de la livraison de C3 perméable pour une période de 4 semaines pourrait sauver au moins une partie du 15% supplémentaire puisque la production de TNF et de glutamate diminuent avec le temps.



### **4.3. Conclusion**

Nous avons donc montré que l'inactivation de Rho par C3 perméable stimule la survie et la régénération des CGR après une lésion. Les informations obtenues en testant différents calendriers d'injections nous permettent d'identifier des activateurs potentiels de Rho dans la rétine et de relier l'efficacité de Rho sur la régénération à l'activation d'un programme de croissance des CGR. Il faut maintenant essayer de comprendre comment Rho est impliqué dans la survie et déterminer si son inactivation peut sauver un certain pourcentage de CGR de façon permanente. Quant à l'effet de l'inactivation de Rho sur la régénération, c'est selon moi ce qui est le plus prometteur à long terme, mais il faut trouver comment stimuler les CGR à se mettre et rester en mode de croissance.

## Bibliographie

- Ahmed Z, Dent RG, Leadbeater WE, Smith C, Berry M, Logan A (2005) Matrix metalloproteases: degradation of the inhibitory environment of the transected optic nerve and the scar by regenerating axons. *Mol Cell Neurosci* 28:64-78.
- Ahmed Z, Suggate EL, Brown ER, Dent RG, Armstrong SJ, Barrett LB, Berry M, Logan A (2006) Schwann cell-derived factor-induced modulation of the NgR/p75NTR/EGFR axis disinhibits axon growth through CNS myelin in vivo and in vitro. *Brain* 129:1517-1533.
- Aktories K, Wilde C, Vogelsang M (2004) Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152:1-22.
- Alabed YZ, Grados-Munro E, Ferraro GB, Hsieh SH, Fournier AE (2006) Neuronal responses to myelin are mediated by rho kinase. *J Neurochem* 96:1616-1625.
- Aoki K, Nakamura T, Matsuda M (2004) Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem* 279:713-719.
- Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 61:657-668.
- Bandtlow CE (2003) Regeneration in the central nervous system. *Exp Gerontol* 38:79-86.
- Bandtlow CE, Schmidt MF, Hassinger TD, Schwab ME, Kater SB (1993) Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones. *Science* 259:80-83.
- Batchelor PE, Howells DW (2003) CNS regeneration: clinical possibility or basic science fantasy? *J Clin Neurosci* 10:523-534.
- Beal MF (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *Faseb J* 6:3338-3344.
- Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC (2002) Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 137:37-47.

- Benfey M, Aguayo AJ (1982) Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature* 296:150-152.
- Benowitz LI, Routtenberg A (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20:84-91.
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 14:4368-4374.
- Berry M, Carlile J, Hunter A (1996) Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. *J Neurocytol* 25:147-170.
- Berry M, Rees L, Hall S, Yiu P, Sievers J (1988) Optic axons regenerate into sciatic nerve isografts only in the presence of Schwann cells. *Brain Res Bull* 20:223-231.
- Bertrand J, Di Polo A, McKerracher L (2007) Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists. *Neurobiol Dis* 25:65-72.
- Bertrand J, Winton MJ, Rodriguez-Hernandez N, Campenot RB, McKerracher L (2005) Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats. *J Neurosci* 25:1113-1121.
- Bien A, Seidenbecher CI, Bockers TM, Sabel BA, Kreutz MR (1999) Apoptotic versus necrotic characteristics of retinal ganglion cell death after partial optic nerve injury. *J Neurotrauma* 16:153-163.
- Bishop AL, Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2:241-255.
- Bobak DA (1999) Clostridial toxins: molecular probes of Rho-dependent signaling and apoptosis. *Mol Cell Biochem* 193:37-42.
- Bonfanti L, Strettoi E, Chierzi S, Cenni MC, Liu XH, Martinou JC, Maffei L, Rabacchi SA (1996) Protection of retinal ganglion cells from natural and axotomy-induced cell death in neonatal transgenic mice overexpressing bcl-2. *J Neurosci* 16:4186-4194.

- Borisoff JF, Chan CC, Hiebert GW, Oschipok L, Robertson GS, Zamboni R, Steeves JD, Tetzlaff W (2003) Suppression of Rho-kinase activity promotes axonal growth on inhibitory CNS substrates. *Mol Cell Neurosci* 22:405-416.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416:636-640.
- Bray GM, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ (1987) The use of peripheral nerve grafts to enhance neuronal survival, promote growth and permit terminal reconnections in the central nervous system of adult rats. *J Exp Biol* 132:5-19.
- Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T (1999) Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96:795-806.
- Buchsbaum RJ, Connolly BA, Feig LA (2002) Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol* 22:4073-4085.
- Cafferty WB, Gardiner NJ, Das P, Qiu J, McMahon SB, Thompson SW (2004) Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knockout mice. *J Neurosci* 24:4432-4443.
- Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* 22:89-101.
- Cai D, Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT (2001) Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci* 21:4731-4739.
- Cajal SRY (1928) *Degeneration and regeneration of the nervous system*, 1968 Edition. New York: Hafner Publishing Company.
- Caroni P, Schwab ME (1988a) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 106:1281-1288.

- Caroni P, Schwab ME (1988b) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1:85-96.
- Carter DA, Bray GM, Aguayo AJ (1989) Regenerated retinal ganglion cell axons can form well-differentiated synapses in the superior colliculus of adult hamsters. *J Neurosci* 9:4042-4050.
- Casha S, Yu WR, Fehlings MG (2005) FAS deficiency reduces apoptosis, spares axons and improves function after spinal cord injury. *Exp Neurol* 196:390-400.
- Cellerino A, Bahr M, Isenmann S (2000) Apoptosis in the developing visual system. *Cell Tissue Res* 301:53-69.
- Chaudhary P, Ahmed F, Quebada P, Sharma SC (1999) Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection. *Brain Res Mol Brain Res* 67:36-45.
- Chen DF, Jhaveri S, Schneider GE (1995) Intrinsic changes in developing retinal neurons result in regenerative failure of their axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7287-7291.
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18:4914-4928.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403:434-439.
- Cheng L, Sapieha P, Kittlerova P, Hauswirth WW, Di Polo A (2002) TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J Neurosci* 22:3977-3986.
- Chierzi S, Strettoi E, Cenni MC, Maffei L (1999) Optic nerve crush: axonal responses in wild-type and bcl-2 transgenic mice. *J Neurosci* 19:8367-8376.
- Chierzi S, Cenni MC, Maffei L, Pizzorusso T, Porciatti V, Ratto GM, Strettoi E (1998) Protection of retinal ganglion cells and preservation of function after optic nerve lesion in bcl-2 transgenic mice. *Vision Res* 38:1537-1543.

- Chilton JK (2006) Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 292:13-24.
- Chimini G, Chavrier P (2000) Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol* 2:E191-196.
- Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, Chen M, Dixon CE, Seidberg NA, Melick J, Loeffert JE, Nathaniel PD, Jin KL, Graham SH (2000) Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 74:740-753.
- Cui Q, Lu Q, So KF, Yip HK (1999) CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:760-766.
- Cui Q, Cho KS, So KF, Yip HK (2004) Synergistic effect of Nogo-neutralizing antibody IN-1 and ciliary neurotrophic factor on axonal regeneration in adult rodent visual systems. *J Neurotrauma* 21:617-625.
- Cui Q, Yip HK, Zhao RC, So KF, Harvey AR (2003) Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Mol Cell Neurosci* 22:49-61.
- Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W, Dotti CG (2003) RhoA/ROCK regulation of neuriteogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J Cell Biol* 162:1267-1279.
- David S, Aguayo AJ (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214:931-933.
- David S, Lacroix S (2003) Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu Rev Neurosci* 26:411-440.
- DeBellard ME, Tang S, Mukhopadhyay G, Shen YJ, Filbin MT (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Mol Cell Neurosci* 7:89-101.
- Demjen D, Klusmann S, Kleber S, Zuliani C, Stieltjes B, Metzger C, Hirt UA, Walczak H, Falk W, Essig M, Edler L, Krammer PH, Martin-Villalba A (2004) Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10:389-395.

- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L (2002) Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* 22:6570-6577.
- DerMardirossian C, Bokoch GM (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15:356-363.
- Dezawa M, Adachi-Usami E (2000) Role of Schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration. *Prog Retin Eye Res* 19:171-204.
- Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ (1998) Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3978-3983.
- Dickson BJ (2001) Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 11:103-110.
- Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A (1991) Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* 351:400-402.
- Domeniconi M, Zampieri N, Spencer T, Hilaire M, Mellado W, Chao MV, Filbin MT (2005) MAG Induces Regulated Intramembrane Proteolysis of the p75 Neurotrophin Receptor to Inhibit Neurite Outgrowth. *Neuron* 46:849-855.
- Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin M (2002) Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 35:283-290.
- Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD (1997) Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci* 17:5316-5326.
- Doster SK, Lozano AM, Aguayo AJ, Willard MB (1991) Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury. *Neuron* 6:635-647.
- Dovas A, Couchman JR (2005) RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* 390:1-9.

- Dransart E, Olofsson B, Cherfils J (2005) RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic* 6:957-966.
- Dubreuil CI, Winton MJ, McKerracher L (2003) Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J Cell Biol* 162:233-243.
- Dubreuil CI, Marklund N, Deschamps K, McIntosh TK, McKerracher L (2006) Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats. *Exp Neurol* 198:361-369.
- Dudus L, Anand V, Acland GM, Chen SJ, Wilson JM, Fisher KJ, Maguire AM, Bennett J (1999) Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV. *Vision Res* 39:2545-2553.
- Eldadah BA, Faden AI (2000) Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma* 17:811-829.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.
- Eva A, Vecchio G, Rao CD, Tronick SR, Aaronson SA (1988) The predicted DBL oncogene product defines a distinct class of transforming proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2061-2065.
- Fan J, Mansfield SG, Redmond T, Gordon-Weeks PR, Raper JA (1993) The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J Cell Biol* 121:867-878.
- Fan L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ, Smith DH, McIntosh TK (1996) Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 36:287-291.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143-2155.
- Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49:377-391.
- Filbin MT (1999) The benefits of adding insult to injury. *Neuron* 23:2-4.
- Filbin MT (2003) Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 4:703-713.



- Fischer D, Pavlidis M, Thanos S (2000) Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3943-3954.
- Fischer D, He Z, Benowitz LI (2004a) Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci* 24:1646-1651.
- Fischer D, Petkova V, Thanos S, Benowitz LI (2004b) Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *J Neurosci* 24:8726-8740.
- Flanagan JG, Vanderhaeghen P (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21:309-345.
- Forget MA, Desrosiers RR, Gingras D, Beliveau R (2002) Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochem J* 361:243-254.
- Forrester J, Peters A (1967) Nerve fibres in optic nerve of rat. *Nature* 214:245-247.
- Fournier AE, McKerracher L (1997) Expression of specific tubulin isotypes increases during regeneration of injured CNS neurons, but not after the application of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurosci* 17:4623-4632.
- Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409:341-346.
- Fournier AE, Takizawa BT, Strittmatter SM (2003) Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *J Neurosci* 23:1416-1423.
- Fournier AE, Gould GC, Liu BP, Strittmatter SM (2002a) Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci* 22:8876-8883.
- Fournier AE, GrandPre T, Gould G, Wang X, Strittmatter SM (2002b) Nogo and the Nogo-66 receptor. *Prog Brain Res* 137:361-369.
- Frank M, Wolburg H (1996) Cellular reactions at the lesion site after crushing of the rat optic nerve. *Glia* 16:227-240.

- Fritz G, Aktories K (1994) ADP-ribosylation of Rho proteins by Clostridium botulinum exoenzyme C3 is influenced by phosphorylation of Rho-associated factors. *Biochem J* 300 ( Pt 1):133-139.
- Gao Y, Nikulina E, Mellado W, Filbin MT (2003) Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. *J Neurosci* 23:11770-11777.
- Garcia-Valenzuela E, Sharma SC, Pina AL (2005) Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. *Mol Vis* 11:225-231.
- Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, Sharma SC (1994) Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J Neurobiol* 25:431-438.
- Genth H, Gerhard R, Maeda A, Amano M, Kaibuchi K, Aktories K, Just I (2003) Entrapment of Rho ADP-ribosylated by Clostridium botulinum C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J Biol Chem* 278:28523-28527.
- Goldberg JL, Barres BA (2000) The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu Rev Neurosci* 23:579-612.
- Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, Barres BA (2002) Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells. *Science* 296:1860-1864.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19:1-49.
- Grafstein B, Ingoglia NA (1982) Intracranial transection of the optic nerve in adult mice: preliminary observations. *Exp Neurol* 76:318-330.
- GrandPre T, Li S, Strittmatter SM (2002) Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 417:547-551.
- GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403:439-444.
- Groysman M, Russek CS, Katzav S (2000) Vav, a GDP/GTP nucleotide exchange factor, interacts with GDIs, proteins that inhibit GDP/GTP dissociation. *FEBS Lett* 467:75-80.

