

Université de Montréal

**Les Voies de Signalisation du Facteur Neurotrophique Dérivé du Cerveau
(BDNF) dans la Survie Neuronale et la Régénération Axonale des Cellules
Ganglionnaires de la Rétine Adulte Blessée.**

Par

VINCENT PERNET

**Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de Médecine**

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en neurocytologie moléculaire**

Mars 2006

© Pernet Vincent 2006



W

4

US8

2006

V. 049

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 de doctorat intitulée :
« Les Voies de Signalisation du Facteur Neurotrophique Dérivé du Cerveau (BDNF) dans la Survie Neuronale et la Régénération Axonale des Cellules Ganglionnaires de la Rétine Adulte Blessée »

Présentée par :
VINCENT PERNET

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nicole Leclerc, Ph. D.

Président-rapporteur

Adriana Di Polo, Ph. D.

Directeur de recherche

Louis-Éric Trudeau, Ph. D.

Membre du jury

Alyson Fournier, Ph. D.

Examineur externe

Nicole Leclerc, Ph. D.

Représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Grâce à la greffe de nerfs périphériques, Aguayo et son équipe ont démontré que les neurones blessés du système nerveux central (SNC) conservaient la capacité à régénérer leur axone dans un environnement non inhibiteur. Cependant, le nombre d'axones capables de se reconnecter avec les cellules cibles du cerveau était très fortement limité par la mort neuronale (Villegas-Perez et al., 1988). Afin de restorer les fonctions nerveuses, il a donc été suggéré que la régénération axonale et la survie neuronale devaient être activées simultanément (Bray et al., 1987). Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) est un des plus puissants agents neuroprotecteurs du SNC. Il a été démontré que les mécanismes de survie activés par le BDNF et son récepteur, TrkB, dépendaient de l'activation de la voie *Extracellular signal-Regulated Kinase*_{1/2} (Erk_{1/2}) (Cheng et al., 2002). Le BDNF n'est cependant pas capable d'induire de régénération axonale *in vivo*, probablement à cause du manque de synthèse des protéines du cytosquelette impliquées dans la croissance axonale (Fournier et al., 1997; Fournier and McKerracher, 1997). Jusqu'à maintenant, il a été impossible d'activer de manière coordonnée la survie neuronale et la régénération pour rétablir l'activité normale du SNC blessé.

L'hypothèse principale de la thèse est que certaines voies de signalisation du BDNF/TrkB seraient impliquées dans la survie neuronale, alors que la régénération axonale pourrait dépendre d'autres mécanismes moléculaires.

Le premier objectif de la thèse a été de déterminer le rôle de la voie Erk_{1/2} dans la survie neuronale et la régénération axonale après une blessure du SNC adulte *in vivo*. En utilisant un virus adéno-associé encodant la forme constitutivement active de MEK (AAV.MEK-ca), nous avons sélectivement activé Erk_{1/2} dans les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs). L'activation soutenue de Erk_{1/2}, a augmenté la survie des CGRs après la transection du nerf optique, mais n'a pas stimulé pas la régénération axonale. Ces résultats indiquent que la voie Erk_{1/2} peut, à elle seule, activer la survie des neurones, mais n'est pas suffisante pour induire la régénération axonale dans le SNC blessé.

Ensuite, nous avons voulu déterminer si la combinaison de BDNF avec la blessure du cristallin, qui stimule la croissance axonale (Leon et al., 2000), améliorerait la survie et la croissance axonale des neurones axotomisés. Nous avons trouvé que, ensemble,

l'administration de BDNF et la blessure du cristallin exerçaient des effets synergiques sur la survie des CGRs. De manière très inattendue, cette importante survie était accompagnée par l'abolition complète de la croissance axonale induite par la blessure du cristallin et par l'apparition de renflements hypertrophiques dans les axones du nerf optique. Ces observations remettent en question l'utilisation de facteurs de survie comme le BDNF dans le traitement des blessures du SNC.