- Grunwald IC, Klein R (2002) Axon guidance: receptor complexes and signaling mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 12:250-259.
- Gungabissoon RA, Bamburg JR (2003) Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. *J Histochem Cytochem* 51:411-420.
- Habib AA, Marton LS, Allwardt B, Gulcher JR, Mikol DD, Hognason T, Chattopadhyay N, Stefansson K (1998) Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system. *J Neurochem* 70:1704-1711.
- Hagg T, Oudega M (2006) Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23:264-280.
- Hains BC, Black JA, Waxman SG (2003) Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury. *J Comp Neurol* 462:328-341.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Hall A (2005) Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33:891-895.
- Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, Cerione RA (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* 354:311-314.
- Harvey AR, Robertson D (1992) Time-course and extent of retinal ganglion cell death following ablation of the superior colliculus in neonatal rats. *J Comp Neurol* 325:83-94.
- Hasegawa Y, Fujitani M, Hata K, Tohyama M, Yamagishi S, Yamashita T (2004) Promotion of axon regeneration by myelin-associated glycoprotein and Nogo through divergent signals downstream of Gi/G. *J Neurosci* 24:6826-6832.
- Hata K, Fujitani M, Yasuda Y, Doya H, Saito T, Yamagishi S, Mueller BK, Yamashita T (2006) RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. *J Cell Biol* 173:47-58.
- He MH, Cheung ZH, Yu EH, Tay DK, So KF (2004) Cytochrome c release and caspase-3 activation in retinal ganglion cells following different distance of axotomy of the optic nerve in adult hamsters. *Neurochem Res* 29:2153-2161.

- He Z, Koprivica V (2004) The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annu Rev Neurosci* 27:341-368.
- Heiduschka P, Thanos S (2000) Restoration of the retinofugal pathway. *Prog Retin Eye Res* 19:577-606.
- Holmberg J, Frisen J (2002) Ephrins are not only unattractive. *Trends Neurosci* 25:239-243.
- Houle JD, Tom VJ, Mayes D, Wagoner G, Phillips N, Silver J (2006) Combining an autologous peripheral nervous system "bridge" and matrix modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration beyond a hemisection lesion of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 26:7405-7415.
- Hsieh SH, Ferraro GB, Fournier AE (2006) Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. *J Neurosci* 26:1006-1015.
- Hu F, Liu BP, Budel S, Liao J, Chin J, Fournier A, Strittmatter SM (2005) Nogo-A interacts with the Nogo-66 receptor through multiple sites to create an isoform-selective subnanomolar agonist. *J Neurosci* 25:5298-5304.
- Hu H, Marton TF, Goodman CS (2001) Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling. *Neuron* 32:39-51.
- Huang JK, Phillips GR, Roth AD, Pedraza L, Shan W, Belkaid W, Mi S, Fex-Svenningsen A, Florens L, Yates JR, 3rd, Colman DR (2005) Glial membranes at the node of Ranvier prevent neurite outgrowth. *Science* 310:1813-1817.
- Huber AB, Schwab ME (2000) Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem* 381:407-419.
- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF (2003) Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci* 26:509-563.
- Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, Oertle T, Schwab ME (2002) Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci* 22:3553-3567.

- Hunter I, Cobban HJ, Vandenabeele P, MacEwan DJ, Nixon GF (2003) Tumor necrosis factor-alpha-induced activation of RhoA in airway smooth muscle cells: role in the Ca<sup>2+</sup> sensitization of myosin light chain<sup>20</sup> phosphorylation. *Mol Pharmacol* 63:714-721.
- Huot J (2004) Ephrin signaling in axon guidance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:813-818.
- Inoue T, Hosokawa M, Morigiwa K, Ohashi Y, Fukuda Y (2002) Bcl-2 overexpression does not enhance in vivo axonal regeneration of retinal ganglion cells after peripheral nerve transplantation in adult mice. *J Neurosci* 22:4468-4477.
- Isenmann S, Kretz A, Cellerino A (2003) Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog Retin Eye Res* 22:483-543.
- Isenmann S, Engel S, Gillardon F, Bahr M (1999) Bax antisense oligonucleotides reduce axotomy-induced retinal ganglion cell death in vivo by reduction of Bax protein expression. *Cell Death Differ* 6:673-682.
- Isenmann S, Wahl C, Krajewski S, Reed JC, Bahr M (1997) Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. *Eur J Neurosci* 9:1763-1772.
- Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, Maekawa M, Watanabe N, Saito Y, Narumiya S (1997) p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett* 404:118-124.
- Itaya SK (1980) Retinal efferents from the pretectal area in the rat. *Brain Res* 201:436-441.
- Jaffe AB, Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247-269.
- Jaffe AB, Aspenstrom P, Hall A (2004) Human CNK1 acts as a scaffold protein, linking Rho and Ras signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 24:1736-1746.
- Jain A, Brady-Kalnay SM, Bellamkonda RV (2004) Modulation of Rho GTPase activity alleviates chondroitin sulfate proteoglycan-dependent inhibition of neurite extension. *J Neurosci Res* 77:299-307.
- Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and

- neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol* 126:801-810.
- Jeon S, Kim S, Park JB, Suh PG, Kim YS, Bae CD, Park J (2002) RhoA and Rho kinase-dependent phosphorylation of moesin at Thr-558 in hippocampal neuronal cells by glutamate. *J Biol Chem* 277:16576-16584.
- Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68:459-486.
- Keane RW, Davis AR, Dietrich WD (2006) Inflammatory and apoptotic signaling after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23:335-344.
- Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD (2001) Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:422-429.
- Keirstead SA, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Aguayo AJ, Levesque M, So KF (1985) Responses to light of retinal neurons regenerating axons into peripheral nerve grafts in the rat. *Brain Res* 359:402-406.
- Keirstead SA, Rasminsky M, Fukuda Y, Carter DA, Aguayo AJ, Vidal-Sanz M (1989) Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. *Science* 246:255-257.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78:425-435.
- Kermer P, Klocker N, Bahr M (1999a) Long-term effect of inhibition of ced 3-like caspases on the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo. *Exp Neurol* 158:202-205.
- Kermer P, Klocker N, Bahr M (2001) Modulation of metabotropic glutamate receptors fails to prevent the loss of adult rat retinal ganglion cells following axotomy or N-methyl-D-aspartate lesion in vivo. *Neurosci Lett* 315:117-120.
- Kermer P, Klocker N, Labes M, Bahr M (1998) Inhibition of CPP32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary cell death in vivo. *J Neurosci* 18:4656-4662.

- Kermer P, Klocker N, Labes M, Thomsen S, Srinivasan A, Bahr M (1999b) Activation of caspase-3 in axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *FEBS Lett* 453:361-364.
- Kermer P, Ankerhold R, Klocker N, Krajewski S, Reed JC, Bahr M (2000) Caspase-9: involvement in secondary death of axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *Brain Res Mol Brain Res* 85:144-150.
- Kidd T, Bland KS, Goodman CS (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96:785-794.
- Kiernan JA (1985a) Axonal and vascular changes following injury to the rat's optic nerve. *J Anat* 141:139-154.
- Kiernan JA (1985b) A conditioning lesion does not induce axonal regeneration in the optic nerve of the rat. *Exp Neurol* 87:181-184.
- Kim JE, Liu BP, Park JH, Strittmatter SM (2004a) Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron* 44:439-451.
- Kim SJ, Jeon S, Shin EY, Kim EG, Park J, Bae CD (2004b) AMPA, not NMDA, activates RhoA GTPases and subsequently phosphorylates moesin. *Exp Mol Med* 36:98-102.
- Kitaoka Y, Kumai T, Lam TT, Kuribayashi K, Isenoumi K, Munemasa Y, Motoki M, Kobayashi S, Ueno S (2004) Involvement of RhoA and possible neuroprotective effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Res* 1018:111-118.
- Klocker N, Cellerino A, Bahr M (1998) Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells In vivo. *J Neurosci* 18:1038-1046.
- Kobayashi K, Takahashi M, Matsushita N, Miyazaki J, Koike M, Yaginuma H, Osumi N, Kaibuchi K (2004) Survival of developing motor neurons mediated by Rho GTPase signaling pathway through Rho-kinase. *J Neurosci* 24:3480-3488.
- Koeberle PD, Bahr M (2004) Growth and guidance cues for regenerating axons: where have they gone? *J Neurobiol* 59:162-180.

- Koprivica V, Cho KS, Park JB, Yiu G, Atwal J, Gore B, Kim JA, Lin E, Tessier-Lavigne M, Chen DF, He Z (2005) EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Science* 310:106-110.
- Kottis V, Thibault P, Mikol D, Xiao ZC, Zhang R, Dergham P, Braun PE (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurochem* 82:1566-1569.
- Kruger RP, Abrandt J, Guan KL (2005) Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:789-800.
- Lasek RJ, Garner JA, Brady ST (1984) Axonal transport of the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol* 99:212s-221s.
- Laufs U, Endres M, Stagliano N, Amin-Hanjani S, Chui DS, Yang SX, Simoncini T, Yamada M, Rabkin E, Allen PG, Huang PL, Bohm M, Schoen FJ, Moskowitz MA, Liao JK (2000) Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 106:15-24.
- Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Brann AB, Hirschberg DL, Lavie V, Schwartz M (1996) Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *Faseb J* 10:1296-1302.
- Leaver SG, Cui Q, Plant GW, Arulpragasam A, Hisheh S, Verhaagen J, Harvey AR (2006) AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells. *Gene Ther* 13:1328-1341.
- Lee JK, Kim JE, Sivula M, Strittmatter SM (2004) Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J Neurosci* 24:6209-6217.
- Lee YB, Yune TY, Baik SY, Shin YH, Du S, Rhim H, Lee EB, Kim YC, Shin ML, Markelonis GJ, Oh TH (2000) Role of tumor necrosis factor-alpha in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *Exp Neurol* 166:190-195.
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi G, McKerracher L (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci* 19:7537-7547.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 20:4615-4626.



- Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L (1996) The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 16:5313-5327.
- Levin LA, Schlamp CL, Spieldoch RL, Geszvain KM, Nickells RW (1997) Identification of the bcl-2 family of genes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2545-2553.
- Li M, Shibata A, Li C, Braun PE, McKerracher L, Roder J, Kater SB, David S (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *J Neurosci Res* 46:404-414.
- Li S, Kim JE, Budel S, Hampton TG, Strittmatter SM (2005) Transgenic inhibition of Nogo-66 receptor function allows axonal sprouting and improved locomotion after spinal injury. *Mol Cell Neurosci* 29:26-39.
- Li S, Liu BP, Budel S, Li M, Ji B, Walus L, Li W, Jirik A, Rabacchi S, Choi E, Worley D, Sah DW, Pepinsky B, Lee D, Relton J, Strittmatter SM (2004) Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury. *J Neurosci* 24:10511-10520.
- Lingor P, Teusch, N., Mack, H., Mueller, B.K., Bahr, M. (2006) Evaluation of rho kinase (ROCK) inhibitors in the optic nerve crush model. In: *Neuroscience 2006*, Program no 228.9. Atlanta, Georgia.
- Liu BP, Fournier A, GrandPre T, Strittmatter SM (2002) Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 297:1190-1193.
- Liu X, Hawkes E, Ishimaru T, Tran T, Sretavan DW (2006) EphB3: an endogenous mediator of adult axonal plasticity and regrowth after CNS injury. *J Neurosci* 26:3087-3101.
- Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW (1997) Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 17:5395-5406.

- Lodovichi C, Di Cristo G, Cenni MC, Maffei L (2001) Bcl-2 overexpression per se does not promote regeneration of neonatal crushed optic fibers. *Eur J Neurosci* 13:833-838.
- Logan A, Ahmed Z, Baird A, Gonzalez AM, Berry M (2006) Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury. *Brain* 129:490-502.
- Lorber B, Berry M, Logan A (2005) Lens injury stimulates adult mouse retinal ganglion cell axon regeneration via both macrophage- and lens-derived factors. *Eur J Neurosci* 21:2029-2034.
- Luo L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601-635.
- Luo Y, Raible D, Raper JA (1993) Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75:217-227.
- Madura T, Yamashita T, Kubo T, Fujitani M, Hosokawa K, Tohyama M (2004) Activation of Rho in the injured axons following spinal cord injury. *EMBO Rep* 5:412-417.
- Malik JM, Shevtsova Z, Bahr M, Kugler S (2005) Long-term in vivo inhibition of CNS neurodegeneration by Bcl-XL gene transfer. *Mol Ther* 11:373-381.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1632-1636.
- Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, Vogel J, Falk W, Schenkel J, Krammer PH (2001) Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ* 8:679-686.
- Maskery S, Shinbrot T (2005) Deterministic and stochastic elements of axonal guidance. *Annu Rev Biomed Eng* 7:187-221.
- Matsushita K, Wu Y, Qiu J, Lang-Lazdunski L, Hirt L, Waeber C, Hyman BT, Yuan J, Moskowitz MA (2000) Fas receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. *J Neurosci* 20:6879-6887.

- McGee AW, Strittmatter SM (2003) The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration. *Trends Neurosci* 26:193-198.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 11:3398-3411.
- McKerracher L (2001) Spinal cord repair: strategies to promote axon regeneration. *Neurobiol Dis* 8:11-18.
- McKerracher L, Vidal-Sanz M, Essagian C, Aguayo AJ (1990) Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J Neurosci* 10:2834-2841.
- McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13:805-811.
- Mey J, Thanos S (1993) Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res* 602:304-317.
- Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, Levesque M, Allaire N, Perrin S, Sands B, Crowell T, Cate RL, McCoy JM, Pepinsky RB (2004) LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 7:221-228.
- Mikol DD, Stefansson K (1988) A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes. *J Cell Biol* 106:1273-1279.
- Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN (1998) Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* 140:627-636.
- Minambres R, Guasch RM, Perez-Arago A, Guerri C (2006) The RhoA/ROCK-1/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. *J Cell Sci* 119:271-282.
- Ming G, Henley J, Tessier-Lavigne M, Song H, Poo M (2001) Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron* 29:441-452.
- Ming GL, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo MM (1997) cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19:1225-1235.

- Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, Henke-Fahle S, Mueller BK (2003) The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci* 22:319-330.
- Moon LD, Asher RA, Rhodes KE, Fawcett JW (2001) Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci* 4:465-466.
- Moon SY, Zheng Y (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13:13-22.
- Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T (2002) Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 8:101-105.
- Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW (2002) Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res* 137:313-332.
- Mueller BK, Mack H, Teusch N (2005) Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* 4:387-398.
- Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT (1994) A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13:757-767.
- Napankangas U, Lindqvist N, Lindholm D, Hallbook F (2003) Rat retinal ganglion cells upregulate the pro-apoptotic BH3-only protein Bim after optic nerve transection. *Brain Res Mol Brain Res* 120:30-37.
- Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA (2002a) Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *J Neurosci* 22:854-862.
- Neumann S, Woolf CJ (1999) Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron* 23:83-91.
- Neumann S, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Basbaum AI (2002b) Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* 34:885-893.

- Niederost B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE (2002) Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* 22:10368-10376.
- Niederost BP, Zimmermann DR, Schwab ME, Bandtlow CE (1999) Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci* 19:8979-8989.
- Nikolic M (2002) The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol* 34:731-745.
- Oertle T, Schwab ME (2003) Nogo and its paRTNers. *Trends Cell Biol* 13:187-194.
- Oertle T, van der Haar ME, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, Huber AB, Simonen M, Schnell L, Brosamle C, Kaupmann K, Vallon R, Schwab ME (2003) Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci* 23:5393-5406.
- Olofsson B (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 11:545-554.
- Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He XL, Garcia KC, He Z (2005) A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 45:345-351.
- Pasterkamp RJ, Verhaagen J (2001) Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 35:36-54.
- Patel BN, Van Vactor DL (2002) Axon guidance: the cytoplasmic tail. *Curr Opin Cell Biol* 14:221-229.
- Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (1996) Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:489-500.
- Pernet V, Di Polo A (2006) Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy in vivo. *Brain* 129:1014-1026.

- Perry VH, Cowey A (1982) A sensitive period for ganglion cell degeneration and the formation of aberrant retino-fugal connections following tectal lesions in rats. *Neuroscience* 7:583-594.
- Prinjha R, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, Michalovich D, Simmons DL, Walsh FS (2000) Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 403:383-384.
- Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, Filbin MT (2002) Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 34:895-903.
- Raibon E, Sauve Y, Carter DA, Gaillard F (2002) Microglial changes accompanying the promotion of retinal ganglion cell axonal regeneration into peripheral nerve grafts. *J Neurocytol* 31:57-71.
- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ (1980) Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 284:264-265.
- Richardson PM, Issa VM, Shemie S (1982) Regeneration and retrograde degeneration of axons in the rat optic nerve. *J Neurocytol* 11:949-966.
- Richardson PM, Issa VM, Aguayo AJ (1984) Regeneration of long spinal axons in the rat. *J Neurocytol* 13:165-182.
- Ridley AJ (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 11:471-477.
- Ridley AJ, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-399.
- Riento K, Ridley AJ (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:446-456.
- Rossman KL, Der CJ, Sondek J (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:167-180.
- Royo NC, Schouten JW, Fulp CT, Shimizu S, Marklund N, Graham DI, McIntosh TK (2003) From cell death to neuronal regeneration: building a new brain after traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:801-811.

- Salzer JL, Holmes WP, Colman DR (1987) The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J Cell Biol* 104:957-965.
- Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A (2004) Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia* 46:225-251.
- Sapieha PS, Peltier M, Rendahl KG, Manning WC, Di Polo A (2003) Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 24:656-672.
- Sasaki T, Takai Y (1998) The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem Biophys Res Commun* 245:641-645.
- Schmalfeldt M, Bandtlow CE, Dours-Zimmermann MT, Winterhalter KH, Zimmermann DR (2000) Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *J Cell Sci* 113 ( Pt 5):807-816.
- Schmidt A, Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587-1609.
- Schmidt G, Aktories K (1998) Bacterial cytotoxins target Rho GTPases. *Naturwissenschaften* 85:253-261.
- Schnell L, Schwab ME (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 343:269-272.
- Schuettauf F, Naskar R, Vorwerk CK, Zurakowski D, Dreyer EB (2000) Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA-kainate and NMDA receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:4313-4316.
- Schwartz G, Fehlings MG (2002) Secondary injury mechanisms of spinal cord trauma: a novel therapeutic approach for the management of secondary pathophysiology with the sodium channel blocker riluzole. *Prog Brain Res* 137:177-190.
- Schweigreiter R, Walmsley AR, Niederost B, Zimmermann DR, Oertle T, Casademunt E, Frentzel S, Dechant G, Mir A, Bandtlow CE (2004) Versican V2 and the central

- inhibitory domain of Nogo-A inhibit neurite growth via p75NTR/NgR-independent pathways that converge at RhoA. *Mol Cell Neurosci* 27:163-174.
- Scita G, Tenca P, Frittoli E, Tocchetti A, Innocenti M, Giardina G, Di Fiore PP (2000) Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *Embo J* 19:2393-2398.
- Sebok A, Nusser N, Debreceni B, Guo Z, Santos MF, Szeberenyi J, Tigyi G (1999) Different roles for RhoA during neurite initiation, elongation, and regeneration in PC12 cells. *J Neurochem* 73:949-960.
- Seidenbecher CI, Gundelfinger ED, Bockers TM, Trotter J, Kreutz MR (1998) Transcripts for secreted and GPI-anchored brevican are differentially distributed in rat brain. *Eur J Neurosci* 10:1621-1630.
- Selles-Navarro I, Ellezam B, Fajardo R, Latour M, McKerracher L (2001) Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve. *Exp Neurol* 167:282-289.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424.
- Shamah SM, Lin MZ, Goldberg JL, Estrach S, Sahin M, Hu L, Bazalakova M, Neve RL, Corfas G, Debant A, Greenberg ME (2001) EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105:233-244.
- Shao Z, Browning JL, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, Thill G, Levesque M, Sah D, McCoy JM, Murray B, Jung V, Pepinsky RB, Mi S (2005) TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron* 45:353-359.
- Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA (1999) Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* 23:285-295.
- Shirvan A, Kimron M, Holdengreber V, Ziv I, Ben-Shaul Y, Melamed S, Melamed E, Barzilai A, Solomon AS (2002) Anti-semaphorin 3A antibodies rescue retinal



- ganglion cells from cell death following optic nerve axotomy. *J Biol Chem* 277:49799-49807.
- Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, Bass R, Ben-Hur T (1997) Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. *J Neuroimmunol* 72:169-177.
- Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.
- Sivasankaran R, Pei J, Wang KC, Zhang YP, Shields CB, Xu XM, He Z (2004) PKC mediates inhibitory effects of myelin and chondroitin sulfate proteoglycans on axonal regeneration. *Nat Neurosci* 7:261-268.
- Skene JH (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci* 12:127-156.
- Snow DM, Atkinson PB, Hassinger TD, Letourneau PC, Kater SB (1994) Chondroitin sulfate proteoglycan elevates cytoplasmic calcium in DRG neurons. *Dev Biol* 166:87-100.
- So KF, Aguayo AJ (1985) Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res* 328:349-354.
- So KF, Yip HK (1998) Regenerative capacity of retinal ganglion cells in mammals. *Vision Res* 38:1525-1535.
- Song H, Ming G, He Z, Lehmann M, McKerracher L, Tessier-Lavigne M, Poo M (1998) Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 281:1515-1518.
- Springer JE, Azbill RD, Knapp PE (1999) Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med* 5:943-946.
- Stoll G, Trapp BD, Griffin JW (1989) Macrophage function during Wallerian degeneration of rat optic nerve: clearance of degenerating myelin and Ia expression. *J Neurosci* 9:2327-2335.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208.
- Tang BL (2003) Inhibitors of neuronal regeneration: mediators and signaling mechanisms. *Neurochem Int* 42:189-203.

- Tang S, Qiu J, Nikulina E, Filbin MT (2001) Soluble myelin-associated glycoprotein released from damaged white matter inhibits axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 18:259-269.
- Tang S, Woodhall RW, Shen YJ, deBellard ME, Saffell JL, Doherty P, Walsh FS, Filbin MT (1997) Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found in vivo inhibits axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 9:333-346.
- Tezel G, Yang X, Yang J, Wax MB (2004) Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice. *Brain Res* 996:202-212.
- Thanos S, Mey J, Wild M (1993) Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J Neurosci* 13:455-466.
- Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, Guerrero J, Sniezek JE (1999) Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective. *J Head Trauma Rehabil* 14:602-615.
- Tigyi G, Fischer DJ, Sebok A, Yang C, Dyer DL, Miledi R (1996) Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca<sup>2+</sup> signaling and Rho. *J Neurochem* 66:537-548.
- Togawa A, Miyoshi J, Ishizaki H, Tanaka M, Takakura A, Nishioka H, Yoshida H, Doi T, Mizoguchi A, Matsuura N, Niho Y, Nishimune Y, Nishikawa S, Takai Y (1999) Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GDI $\alpha$ . *Oncogene* 18:5373-5380.
- Turnley AM, Bartlett PF (1998) MAG and MOG enhance neurite outgrowth of embryonic mouse spinal cord neurons. *Neuroreport* 9:1987-1990.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11:2295-2322.
- Van der Zee CE, Nielander HB, Vos JP, Lopes da Silva S, Verhaagen J, Oestreicher AB, Schrama LH, Schotman P, Gispen WH (1989) Expression of growth-associated protein B-50 (GAP43) in dorsal root ganglia and sciatic nerve during regenerative sprouting. *J Neurosci* 9:3505-3512.

- Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, Joshi PS, Kantor DB, Newman BA, Mage R, Rader C, Giger RJ (2005) The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci* 25:808-822.
- Vetter IR, Wittinghofer A (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294:1299-1304.
- Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ (1991) Regenerated synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol* 20:940-952.
- Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Perez MP, Thanos S, Aguayo AJ (1987) Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* 7:2894-2909.
- Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ (1988) Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 8:265-280.
- Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ (1993) Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 24:23-36.
- Vorwerk CK, Zurakowski D, McDermott LM, Mawrin C, Dreyer EB (2004) Effects of axonal injury on ganglion cell survival and glutamate homeostasis. *Brain Res Bull* 62:485-490.
- Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z (2002a) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420:74-78.
- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z (2002b) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417:941-944.
- Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M (1999) Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96:771-784.

- Weishaupt JH, Diem R, Kermer P, Krajewski S, Reed JC, Bahr M (2003) Contribution of caspase-8 to apoptosis of axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *Neurobiol Dis* 13:124-135.
- Wennerberg K, Der CJ (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117:1301-1312.
- Winton MJ, Dubreuil CI, Lasko D, Leclerc N, McKerracher L (2002) Characterization of new cell permeable C3-like proteins that inactivate Rho and stimulate neurite outgrowth on inhibitory substrates. *J Biol Chem* 277:32820-32829.
- Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM (2002) A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 5:1302-1308.
- Yakovlev AG, Faden AI (2001) Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. *Mol Neurobiol* 24:131-144.
- Yamada H, Fredette B, Shitara K, Hagihara K, Miura R, Ranscht B, Stallcup WB, Yamaguchi Y (1997) The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *J Neurosci* 17:7784-7795.
- Yamashita T, Tohyama M (2003) The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6:461-467.
- Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M (2002) The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol* 157:565-570.
- Yan Q, Wang J, Matheson CR, Urich JL (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol* 38:382-390.
- Yin L, Schwartzberg P, Scharon-Kersten TM, Staudt L, Lenardo M (1997) Immune responses in mice deficient in Ly-GDI, a lymphoid-specific regulator of Rho GTPases. *Mol Immunol* 34:481-491.
- Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 23:2284-2293.