Le BDNF régule l'expression de nombreux effecteurs intracellulaires (Huang and Reichardt, 2003). Le BDNF contrôle potentiellement la synthèse des polyamines dans les neurones. Il a été suggéré que les polyamines produites de manière endogène pouvaient être des régulateurs naturels du récepteur N-méthyl-D-Aspartate (NMDAR) du glutamate, impliqué dans la mort neuronale. Nous avons donc cherché à savoir si le BDNF, seul ou via la synthèse des polyamines, influençait la mort excitotoxique des CGRs déclenchée par le NMDA. Nos résultats ont démontré que le BDNF n'empêche pas la mort des CGRs induite par l'excitotoxicité du NMDA et ne change pas le niveau de l'enzyme de synthèse des polyamines, l'arginase I, dans la rétine. Par ailleurs, nous avons trouvé que les polyamines exacerbent la toxicité du NMDA. De façon remarquable, nous avons aussi découvert que l'inhibition de la synthèse des polyamines réduisait la mort neuronale.

La régulation des molécules intracellulaires, comme Erk_{1/2} ou les polyamines, semble être une stratégie alternative à l'utilisation des facteurs neurotrophiques, tel que le BDNF, pour stimuler la survie et la régénération axonale.

Mots-clés : cellules ganglionnaires de la rétine, survie neuronale, régénération axonale, excitotoxicité, brain-derived neurotrophic factor, extracellular signal-regulated kinase_{1/2} (Erk_{1/2}), blessure du cristallin, polyamines.

SUMMARY

By using peripheral nerve grafts, Aguayo and his team showed that injured central nervous system (CNS) neurons conserved the ability to regenerate their axons in a non-inhibitory environment. However, the number of axons able to reconnect to brain targets were strongly limited by neuronal cell death (Villegas-Perez et al., 1988). In order to restore nerve function, it was suggested that axonal regeneration and neuronal survival had to be simultaneously stimulated (Bray et al., 1987). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is one of the most potent neuroprotective agents in the CNS. It has been demonstrated that survival mechanisms of BDNF and its receptor, TrkB, depend on the Extracellular Signal-Regulated Kinases_{1/2} (Erk_{1/2}) (Cheng et al., 2002). BDNF, however, does not promote axonal regeneration *in vivo*, probably because of the lack of cytoskeleton protein synthesis required for the axonal growth process (Fournier et al., 1997; Fournier and McKerracher, 1997). So far, it has been impossible to co-activate neuronal survival and axonal regeneration to restore normal function in the injured CNS.

The main hypothesis of this thesis is that signaling mechanisms downstream of BDNF/TrkB are involved in neuron survival, while axonal regeneration may depend on other molecular mechanisms.

The first objective of the thesis was to determine the role of Erk_{1/2} in neuronal survival and axonal regeneration in the adult, injured CNS *in vivo*. By using an adeno-associated virus encoding constitutively active MEK (AAV.MEK-ca), we selectively stimulated Erk_{1/2} in retinal ganglion cells (RGCs). Sustained activation of Erk_{1/2} increased RGC survival after optic nerve transection, but did not stimulate axonal regeneration. These data indicate that the Erk_{1/2} pathway, alone, can activate neuron survival but is not sufficient to promote axonal regeneration in the injured CNS.

We then tested whether the combination of BDNF administration with lens injury (LI), which stimulates axonal growth (Leon et al., 2000), improved survival and axon regrowth of axotomized neurons. We found that, together, BDNF stimulation and LI exerted synergistic effects on RGC survival. Unexpectedly, this remarkable survival was accompanied by complete inhibition of LI-induced axonal regrowth and by the formation of hypertrophic swellings in optic nerve axons. These observations strongly challenge the use of survival factors such as BDNF in the treatment of CNS injury.

BDNF has been shown to modulate the expression of many intracellular effectors (Huang and Reichardt, 2003). BDNF can potentially regulate polyamine synthesis in neurons. It has been suggested that endogenously produced polyamine molecules could be natural regulators of the glutamate receptor, N-methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR), involved in neuronal cell death. Therefore, we tested the capacity of BDNF to, directly or via polyamines synthesis, influence NMDA-mediated excitotoxic RGC death. Our results showed that BDNF did not prevent NMDA-induced RGC death and did not change the level of the polyamine limiting enzyme, arginase I in the retina. In contrast, we found that polyamines exacerbated NMDA toxicity. Importantly, we also demonstrate that inhibition of polyamine synthesis strongly reduced neuronal death.

The regulation of intracellular molecules, such as Erk_{1/2} or polyamines, seems to be an alternative strategy to the use of neurotrophic factors, such as BDNF, to promote survival and axonal regeneration in injured neurons.