- Yin Y, Henzl MT, Lorber B, Nakazawa T, Thomas TT, Jiang F, Langer R, Benowitz LI (2006) Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nat Neurosci* 9:843-852.
- Yiu G, He Z (2006) Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 7:617-627.
- Yoles E, Schwartz M (1998a) Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: implications for optic nerve neuropathies. *Exp Neurol* 153:1-7.
- Yoles E, Schwartz M (1998b) Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve. *Arch Ophthalmol* 116:906-910.
- Yoles E, Muller S, Schwartz M (1997) NMDA-receptor antagonist protects neurons from secondary degeneration after partial optic nerve crush. *J Neurotrauma* 14:665-675.
- You SW, So KF, Yip HK (2000) Axonal regeneration of retinal ganglion cells depending on the distance of axotomy in adult hamsters. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3165-3170.
- Yune TY, Chang MJ, Kim SJ, Lee YB, Shin SW, Rhim H, Kim YC, Shin ML, Oh YJ, Han CT, Markelonis GJ, Oh TH (2003) Increased production of tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 20:207-219.
- Zeng BY, Anderson PN, Campbell G, Lieberman AR (1994) Regenerative and other responses to injury in the retinal stump of the optic nerve in adult albino rats: transection of the intraorbital optic nerve. *J Anat* 185 ( Pt 3):643-661.
- Zeng BY, Anderson PN, Campbell G, Lieberman AR (1995) Regenerative and other responses to injury in the retinal stump of the optic nerve in adult albino rats: transection of the intracranial optic nerve. *J Anat* 186 ( Pt 3):495-508.
- Zhang C, Tso MO (2003) Characterization of activated retinal microglia following optic axotomy. *J Neurosci Res* 73:840-845.
- Zhang X, Chen Y, Jenkins LW, Kochanek PM, Clark RS (2005) Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. *Crit Care* 9:66-75.

- Zhang X, Graham SH, Kochanek PM, Marion DW, Nathaniel PD, Watkins SC, Clark RS (2003) Caspase-8 expression and proteolysis in human brain after severe head injury. *FASEB J* 17:1367-1369.
- Zhao ZS, Manser E (2005) PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* 386:201-214.
- Zheng B, Atwal J, Ho C, Case L, He XL, Garcia KC, Steward O, Tessier-Lavigne M (2005) Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1205-1210.

## **Annexe 1 – Article 3 (deuxième auteur) Vaccination stimulates retinal ganglion cell regeneration in the adult optic nerve**

Authors: Benjamin Ellezam, Johanne Bertrand, Pauline Dhergam, and Lisa McKerracher  
Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

### **Contribution à l'article**

Pour cet article, j'ai réalisé toutes les expériences d'immunobuvardages visant à identifier les antigènes associés aux anticorps produits à la suite de la vaccination.

### **Abstract**

We examined whether vaccination of adult rats with spinal cord homogenate (SCH) can promote regeneration of retinal ganglion cells (RGCs) after microcrush lesion of the optic nerve. Injured animals vaccinated with SCH showed axon growth into the optic nerve and such regeneration was not observed in animals vaccinated with liver homogenate (LH). Regeneration was not a consequence of neuroprotection since our vaccine did not protect RGCs from axotomy-induced cell death. Sera of vaccinated animals were tested for antibodies against myelin-associated glycoprotein, NogoA, Nogo-66 receptor, or chondroitin sulphate proteoglycans (CSPG), but no significant levels were detected. Antibodies to myelin basic protein were present in the serum of some SCH-vaccinated

animals. In culture, serum from SCH-vaccinated animals promoted RGC growth on myelin but not on CSPG. Our results show that the effect of the pro-regenerative vaccine is mediated by antibodies to SCH. However, we were not able to detect a significant immune reaction to growth inhibitory proteins, suggesting alternative mechanisms for the success of vaccination to promote regeneration.

## **Introduction**

Injured axons do not successfully regenerate in the adult mammalian optic nerve. Initial attempts at growth, although vigorous, are inevitably abortive (Ramo'n y Cajal, 1991; Selles-Navarro et al., 2001; Zeng et al., 1994). This has been explained by the presence of molecules associated with myelin (reviewed in David and McKerracher, 2000; Huber and Schwab, 2000) and the glial scar (reviewed in Asher et al., 2001). The inhibitory response to these molecules is thought to be a developmentally acquired feature of CNS neurons (Bandtlow and Loschinger, 1997; Cai et al., 2001; Goldberg and Barres, 2000; Li et al., 1995).

Different strategies have been reported to limit growth inhibition and stimulate regeneration in the adult optic nerve. One successful approach has been to replace the environment with a peripheral nerve (PN) graft (Keirstead et al., 1989; Vidal-Sanz et al., 1987; Sauve et al., 2001; Whiteley et al., 1998) or artificial Schwann cell grafts (Negishi et al., 2001). Ideally, however, a strategy should allow axons to grow directly through the CNS terrain. In the



optic nerve, this was achieved by puncturing the lens (Fischer et al., 2000; Leon et al., 2000) or placing PN implants in the vitreous (Berry et al., 1996, 1999), with both methods acting on RGCs at the cell body level. Regeneration of RGCs has also been stimulated by methods aimed directly at the lesion site, such as application of C3 to inhibit Rho signaling (Lehmann et al., 1999), transplantation of macrophages to speed up myelin removal (Lazarov-Spiegler et al., 1996), or treatment with antibodies against myelin inhibitors (Weibel et al., 1994).

We have previously reported the use of a myelin-based vaccine to encourage antibody production and stimulate axon regeneration in the adult mouse spinal cord (Huang et al., 1999). It is known that immunizations with CNS constituents can be associated with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of multiple sclerosis (Owens and Sriram, 1995); however, EAE is only induced when strains of susceptible animals are injected with CNS constituents emulsified in mycobacteria-containing adjuvants (Levine and Wenk, 1961). In fact, when SCH is mixed in mycobacteria-free adjuvant and administered repetitively during a number of weeks, it desensitizes the T cell response to spinal cord proteins and constitutes an effective method to prevent or suppress EAE (Alvord et al., 1965). Interestingly, this injection regimen also leads to elevated antibody titers (Alvord et al., 1965; Lisak et al., 1970) and more recent studies have shown that antibodies obtained through this regimen promote remyelination in animals with chronic EAE (Raine and Traugott, 1983) or virus-induced demyelination (Miller et al., 1994; Rodriguez et al., 1987; Rodriguez and Lennon, 1990). This vaccine

regimen, when applied to adult mice, stimulated spinal cord regeneration (Huang et al., 1999), and sera from immunized mice were able to block myelin-derived growth inhibition *in vitro*, supporting the idea that antibodies mediate this effect. Additional support for an antibody-based response comes from an earlier report that described increased regeneration in rats treated with sera from rabbits immunized with injured rat brain (Geisert and Alley, 1985).

To further validate the vaccine approach and to examine its mode of action, we have tested this immunization regimen in adult rats. First, we examined axon regeneration after microcrush of the optic nerve (Selles-Navarro et al., 2001) by anatomical tracing and quantitative analysis. Then, we examined the antibody response to our vaccination regimen and tested for the presence of antibodies binding to known growth-inhibitory proteins. Furthermore, we tested whether the vaccine could affect regeneration by promoting survival, since more classical immunization methods (that stimulate T cells) have been shown to promote survival of injured RGCs (Fisher et al., 2001; Moalem et al., 1999).

## **Materials and methods**

### **Immunization and surgery**

Spinal cord homogenates and control liver homogenates (LH) used for immunization were prepared by homogenizing 0.5 g adult Sprague–Dawley rat spinal cord

or liver, respectively, in 30 ml phosphate-buffered saline (PBS) and diluting to a protein concentration of 1 mg/ml. Adult female Sprague–Dawley rats (n = 39) were immunized twice weekly with 100 µg of either of these preparations, or with PBS, emulsified with an equal volume of incomplete Freund's adjuvant (IFA; GIBCO-BRL, Burlington, ON) by a subcutaneous injection behind the neck. Optic nerve microcrush lesion was performed 3 weeks after initial immunization as described previously (Selles-Navarro et al., 2001). Briefly, rats were anesthetized with isoflurane (Janssen, Toronto) and the left optic nerve was exposed through a supraorbital approach. The nerve was crushed 1 mm from the globe by holding a tight knot made with a 10-0 suture for 60 s. Rats were given one dose of 0.015 mg/kg buprenorphine (Reckitt & Colman, Richmond, VA) immediately after surgery for analgesia. The two weekly immunizations were continued for another 2 weeks and rats were killed by an overdose injection of chloral hydrate and perfused with 4% paraformaldehyde (PFA).

### **Anterograde labeling and quantification of regeneration**

For qualitative observations on RGC regeneration after vaccination, rats were immunized with either spinal cord homogenate (SCH) (n = 6) or PBS (n = 3) mixed with incomplete Freund's adjuvant. For quantification of regenerated RGC axons, rats were immunized with either SCH (n = 5) or LH (n = 5) as control. All rats received an intravitreal injection of 5 µl 1% CTB (List Biological Labs., Campbell, CA) 24 h before perfusion with PFA. Eyes were dissected, postfixed 1 h in PFA, cryoprotected overnight in

30% sucrose, and frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  in OCT (Canlab, Montreal). Longitudinal cryostat sections of optic nerves were cut at  $14\ \mu\text{m}$  and mounted on Superfrost Plus slides (Fisher, Montreal). Retinal ganglion cell axons were labeled by immunohistochemistry for CTB using a goat anticholeragenoid (List Biological Labs.), a biotinylated rabbit anti-goat (Vector Labs., Burlingame, CA), and DTAF-conjugated streptavidin (Jackson Labs., West Grove, PA) as described previously (Selles-Navarro et al., 2001). Eight to ten sections per animal were examined under fluorescence; photographs were taken with a video camera (Princeton Instruments, Trenton, NJ), and regeneration was quantified by counting the number of axons crossing a line parallel to the lesion site at distances of 50, 100, 250, or  $500\ \mu\text{m}$ . The average number of axons per section was determined for each animal at each distance. The longest axon was also recorded for each animal. Statistical significances were established using Student's *t* test.

### **Retrograde labeling and quantification of survival**

In 15 rats, either untreated ( $n = 5$ ) or immunized with SCH ( $n = 5$ ) or LH ( $n = 5$ ) retinal ganglion cells (RGCs) were labeled by applying 2% Fluorogold (FG) (Fluorochrome, Englewood, CO) to the superior colliculi 7–8 days before optic nerve injury as described previously (Peinado-Ramon et al., 1996). Two weeks after injury, rats were perfused with PFA and the retinas of both eyes were removed and prepared as flattened whole mounts. Mean densities of FG-labeled RGCs were estimated as described (Villegas-Perez et al., 1993). Briefly, RGCs were counted on 12 standard areas located at 1, 2, and 3 mm from the optic disc in each experimental and control retina. To calculate the density of

RGCs per mm<sup>2</sup>, the total number of cells counted on the 12 regions was divided by the total area. Densities for each animal were expressed as percentage RGC survival relative to contralateral unoperated retina.

### **Time course of serum IgG and IgM**

Blood samples were taken twice weekly from five rats undergoing SCH immunization. Serum was isolated and stored at -80°C. Serum IgG and IgM concentrations were measured by sandwich ELISA using a standard protocol with a rat immunoglobulin (Ig) quantitation kit (Bethyl Labs., Montgomery, TX). Briefly, 96-well plates (Maxi-Sorp; Nalge Nunc Intl., Rochester, NY) were coated with a 1/100 dilution of provided anti-rat IgG or IgM, incubated with sera from vaccinated rats diluted to fall in the range of the supplied standards (1:60,000 for IgG; 1:2000 for IgM) and antibody binding was detected with an HRP-conjugated secondary antibody and a TMB color reaction system (Kirkegaard & Perry Labs., Gaithersburg, MD). Immunoglobulin concentration in test sera was measured in duplicate and expressed as a percentage of Ig concentration in preimmune sera.

### **Immunohistochemistry for immunoglobulins**

Optic nerve cryostat sections (cf. above) of 2-week injured rats immunized with SCH (n = 5) or LH (n = 3) were either incubated at room temperature (RT) with an RITC-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson Labs.) or overnight at 4°C with a goat anti-rat IgM

(Bethyl Labs.) followed by 1h at RT with a biotinylated rabbit anti-goat (Vector Labs.) and 1 h at RT with DTAF conjugated streptavidin (Jackson Labs.).

## Western blot analysis

Western blot analysis was performed with sera from the animals used for Ig quantification (n = 5, 21–28 day time points) or with sera collected from optic nerve injured rats (n = 6) at the time of perfusion (5 weeks after commencement of the immunization regimen). Protein samples were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) (7.5% acrylamide), transferred to nitrocellulose membranes, and incubated with sera from SCH-or LH-vaccinated animals overnight at room temperature. Transfer efficiency was verified by Ponceau red staining. Spinal cord protein samples used for electrophoresis were prepared in sample buffer and 50 µg of protein was loaded in each well. Purified native myelin-associated glycoprotein (MAG) was obtained from bovine myelin after extraction in 1% octylglucoside and separation by ion exchange chromatography as described previously (McKerracher et al., 1994). Lysates from COS-7 cells transfected with either control vector, NogoA vector, or Nogo-66 receptor (NgR) vector were prepared in Tris-buffered saline with 1% Triton X-100 as described (Fournier et al., 2001; GrandPre et al., 2000) and were generously provided by D. Strittmatter (Dept. of Neurology, Yale University). A commercial preparation of mixed chondroitin sulphate proteoglycans

(CSPG; Chemicon, Temecula, CA), that includes neurocan, versican, aggrecan, and phosphocan, was digested for 1 h at 37°C with 0.3 U/mg chondroitinase ABC (Sigma, Oakville,

ON) and 4 µg was loaded in each well. Proper digestion of CSPG was detected by Coomassie blue staining. For non-denaturing PAGE (ND-PAGE), proteins prepared in sample buffer lacking β-mercaptoethanol and SDS were separated in SDS-free running buffer at 4°C. After incubation with vaccinated animal sera (diluted 1:150–8000), rat IgG and IgM were detected with either biotinylated or HRP-conjugated secondary antibodies. Several different secondary antibodies were tested for each experiment: an HRP-conjugated goat anti-rat IgM (1:10,000–20,000; Bethyl Labs.), an HRP-conjugated rabbit anti-rat IgG-Fc (1:10,000; Bethyl Labs.), an HRP-conjugated Affinipure rabbit anti-rat IgG+IgM (H+L) (1:10,000–20,000; Jackson Labs.), a biotinylated goat anti-rat IgG+IgM (H+L) (1:5000; Jackson Labs.), a biotinylated polyclonal mouse anti-rat IgG(H+L)(1:5000–15,000; Zymed Labs., San Francisco, CA), and a biotinylated mouse anti-rat IgM (µ chain) (1:1000 – 10,000; Zymed Labs.). Biotin was detected with HRP-conjugated streptavidin (1:5000 – 30,000; Zymed Labs.). For SDS or ND-PAGE, MAG was detected with monoclonal antibodies Gens3 (Nobile-Orazio et al., 1984) or 513 (2 ng/ml; MAB1567; Chemicon), respectively, followed by an HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:100,000 – 300,000; Jackson Labs.). NogoA was detected with a polyclonal antibody (1 µg/ml; Chemicon) followed by an HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10,000; Jackson Labs.). MBP was detected with a rat monoclonal antibody provided by Dr. P. Braun (Dept. of Biochemistry, McGill) (Groome et al., 1986) followed by an HRP-conjugated Affinipure

rabbit anti-rat IgG+IgM (H+L) (1:10,000; Jackson Labs.). Antibody binding was revealed with a chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL). Nonspecific binding of secondary antibodies was closely followed in all experiments, and all blots were submitted to a wide range (1 s to 1 h) of exposure times.

## Cell culture

Primary retinal neurons were isolated from P0 –P3 rats as described previously (Lehmann et al., 1999). Test substrates were prepared by coating eight-well plastic chamber slides (Nalge Nunc Intl.) with 25  $\mu\text{g/ml}$  poly-L-lysine (Sigma) 2 h at 37°C, followed by either 4  $\mu\text{g/chamber}$  purified bovine brain myelin dried overnight at room temperature or 0.25  $\mu\text{g/ml}$  mixed proteoglycans (Chemicon) incubated overnight at 37°C. Slides were incubated with test sera, diluted 1:100 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), for 5 h at 37°C. After washing the slides with serum-free DMEM, dissociated cells were plated and incubated at 37°C. In a separate experiment, dissociated cells were incubated with sera (1:100 in DMEM) for 1.5 h, washed with serum-free DMEM, and plated on untreated myelin-coated chamber slides. In both experiments, slides were fixed 2 days after plating, with 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde, and neurons were identified by immunocytochemistry using a  $\beta$ III tubulin antibody (Sigma). The longest neurite per neuron was measured (Northern Eclipse, Empix Imaging, Mississauga, ON).

## Results



## Regeneration of RGC axons after optic nerve microcrush

In a previous study, we have shown that optic nerve injury by microcrush lesion effectively axotomizes all RGC axons and provides a well-defined lesion site that allows precise measurements of anterogradely labeled axons (Selles-Navarro et al., 2001). Here, we have used the microcrush model to examine the potential of a vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult optic nerve. We immunized Sprague–Dawley rats, a strain with very low susceptibility to EAE (Levine and Wenk, 1961), with a regimen of multiple injections known to stimulate polyreactive antibody production, desensitize T cells reactive to spinal cord self-antigens, and suppress EAE (Alvord et al., 1965; Asakura et al., 1996; Miller et al., 1994). Therefore, we injected rats twice a week for 3 weeks before injuring the optic nerve. We then continued immunizations for another 2 weeks, at which time we analyzed optic nerves for axon regeneration. Intravitreal injection of the anterograde tracer cholera toxin . subunit (CTB), 24 h before perfusion, allowed injured axons to be identified by immunofluorescence. Anterogradely transported CTB does not label spared RGC axons (Ellezam et al., 2002), presumably because it accumulates at nerve terminals in the brain. We only detected few or no axons past the lesion site in animals immunized with the control vaccine (Fig. 1B). In contrast, we detected many axons across the lesion site and into the white matter in animals immunized with the SCH vaccine (Fig. 1A). We counted the number of axons that grew different distances past the lesion site and determined that SCH vaccination significantly enhanced regeneration for distances up to 250  $\mu\text{m}$  (Fig. 2A). We also measured the length of the longest regenerated axon in each

animal. Axons that had regenerated long distances had grown significantly farther in animals vaccinated with SCH as compared to LH controls (Fig. 2B).

### **Antibody reaction following vaccination**

#### Time course of IgG and IgM production

Earlier studies have reported that a regimen of multiple vaccinations with SCH in IFA leads to sustained elevation of serum antibodies in guinea pigs (Alvord et al., 1965; Lisak et al., 1970). We have also shown that, in mice, this vaccine regimen leads to increased levels of serum IgG and IgM, and specifically myelin-reactive antibodies (Huang et al., 1999). To examine the time course of IgG and IgM production, we took blood samples twice a week and tested the isolated serum by ELISA for the concentration of IgG and IgM. We observed a gradual elevation of both IgG and IgM during the first 2 weeks (Fig. 3). Serum levels of IgM decreased thereafter, whereas IgG levels stayed high, continuing to increase after 3 weeks. This shows that, in rats, multiple vaccinations with SCH in IFA leads to elevated serum antibodies and suggests that this elevation is accounted for by both IgG and IgM class antibodies.

#### Antibody binding to spinal cord homogenate and growth-inhibitory proteins

We have previously reported that sera from immunized mice can bind to spinal cord proteins on Western blots (Huang et al., 1999), but the immunoreactive proteins were not identified. To further characterize this immune reaction, we have examined if antibodies in

the sera of vaccinated animals can bind to various known growth-inhibitory proteins in denaturing or non-denaturing conditions. We verified the presence or absence of specific antibodies in the sera with secondary antibodies against rat IgG or IgM. To confirm results, experiments were repeated with secondary antibodies from a number of sources. By SDS-PAGE, we have tested MAG, recombinant NogoA, CSPG, MBP, and full SCH. While serum IgG (Fig. 4A) and IgM (data not shown) bound to several spinal cord proteins, they did not bind to MAG (Fig. 4B) nor CSPG (Fig. 4C). Moreover, serum IgG (Fig. 4D) or IgM (data not shown) detected two major bands in extracts of COS-7 cells used to produce NogoA but did not detect an ~180-kDa band characteristic of NogoA (Fig. 4D) (GrandPre et al., 2000). In contrast, the sera of some SCH-treated animals contained high amounts of antibodies against MBP (Figs. 4E and 5), whereas no such antibodies were detected in LH-treated controls. In sera of LH-treated controls, some IgG (Fig. 4A) and IgM (data not shown) bound to spinal cord proteins but they showed different binding patterns than sera from SCH-vaccinated animals. Since SCH-vaccinated animals were immunized with full SCH, which contains neuronal antigens, we also tested for the presence of antibodies against NgR. In cell lysates containing recombinant NgR, two COS-7 proteins were detected by IgG from the sera of SCH-treated rats but no band was detected at ~70 kDa, the apparent molecular weight of NgR (Fournier et al., 2001).

Since the polyclonal antibodies produced by our immunization protocol might not bind to certain protein epitopes after denaturation and separation by SDS-PAGE, we also tested the sera on MAG, NogoA, and NgR in non-denaturing electrophoresis conditions and by ELISA. On non-denaturing Western blots, MAG was detected with the 513 MAG

antibody (Fig. 4F). However, a similar band could not be detected by either rat IgG- or IgM-specific secondary antibodies after incubation with sera of SCH-treated animals (Fig. 4F). On non-denaturing preparations of cell lysates containing either recombinant NogoA, NgR, or the vector alone, all band patterns were similar, suggesting unspecific binding of serum antibodies to the COS-7 cell preparation (Fig. 4G). The band obtained after incubation with a polyclonal NogoA antibody could not be detected in blots incubated with sera (Fig. 4G).

To further our analysis of serum antibodies, we measured binding of IgG and IgM to full SCH or more specifically to CSPG, MAG, NogoA, NgR, and MBP by indirect ELISA. Not surprisingly, sera from SCH-treated animals contained more antibodies binding to full SCH than sera from LH-treated animals or preimmune serum (Fig. 5). As for specific antigens, serum from three of the five SCH-treated animals analyzed contained highly increased concentrations of MBP antibodies compared to control sera. In contrast, detection of antibodies to CSPG, MAG, NogoA, and NgR after treatment with SCH was not significantly different from that observed with LH or preimmune sera. These results show that the vaccination protocol does not lead to the production of detectable amounts of antibodies against known growth-inhibitory proteins of myelin or the glial scar, although antibodies against MBP, one of the major myelin proteins, were detected.

Antibody binding in the optic nerve

We have previously reported the detection of more intense Ig binding in the spinal cord of injured mice vaccinated with SCH compared to that in injured mice treated with adjuvant alone (Huang et al., 1999). To determine the extent of antibody penetration in the microcrushed optic nerve, and to examine whether vaccination with SCH caused more antibodies to bind to the optic nerve matrix than control vaccinations with LH, we processed optic nerve sections for immunofluorescent detection of IgG and IgM. We found that penetration and binding of IgG in optic nerve were similar in SCH-vaccinated (Fig. 6A) and LH-vaccinated rats (Fig. 6B). The same was true for IgM (data not shown). Antibody penetration and binding was highest at the lesion site and gradually decreased over an ~1-mm distance (Fig. 6A and B).

### **Effect of SCH antiserum on RGC neurite outgrowth**

We have previously shown that serum from SCH-treated mice promotes neurite outgrowth on myelin substrates in vitro and that this effect is lost when antibodies are depleted from the serum (Huang et al., 1999). To determine if antibodies from SCH-treated rats promote RGC neurite outgrowth on inhibitory substrates in vitro, and to further understand how antibodies exert that effect, we examined how SCH antiserum affects neurite outgrowth on different inhibitory substrates. Thus, before plating RGCs, we preincubated myelin or CSPG substrates with either SCH antiserum or control sera. Consistent with our previous results (Huang et al., 1999), pretreatment of myelin substrates with SCH antiserum blocked growth inhibition while control sera had no effect (Fig. 7). Pretreatment of CSPG substrates with the same SCH antisera did not block growth

inhibition, supporting our finding from Western blots and ELISA that SCH antisera is not enriched in antibodies that recognize CSPG. To examine whether a direct interaction of serum antibodies with neurons could precede binding to myelin components and stimulate growth, we incubated RGCs with SCH antiserum, washed away the antiserum with media, and plated cells on myelin or CSPG substrates (data not shown). This treatment did not block growth inhibition. These results suggest that antibody binding to myelin instead of axonal components is necessary to promote growth.

### **RGC survival after optic nerve microcrush**

Previous studies have shown that, in susceptible strains of mice or rats, a classical active immunization protocol (i.e., an initial injection plus a booster 1 week later), with CNS constituents emulsified in a mycobacteria-supplemented adjuvant, can increase RGC survival after severe (Fisher et al., 2001) optic nerve crush. This led us to test whether survival of RGCs, after complete axotomy by optic nerve microcrush, is also increased in animals vaccinated following our protocol. In animals undergoing vaccination, we retrogradely labeled RGCs by applying Fluorogold to the superior colliculi, and a week later performed an optic nerve microcrush lesion. We examined the retinas 2 weeks after optic nerve crush. Cell counting in both the left, operated retina, and the right, control retina, allowed us to express survival of injured RGC as a percentage of cell density in the contralateral uninjured eye (Fig. 8). Two weeks after crush alone, only 10% ( $\pm 1\%$ ) RGC survived. Similarly, in animals that were vaccinated, the average survival rate was 10% ( $\pm 1\%$ ) for LH controls and 8% ( $\pm 1\%$ ) for rats treated with SCH. The slightly inferior

average survival rate in SCH-treated animals was not statistically significant ( $P > 0.5$ ).