Key words: retinal ganglion cells, neuron survival, axonal regeneration, excitotoxicity, brain-derived neurotrophic factor, extracellular signal-regulated kinase_{1/2}, lens injury, polyamines.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xviii
REMERCIEMENTS.....	xxi
<u>CHAPITRE 1</u>	1
I) INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
I.1.) CONTRIBUTION DU MODÈLE RÉTINOCOLLICULAIRE À L'ÉTUDE DES BLESSURES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL	2
I.2.) DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME RÉTINOCOLLICULAIRE	3
I.2.1.) Différenciation des cellules ganglionnaires de la rétine	3
<i>I.2.1.1.) Les facteurs génétiques intrinsèques</i>	<i>4</i>
<i>I.2.1.2.) Les facteurs extrinsèques</i>	<i>5</i>
I.2.2.) Projections axonales des cellules ganglionnaires de la rétine	5
<i>I.2.2.1.) Contrôle intrinsèque de la croissance axonale</i>	<i>5</i>
<i>I.2.2.2.) Le guidage axonal</i>	<i>6</i>
<i>I.2.2.2.a.) Le cône de croissance</i>	<i>6</i>
<i>I.2.2.2.b.) Contrôle de l'assemblage du cytosquelette dans le cône de croissance par les molécules de guidage</i>	<i>9</i>
<i>I.2.2.3.) La croissance axonale dans la rétine</i>	<i>11</i>
<i>I.2.2.4.) La décussation axonale dans le chiasma optique</i>	<i>11</i>
<i>I.2.2.5.) La carte rétinotopique : l'importance des éphrines</i>	<i>12</i>

I.3.) LE MODÈLE DE BLESSURE DU NERF OPTIQUE.....	14
I.3.1.) La perte du programme de croissance axonale chez l'adulte.....	14
I.3.2.) Changements histologiques dans le nerf optique blessé.....	15
<i>I.3.2.1.) La réponse axonale.....</i>	<i>15</i>
<i>I.3.2.2.) La réponse des cellules non-nerveuses.....</i>	<i>18</i>
I.3.3.) Les molécules inhibitrices de la croissance axonale dans l'environnement.....	20
<i>I.3.3.1.) Les protéines inhibitrices de la myéline.....</i>	<i>20</i>
<i>I.3.3.2.) La cicatrice gliale.....</i>	<i>21</i>
<i>I.3.3.3.) L'activation intracellulaire de Rho-A.....</i>	<i>23</i>
I.3.4.) La mort apoptotique des cellules ganglionnaires de la rétine	23
I.4.) LES FACTEURS NEUROTROPHIQUES DANS LE MODÈLE DE L'AXOTOMIE.....	24
I.4.1.) Les facteurs neurotrophiques dans la mort neuronale.....	24
<i>I.4.1.1.) La théorie des facteurs neurotrophiques.....</i>	<i>24</i>
<i>I.4.1.2.) Rôle du BDNF dans le maintien des cellules ganglionnaires de la rétine.....</i>	<i>25</i>
<i>I.4.1.3.) Effets des facteurs neurotrophiques sur les cellules ganglionnaires de la rétine axotomisées.....</i>	<i>26</i>
<i>I.4.1.4.) Mécanismes moléculaires de la survie induite par le BDNF.....</i>	<i>26</i>
<i>I.4.1.4.a.) Sécrétions des facteurs neurotrophiques.....</i>	<i>26</i>
<i>I.4.1.4.b.) Les récepteurs du BDNF p75 et TrkB</i>	<i>27</i>
<i>I.4.1.4.c.) Signalisation intracellulaire de la survie passant par TrkB.....</i>	<i>30</i>
<i>I.4.1.4.d.) La cascade des caspases.....</i>	<i>35</i>
<i>I.4.1.5.) La désensibilisation des neurones au BDNF.....</i>	<i>36</i>
<i>I.4.1.6.) Les effets secondaires du BDNF.....</i>	<i>36</i>
I.4.2.) Les facteurs neurotrophiques dans la croissance neuritique.....	37
<i>I.4.2.1.) Rôle du BDNF in vitro.....</i>	<i>37</i>