This demonstrates that immunization with SCH following our vaccination protocol does not lead to increased cell survival after axotomy.

## **Discussion**

We show here that repeated vaccination with homogenized spinal cord promotes axon regeneration in the adult optic nerve. However, contrary to our initial hypothesis (Huang et al., 1999), our present results suggest that this effect on regeneration is not mediated by antibodies against growth-inhibitory proteins. Furthermore, comparison between vaccination with SCH and LH suggest that antibodies to major myelin proteins, such as MBP, might contribute to the efficacy of the vaccine.

We have previously reported the use of a SCH vaccine to stimulate regeneration of the corticospinal tract in adult mice (Huang et al., 1999). In those experiments, immunized animals had elevated serum levels of IgG and IgM, and a higher concentration of circulating myelin-reactive antibodies compared to controls, results consistent with the sustained elevation in antibody titers described in the original studies on this vaccination protocol and its EAE-suppressing properties (Alvord et al., 1965; Lisak et al., 1970). Here, we show that immunizing rats with SCH leads to a gradual increase in both IgG and IgM, with IgM levels peaking at 2 weeks and IgG levels still increasing after 3 weeks. We show

further that serum antibodies bind spinal cord extracts on Western blot and by ELISA.

We have shown previously (Huang et al., 1999) and support here that antibodies obtained through this protocol also bind to white matter *in vivo* and overcome growth inhibition on myelin *in vitro*, indicating that the effect on regeneration is antibody-mediated.

Because we initially hypothesized that the effect of vaccination on regeneration was mediated by antibodies against growth-inhibitory proteins, and because sera from SCH immunized mice blocked myelin-derived growth inhibition *in vitro*, we tested the sera of SCH rats for the presence of antibodies against myelin inhibitors. Surprisingly, we could not detect MAG or Nogo-A antibodies from these rats, either on Western blot or by ELISA. To test whether antibodies were directed at inhibitors associated with the glial scar, we examined the serum of SCH-treated rats for antibodies against CSPG. It is known that some CSPG are expressed at basal levels in the adult spinal cord (Jones et al., 2002a; Pindzola et al., 1993; Wang et al., 1997), and therefore immunizing with full SCH could stimulate the production of antibodies against CSPG. Nevertheless, antibodies against CSPG were not detected in the serum of SCH-treated rats, and immune sera did not promote neurite outgrowth on CSPG substrate.

How then can we explain the better regeneration seen in rats vaccinated with SCH, and the better neurite outgrowth on myelin substrates pretreated with SCH antiserum? Since SCH also includes many neuronal antigens, the effect of the SCH vaccine could be mediated by antibodies against neuronal epitopes, such as receptors for growth-inhibitory



molecules. Glycosylated extracellular portions of receptor molecules are known to be very immunogenic. Antibodies might stimulate axonal growth by acting as ligands or by helping dimerize receptor tyrosine kinases. Application of antibody IN-1 was recently shown to induce sprouting in uninjured adult central neurons (Buffo et al., 2000), supporting the concept that antibodies may stimulate growth by acting on neurons directly. Our results show no detectable amounts of NgR antibodies in the serum of immunized rats, but we did not examine immunoreaction to other receptors. Preincubating RGCs with SCH antiserum before plating them on myelin did not affect growth inhibition, which suggests that antibodies do not block receptors for inhibitory molecules. These experiments cannot rule out the possibility that serum antibodies help dimerize receptors that promote neurite outgrowth. However, if antibodies acted directly on neurons, SCH antiserum would have been expected to overcome growth inhibition similarly on both myelin and CSPG substrates.

While immunization with SCH did not lead to detectable levels of antibodies against known growth inhibitors, it did lead to high titers of antibodies against MBP in some rats. This is actually not surprising since MBP constitutes 35% of CNS myelin (Quarles et al., 1997), while MAG and NogoA are minor components. Thus, it is possible that antibodies produced to the most abundant myelin proteins contribute to changing the optic nerve to a more favorable growth substrate. Antimyelin antibodies might first bind myelin and then interact with neurons through membrane receptors to stimulate growth. Alternatively, antibodies bound to myelin proteins could simply provide an artificial

growth-permissive substrate. We have shown here that large quantities of serum IgG and IgM leak from the compromised blood brain barrier and are retained in lesioned optic nerve, potentially acting as substrate. Although there was an overall similar antibody penetration in SCH-and LH-treated rats, in contrast to the increased penetration of antibodies described in mice vaccinated with SCH compared to adjuvant alone (Huang et al., 1999), only SCH-treated rats demonstrated regeneration. Together, our results indicate that myelin components, perhaps including lipids, are important for a pro-regenerative vaccine.

Although vaccination with SCH stimulated significant regeneration across the lesion site, few axons regenerated long distances in the optic nerve white matter compared to what was observed in mouse spinal cord (Huang et al., 1999). This is consistent with a previous study that showed a given regenerative strategy can lead to axon growth distances almost one order of magnitude longer in the spinal cord compared to optic nerve (Bartsch et al., 1995). Interestingly, the longest regenerated axon in SCH-treated rats was detected at  $\approx 1$  mm from the lesion site, a distance that corresponds to the range of Ig infiltration in the optic nerve. Therefore, the limited permeability of the optic nerve far from the lesion site might hinder the penetration of reactive antibodies and thus limit their effect. Moreover, it is known that in all optic nerve lesion paradigms the number of RGCs available for growth-promoting treatment falls very quickly after axotomy (Villegas-Perez et al., 1993). Here, we have shown that a microcrush lesion of the optic nerve leads to the death of  $\sim 90\%$  RGCs by 2 weeks, and the cell death was not prevented by vaccination with SCH.

Schwartz and colleagues have shown that a vaccination with myelin-derived peptides can lead to neuroprotection of axotomized RGCs (Fisher et al., 2001). They used a conventional immunization protocol, with mycobacteria-containing complete Freund's adjuvant, to sensitize T cells reactive to CNS autoantigens. Activated T cells were thought to mediate the vaccine's effect on RGC survival (Fisher et al., 2001; Yoles et al., 2001). However, new experiments with transgenic mice overexpressing CNS-reactive T cells have now raised the question whether those cells actually afford any neuroprotection (Jones et al., 2002b). Our repetitive vaccine protocol with SCH in a mycobacteria-free adjuvant was designed to desensitize T cells reactive to CNS proteins (Alvord et al., 1965). We show here that our SCH vaccine does not stimulate RGC survival. Another difference between the two vaccination protocols is their different influence on regeneration. While we reported previously (Huang et al., 1999), and confirm here, that our repeated vaccination protocol stimulates regeneration, the protocol used by Schwartz and colleagues was not reported to affect fiber regeneration.

The relationship between neuronal regeneration and survival is not fully understood (Goldberg and Barres, 2000). However, recent studies suggest that supporting survival alone is not sufficient to promote axon regeneration. For example, in mice overexpressing the antiapoptotic bcl-2, RGC survival after axotomy is remarkable, yet spontaneous axon regeneration does not occur (Chierzi et al., 1999) and PN graft-induced regeneration is not enhanced compared to wild-type mice (Inoue et al., 2002). On the other hand, whether stimulating regeneration at the level of the cut axon is sufficient to promote cell survival in

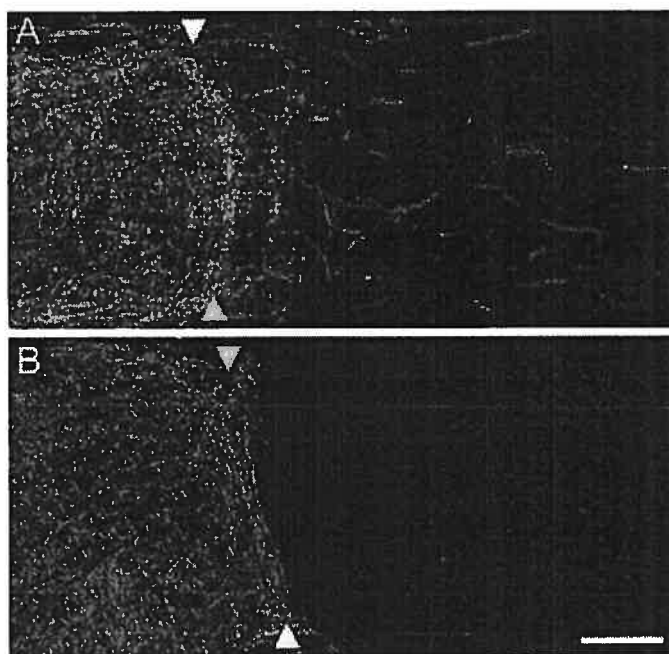
the retina has not been carefully studied. Our results show that stimulating regeneration of cut axons by vaccination is not sufficient to promote RGC survival. Thus, the limited regeneration we observed following vaccination might be enhanced by combining the pro-regenerative vaccine with pro-survival agents.

## **Acknowledgements**

The authors thank Dr. S. Strittmatter and T. GrandPre (Yale University) for the generous gift of recombinant NogoA and NgR. L.M. especially thanks Dr. Moses Rodriguez (Mayo Clinic) for stimulating discussions on polyreactive antibodies, at the Altschul Symposium (1996) and afterward, that led to the design of the vaccine approach to stimulate CNS regeneration. We also thank Charles Essagian for excellent technical help, I. Selles-Navarro (U.Murcia, Spain) for initiating early experiments, M. Aviles-Trigueros (U. Alicante, Spain) for contributions to these early experiments, and Dr. Peter Braun (McGill University) for discussions and provision of MBP antibody. This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research and a Quebec FCAR-FRSQ scholarship (B.E.).

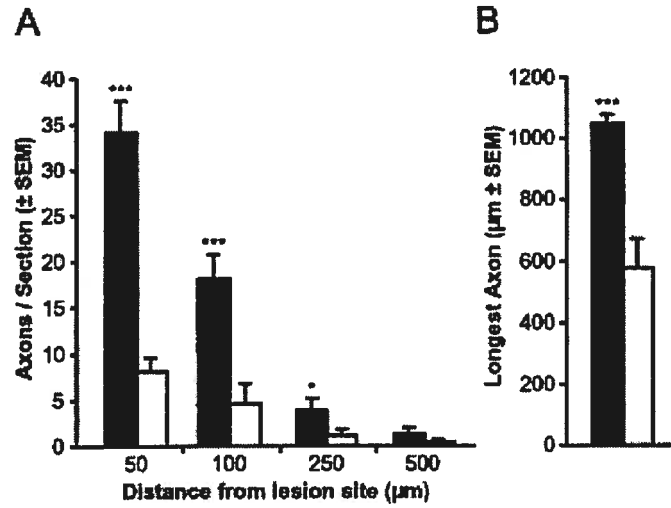
## Figures

**Figure 1. Vaccination with SCH stimulates axon regeneration in the adult rat optic nerve.**



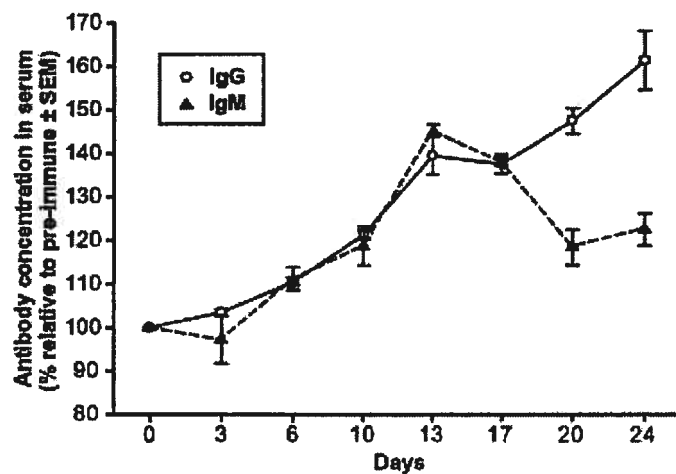
**Figure 1. Vaccination with SCH stimulates axon regeneration in the adult rat optic nerve.** (A) Longitudinal section of optic nerve from a SCH-treated rat, showing microcrush lesion site (arrowheads) and anterogradely labeled axons regenerating across the lesion and into white matter. (B) Section from a control LH-treated rat, showing no axon regeneration past the lesion site. (A) and (B) Two weeks after injury. Bar, 100  $\mu$ m.

**Figure 2. The SCH vaccine significantly enhances extent of regeneration.**



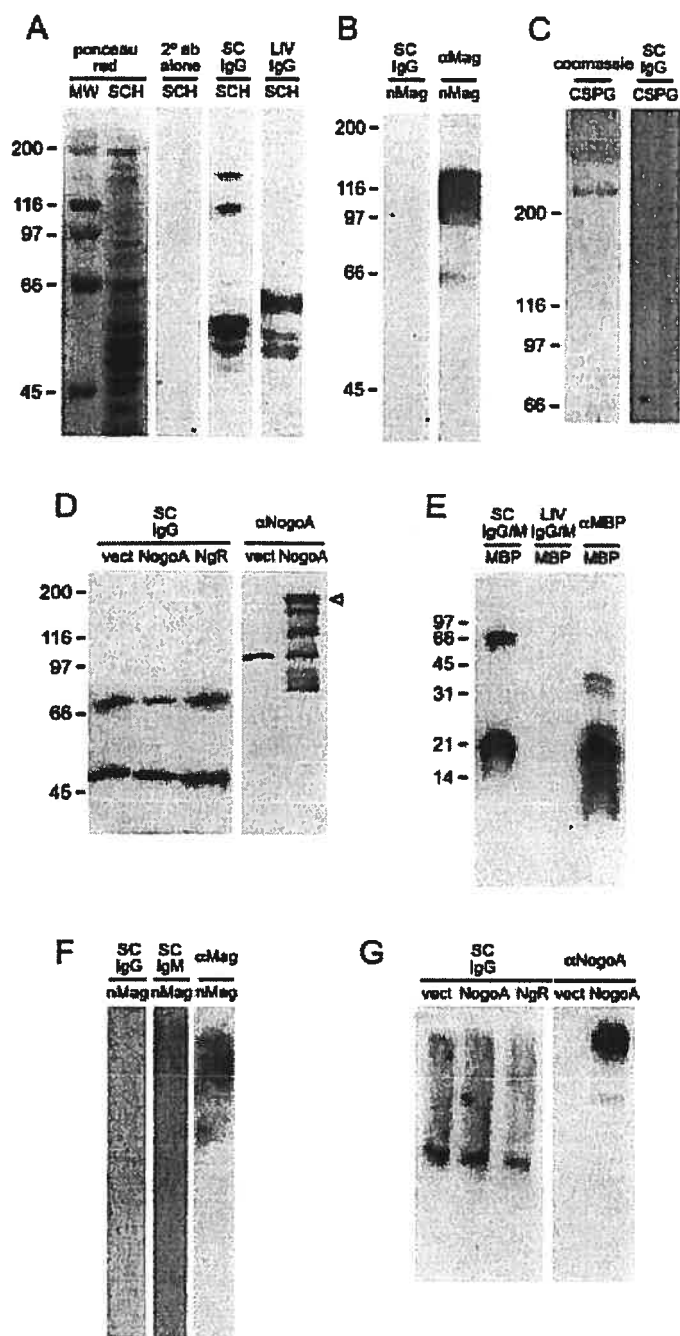
**Figure 2. The SCH vaccine significantly enhances extent of regeneration.** (A) Average number of axons crossing a virtual line at different distances from the microcrush site on optic nerve sections from rats immunized with (black) SCH or (white) LH. Stars indicate statistically significant differences from controls. (B) Average distance regenerated by longest measured axon. (\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; unpaired t test).

**Figure 3. Vaccination with SCH gradually leads to elevated serum immunoglobulins.**



**Figure 3. Vaccination with SCH gradually leads to elevated serum immunoglobulins.** Time course of average increases in serum concentrations of (white circle) IgG and (black triangle) IgM, in rats undergoing immunization with SCH compared to preimmune serum. Concentrations were measured by quantitative sandwich ELISA.

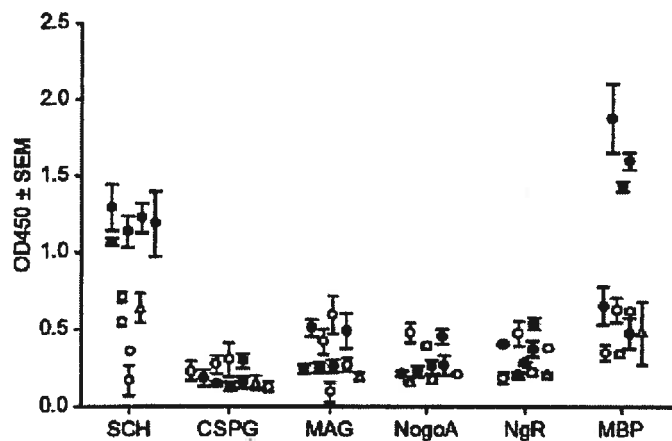
**Figure 4. Antibodies against known growth-inhibitory proteins are not detected in animals vaccinated with SCH.**





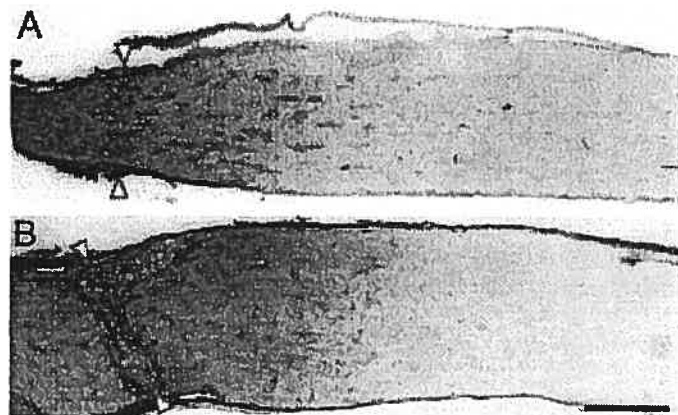
**Figure 4. Antibodies against known growth-inhibitory proteins are not detected in animals vaccinated with SCH.** (A) Western blot showing, from left to right, molecular weight markers, full SCH stained with ponceau red, and full SCH incubated with an HRP-conjugated anti-rat IgG either without serum, as control, or with serum from a rat vaccinated with SCH or LH, respectively. (B) Western blot of purified native MAG after incubation with (left lane) serum from a SCH-treated rat (1:1000) and an anti-rat IgG or with (right lane) MAG monoclonal antibody Gens3. (C) (left) Coomassie blue staining of a chondroitinase-digested CSPG mix following SDS-PAGE, and (right) Western blot of transferred CSPG after incubation with serum from a SCH-treated rat (1:1000) and an anti-rat IgG. (D) (left-hand blot) Western blot of CHO cell lysates containing (left) vector alone, (middle) recombinant NogoA, and (right) recombinant NgR, after incubation with serum from a SCH-treated rat (1:1000) and an anti-rat IgG. Right-hand blot shows (left) vector alone and (right) recombinant NogoA, after incubation with a NogoA antibody. NogoA migrates as an ~180-kDa band (GrandPre et al., 2000) and NgR as a doublet at 70 kDa (Fournier et al., 2001). (E) Western blot of bovine MBP after incubation with serum from a rat treated with (left) SCH or (middle) LH, followed by an anti-rat IgG+IgM, or with (right) an MBP antibody. (F) Western blot of purified native MAG following ND-PAGE, after incubation with (left and middle) serum from a SCH-treated rat (1:500) and either an anti-rat (left) IgG or (middle) IgM, or with (right) MAG antibody 513. (G) (left-hand blot) Western blot following ND-PAGE of COS-7 cell lysates containing (left) vector alone, (middle) recombinant NogoA, and (right) recombinant NgR, shown after incubation with serum from a SCH-treated rat (1:500) and an anti-rat IgG. Right-hand blot shows (left) vector alone and (right) recombinant NogoA, after incubation with a NogoA antibody. Molecular weight standards (MW) in kDa are on the left. SC IgG, serum IgG from SCH-treated rats; SC IgM, serum IgM from SCH-treated rats; LIV IgG, serum IgG from LH-treated rats; nMAG, purified native MAG;  $\alpha$ MAG, MAG antibody; vect, vector; exp, ECL exposure time.

**Figure 5. Antibodies produced by SCH-treated rats bind to full SCH and MBP but not to known growth-inhibitory proteins.**



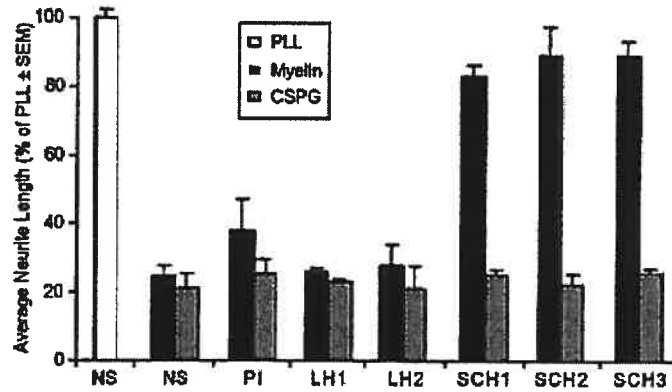
**Figure 5. Antibodies produced by SCH-treated rats bind to full SCH and MBP but not to known growth-inhibitory proteins.** Average indirect ELISA measurements of antibodies binding to total SCH, CSPG, MAG, NogoA, NgR, or MBP, in serum of rats treated with (closed circles) SCH or (open circles) LH, or in (open triangles) preimmune serum. Each symbol shows average result for individual animals, with two separate experiments per serum sample.

**Figure 6. Vaccinating with either SCH or LH does not lead to significantly different patterns of antibody binding in the injured optic nerve.**



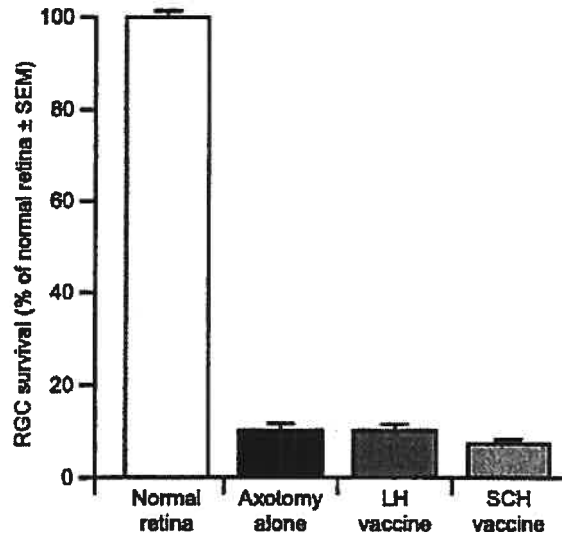
**Figure 6. Vaccinating with either SCH or LH does not lead to significantly different patterns of antibody binding in the injured optic nerve. (A and B) Longitudinal section of optic nerve immunostained for IgGs, 2 weeks after microcrush and immunization with (A) SCH or (B) LH. Antibody binding is maximal on the lesion site (arrowheads) and gradually decreases over a distance of ~1 mm. Bar, 250  $\mu$ m.**

**Figure 7. Serum from SCH vaccinated animals blocks neurite growth inhibition on myelin but not on CSPG.**



**Figure 7. Serum from SCH vaccinated animals blocks neurite growth inhibition on myelin but not on CSPG.** Average RGC neurite length 48 h after culture on substrates of (white) poly-L-lysine, (black) purified myelin, or (gray) mixed CSPG previously incubated with serum from animals treated with (SCH1–SCH3) SCH or (LH1–LH2) LH, with (PI) preimmune serum, or with (NS) serum-free culture media. On myelin, neurite length was significantly greater when substrates were preincubated with SCH antiserum compared to control sera ( $P < 0.01$ ; unpaired t test).

**Figure 8. Vaccination with SCH does not increase survival of RGCs after axotomy.**



**Figure 8. Vaccination with SCH does not increase survival of RGCs after axotomy.** Average rate of RGC survival 2 weeks after optic nerve micro-crush in (white) intact right retinas and in left retinas of rats left (black) untreated or treated with a (dark gray) LH or (pale gray) SCH vaccine. The average cell density was  $2377 \pm 41$  RGC/mm<sup>2</sup> in unoperated eyes, and  $250 \pm 29$  RGC/mm<sup>2</sup> in axotomized eyes.

## References

- Alvord, E.C., Shaw, C.-M., Hruby, S., Kies, M.W., 1965. Encephalitogeninduced inhibition of experimental allergic encephalomyelitis: prevention, suppression and therapy. *Ann. NY Acad. Sci.* 122, 333–345.
- Asakura, K., Pogulis, R.J., Pease, L.R., Rodriguez, M., 1996. A monoclonal autoantibody which promotes central nervous system remyelination is highly polyreactive to multiple known and novel antigens. *J. Neuroimmunol.* 65 (1), 11–19.
- Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Moon, L.D., Fawcett, J.W., 2001. Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog. Brain Res.* 132, 611–619.
- Bandtlow, C.E., Loschinger, J., 1997. Developmental changes in neuronal responsiveness to the CNS myelin-associated neurite growth inhibitor NI-35/250. *Eur. J. Neurosci.* 9 (12), 2743–2752.
- Bartsch, U., Bandtlow, C.E., Schnell, L., Bartsch, S., Spillmann, A.A., Rubin, B.P., Hillenbrand, R., Montag, D., Schwab, M.E., Schachner, M., 1995. Lack of evidence that myelin-associated glycoprotein is a major inhibitor of axonal regeneration in the CNS. *Neuron* 15, 1375–1381.
- Berry, M., Carlile, J., Hunter, A., 1996. Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. *J. Neurocytol.* 25, 147–170.
- Berry, M., Carlile, J., Hunter, A., Tsang, W., Rosustrel, P., Sievers, J., 1999. Optic nerve regeneration after intravitreal peripheral nerve implants: trajectories of axons

regrowing through the optic chiasm into the optic tracts. *J. Neurocytol.* 28 (9), 721–741.

- Buffo, A., Zagrebelsky, M., Huber, A.B., Skerra, A., Schwab, M.E., Strata, P., Rossi, F., 2000. Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured purkinje cell axons. *J. Neurosci.* 20 (6), 2275–2286.
- Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B.S., Filbin, M.T., 2001. Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J. Neurosci.* 21 (13), 4731–4739.
- Chierzi, S., Strettoi, E., Cenni, M.C., Maffei, L., 1999. Optic nerve crush: axonal responses in wild-type and bcl-2 transgenic mice. *J. Neurosci.* 19 (19), 8367–8376.
- David, S., McKerracher, L., 2000. Inhibition of axon growth by myelin-associated glycoprotein, in: Ingoglia, N.A., Murray, M. (Eds.), *Axonal Regeneration in the Central Nervous System*, Marcel Dekker, New York, pp. 425–446.
- Ellezam, B., Dubreuil, C., Winton, M., Loy, L., Dergham, P., Selles-Navarro, I., McKerracher, L., 2002. Inactivation of intracellular Rho to stimulate axon growth and regeneration. *Prog. Brain Res.* 137, 369–378.
- Fischer, D., Pavlidis, M., Thanos, S., 2000. Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (12), 3943–3954.
- Fisher, J., Levkovitch-Verbin, H., Schori, H., Yoles, E., Butovsky, O., Kaye, J.F., Ben-Nun, A., Schwartz, M., 2001. Vaccination for neuroprotection in the mouse optic nerve: implications for optic neuropathies. *J. Neurosci.* 21 (1), 136–142.

- Fournier, A.E., GrandPre, T., Strittmatter, S.M., 2001. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409 (6818), 341–346.
- Geisert, E.E., Alley, C.D., 1985. Antiserum-induced growth of axons across lesions of the adult rat brain. *Brain Res. Bull.* 15 (1), 19–28.
- Goldberg, J.L., Barres, B.A., 2000. The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 579–612.
- GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T., Strittmatter, S.M., 2000. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403 (6768), 439–444.
- Groome, N.P., Dawkes, A., Gales, M., Hruby, S., Alvord, E.C., Jr., 1986. Region-specific immunoassays for human myelin basic protein. *J. Neuroimmunol.* 12 (4), 253–264.
- Huang, D.W., McKerracher, L., Braun, P.E., David, S., 1999. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 24 (3), 639–647.
- Huber, A.B., Schwab, M.E., 2000. Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol. Chem.* 381 (5–6), 407–419.
- Inoue, T., Hosokawa, M., Morigiwa, K., Ohashi, Y., Fukuda, Y., 2002. Bcl-2 overexpression does not enhance in vivo axonal regeneration of retinal ganglion cells after peripheral nerve transplantation in adult mice. *J. Neurosci.* 22 (11), 4468–4477.
- Jones, L.L., Yamaguchi, Y., Stallcup, W.B., Tuszynski, M.H., 2002a. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci.* 22 (7), 2792–2803.
- Jones, T.B., Basso, D.M., Sodhi, A., Pan, J.Z., Hart, R.P., MacCallum, R.C., Lee, S., Whitacre, C.C., Popovich, P.G., 2002b. Pathological CNS autoimmune disease



triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *J. Neurosci.* 22 (7), 2690–2700.

- Keirstead, S.A., Rasminsky, M., Fukuda, Y., Carter, D.A., Aguayo, A.J., Vidal-Sanz, M., 1989. Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. *Science* 246 (4927), 255–257.
- Lazarov-Spiegler, O., Solomon, A., Zeev-Bran, A.B., Hirschberg, D.L., Lavie, V., Schwartz, M., 1996. Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB. J.* 110, 1296–1302.
- Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., McKerracher, L., 1999. Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J. Neurosci.* 19 (17), 7537–7547.
- Leon, S., Yin, Y., Nguyen, J., Irwin, N., Benowitz, L.I., 2000. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J. Neurosci.* 20 (12), 4615–4626.
- Levine, S., Wenk, M.A., 1961. Studies on the mechanism of altered susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 39, 419–441.
- Li, D., Field, P.M., Raisman, G., 1995. Failure of axon regeneration in postnatal rat entorhinohippocampal slice coculture is due to maturation of the axon, not that of the pathway or target. *Eur. J. Neurosci.* 7 (6), 1164–1171.
- Lisak, R.P., Falk, G.A., Heinze, R.G., Kies, M.W., Alvord, E.C., 1970. Dissociation of antibody production from disease suppression in the inhibition of allergic encephalomyelitis by myelin basic protein. *J. Immunol.* 104 (6), 1435–1446.
- McKerracher, L., David, S., Jackson, J.L., Kottis, V., Dunn, R., Braun, P.E., 1994. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite outgrowth. *Neuron* 13 (4), 805–811.

- Miller, D.J., Sanborn, K.S., Katzmann, J.A., Rodriguez, M., 1994. Monoclonal autoantibodies promote central nervous system repair in an animal model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 14 (10), 6230–6238.
- Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I.R., Schwartz, M., 1999. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* 5 (1), 49-55.
- Negishi, H., Dezawa, M., Oshitari, T., Adachi-Usami, E., 2001. Optic nerve regeneration within artificial Schwann cell graft in the adult rat. *Brain Res. Bull.* 55 (3), 409 – 419.
- Nobile-Orazio, E., Hays, A.P., Latov, N., Perman, G., Golier, J., Shy, M.E., Freddo, L., 1984. Specificity of mouse and human monoclonal antibodies to myelin-associated glycoprotein. *Neurology* 34 (10), 1336–1342.
- Owens, T., Sriram, S., 1995. The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis. *Neurol. Clin.* 13 (1), 51–73.
- Peinado-Ramon, P., Salvador, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 1996. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. *J. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 489–500.
- Pindzola, R.R., Doller, C., Silver, J., 1993. Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions. *Dev. Biol.* 156 (1), 34–48.
- Quarles, R.H., Farrer, R.G., Yim, S.H., 1997. Structure and function of myelin, an extended and biochemically modified cell surface membrane, in: Juurlink, B.H.J., Devon, R.M., Doucette, J.R., Nazarali, A.J., Schreyer, D.J., Verge, V.M.K. (Eds.), *Cell Biology and Pathology of Myelin: Evolving Biological Concepts and Therapeutic Approaches*, Plenum Press, New York, pp. 1–12.

- Raine, C.S., Traugott, U., 1983. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. Ultrastructure of the central nervous system of animals treated with combinations of myelin components. *Lab. Invest.* 48 (3), 275–284.
- Ramo'n y Cajal, S., 1991. *Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system*/translated by Raoul M. May; with an introduction and additional translations by Javier DeFelipe and Edward G. Jones. Oxford Univ. Press, New York.
- Rodriguez, M., Lennon, V.A., 1990. Immunoglobulins promote remyelination in the central nervous system. *Ann. Neurol.* 27 (1), 12–17.
- Rodriguez, M., Oleszak, E., Leibowitz, J., 1987. Theiler's murine encephalomyelitis: a model of demyelination and persistence of virus. *Crit. Rev. Immunol.* 7 (4), 325–365.
- Sauve, Y., Sawai, H., Rasminsky, M., 2001. Topological specificity in reinnervation of the superior colliculus by regenerated retinal ganglion cell axons in adult hamsters. *J. Neurosci.* 21 (3), 951–960.
- Selles-Navarro, I., Ellezam, B., Fajardo, R., Latour, M., McKerracher, L., 2001. Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a micro-crush lesion of adult rat optic nerve. *Exp. Neurol.* 167 (2), 282–289.
- Vidal-Sanz, M., Bray, G.M., Villegas-Perez, M.P., Thanos, S., Aguayo, A.J., 1987. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J. Neurosci.* 7 (9), 2894–2909.
- Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1993. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.* 24 (1), 23–36.

- Wang, X., Messing, A., David, S., 1997. Axonal and nonneuronal cell responses to spinal cord injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein. *Exp. Neurol.* 148 (2), 568–576.
- Weibel, D., Cadelli, D., Schwab, M.E., 1994. Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain Res.* 642, 259–266.
- Whiteley, S.J., Sauve, Y., Aviles-Trigueros, M., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., 1998. Extent and duration of recovered pupillary light reflex following retinal ganglion cell axon regeneration through peripheral nerve grafts directed to the pretectum in adult rats. *Exp. Neurol.* 154 (2), 560–572.
- Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, I.R., Weiner, H., Schwartz, M., 2001. Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J. Neurosci.* 21 (11), 3740–3748.
- Zeng, B.Y., Anderson, P.N., Campbell, G., Lieberman, A.R., 1994. Regenerative and other responses to injury in the retinal stump of the optic nerve in adult albino rats: transection of the intraorbital optic nerve. *J. Anat.* 185 (Pt 3), 643–661.

## Annexe 2 – Accord des co-auteurs pour Article 1

### Accord des co-auteurs

Nous acceptons que l'article suivant soit inclus dans la thèse de doctorat de Johanne Bertrand, étudiante au PhD en Sciences Neurologiques (3-530-1-0), qui a pour titre « Stimulation de la survie et de la régénération des cellules ganglionnaires de la rétine par inactivation de la GTPase R<sub>o</sub> après lésion du nerf optique du rat adulte ».

Titre de l'article : Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats

Publié dans Journal of Neuroscience (2005) 25(5):1113-1121

Mathew J. Winton Signature : \_\_\_\_\_

Nieves Rodriguez-Hernandez Signat \_\_\_\_\_

Robert B. Campenot Signature : \_\_\_\_\_

Lisa McKerracher Signa \_\_\_\_\_

10/24/2008 08:49 FAX

002/002

Accord des co-auteurs

Nous acceptons que l'article suivant soit inclus dans la thèse de doctorat de Johanne Bertrand, étudiante au PhD en Sciences Neurologiques (3-530-1-0), qui a pour titre « Stimulation de la survie et de la régénération des cellules ganglionnaires de la rétine par inactivation de la GTPase Rho après lésion du nerf optique du rat adulte ».

Titre de l'article : Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats

Publié dans Journal of Neuroscience (2005) 25(5):1113-1121

Matthew J. Winton

Signature : 

Nieves Rodriguez-Hernandez. Signature : \_\_\_\_\_

Robert B. Campenot

Signature : \_\_\_\_\_

Lisa McKerracher

Signature : \_\_\_\_\_

Accord des co-auteurs

Nous acceptons que l'article suivant soit inclus dans la thèse de doctorat de Johanne Bertrand, étudiante au PhD en Sciences Neurologiques (3-530-1-0), qui a pour titre « Stimulation de la survie et de la régénération des cellules ganglionnaires de la rétine par inactivation de la GTPase Ro après lésion du nerf optique du rat adulte ».

Titre de l'article : Application of Rho antagonist to neuronal cell bodies promotes neurite growth in compartmented cultures and regeneration of retinal ganglion cell axons in the optic nerve of adult rats

Publié dans Journal of Neuroscience (2005) 25(5):1113-1121

Matthew J. Winton Signature : \_\_\_\_\_

Nieves Rodriguez-Hernandez Signature : \_\_\_\_\_

Robert B. Campenot Signature : \_\_\_\_\_

Lisa McKerracher Signature : \_\_\_\_\_

## Annexe 3 – Accord des co-auteurs pour Article 2

### Accord des co-auteurs

Nous acceptons que l'article suivant soit inclus dans la thèse de doctorat de Johanne Bertrand, étudiante au PhD en Sciences Neurologiques (3-530-1-0), qui a pour titre « Stimulation de la survie et de la régénération des cellules ganglionnaires de la rétine par inactivation de la GTPase Ro après lésion du nerf optique du rat adulte ».

Titre de l'article : Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonist

Publié par Neurobiology of Disease (2006) online doi:10.1016/j.nbd.2006.08.008

Adriana Di Polo

Signature :



Lisa McKerracher

Signature :

---



Accord des co-auteurs

Nous acceptons que l'article suivant soit inclus dans la thèse de doctorat de Johanne Bertrand, étudiante au PhD en Sciences Neurologiques (3-530-1-0), qui a pour titre « Stimulation de la survie et de la régénération des cellules ganglionnaires de la rétine par inactivation de la GTPase Ro après lésion du nerf optique du rat adulte ».

Titre de l'article : Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal neurons by repeated delivery of cell-permeable C3-like Rho antagonists

Publié par Neurobiology of Disease (2006) online doi:10.1016/j.nbd.2006.08.008

Adriana Di Polo

Signature : \_\_\_\_\_

Lisa McKerracher

Signature : \_\_\_\_\_