I.4.2.1.a.) <i>Le guidage axonal</i>	37
I.4.2.1.b.) <i>Les mécanismes moléculaires de la croissance neuritique</i>	37
I.4.2.1.c.) <i>La croissance neuritique sur des substrats inhibiteurs</i>	38
I.4.2.2.) <i>Rôle du BDNF in vivo</i>	38
I.4.2.2.a.) <i>Les projections axonales</i>	38
I.4.2.2.b.) <i>La régénération axonale dans le nerf optique adulte blessé</i>	39
I.4.2.3.) <i>Relation entre survie neuronale et régénération axonale</i>	40
I.4.2.4.) <i>L'importance de Erk_{1/2} dans la régénération axonale</i>	40
I.5.) ACTIVATION DE LA RÉGÉNÉRATION AXONALE PAR LES MACROPHAGES.....	41
I.6.) LE MODÈLE D'EXCITOTOXICITÉ DU NMDA SUR DES CELLULES GANGLIONNAIRES DE LA RÉTINE.....	42
I.6.1.) L'excitotoxicité du glutamate dans les blessures du SNC.....	42
I.6.2.) La sensibilité des cellules ganglionnaires de la rétine à la toxicité du NMDA.....	43
I.6.3.) Rôle du glutamate dans la mort des cellules ganglionnaires de la rétine axotomisées.....	43
I.6.4.) Mécanismes biochimiques de l'excitotoxicité induite par le NMDA....	44
I.6.4.1.) <i>Le stress oxydatif: importance du peroxy-nitrite</i>	44
I.6.4.2.) <i>L'activation de l'apoptose</i>	44
I.6.5.) La stimulation de la survie.....	45
I.6.5.1.) <i>Le blocage de l'influx de Ca²⁺</i>	45
I.6.5.2.) <i>Les polyamines</i>	45
I.6.5.3.) <i>Le rôle du BDNF dans l'excitotoxicité du NMDA</i>	48
I.7.) OBJECTIFS DE LA THÈSE ET APPROCHES EXPÉRIMENTALES.....	48

<u>CHAPITRE 2</u>	50
II.) PREMIER ARTICLE: “EXTRACELLULAR-SIGNAL REGULATED KINASE 1/2 MEDIATES SURVIVAL, BUT NOT AXON REGENEARTION, OF ADULT INJURED CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEURONS <i>IN VIVO</i>”	50
II.1.) ABSTRACT	52
II.2.) INTRODUCTION	53
II.3.) EXPERIMENTAL METHODS	54
II.3.1.) Preparation of recombinant AAV serotype 2 vectors	54
II.3.2.) Intraocular injection of viral vectors	55
II.3.3.) Optic nerve axotomy and analysis of neuronal survival	55
II.3.4.) Micro-crush lesion and analysis of axon growth	56
II.3.5.) Retina, optic nerve and brain immunohistochemistry	57
II.3.6.) Western blot analysis	58
II.4.) RESULTS	59
II.4.1.) AAV serotype 2 directs selective MEK1 transgene expression in adult RGCs	59
II.4.2.) MEK1 transgene products are transported along RGC axons to targets in the brain	60
II.4.3.) AAV.MEK-ca protects RGCs from axotomy-induced death	61
II.4.4.) MEK-ca gene transfer does not stimulate RGC axon regeneration	62
II.5.) DISCUSSION	64
II.6.) REFERENCES	67
II.7.) TABLES	81

II.8.) FIGURES.....	82
<u>CHAPITRE 3</u>	89
III.) DEUXIÈME ARTICLE: “SYNERGISTIC ACTION OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AND LENS INJURY PROMOTES RETINAL GANGLION CELL SURVIVAL, BUT LEADS TO OPTIC NERVE DYSTROPHY <i>IN VIVO</i>”	89
III.1.) ABSTRACT.....	91
III.2.) INTRODUCTION.....	92
III.3.) EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	93
III.3.1.) Intravitreal injections.....	93
III.3.2.) Optic nerve axotomy and analysis of neuronal survival.....	94
III.3.3.) Optic nerve micro-crush, lens injury and analysis of axonal regeneration.....	94
III.3.4.) Retina and optic nerve immunohistochemistry.....	95
III.3.5.) Preparation of recombinant AAV.GFP for visualization of RGC axons.....	96
III.3.6.) Electron microscopy.....	96
III.4.) RESULTS.....	97
III.4.1.) BDNF and lens injury interact synergistically to promote robust RGC survival <i>in vivo</i>	97
III.4.2.) Intravitreal injection of BDNF leads to regeneration failure following lens injury.....	98
III.4.3.) BDNF does not alter the macrophage or Müller cell response induced by lens injury.....	99

III.4.4.) Growth arrest correlates with hypertrophic axonal swellings in the optic nerve.....	100
III.5.) DISCUSSION.....	102
III.6.) REFERENCES.....	105
III.7.) FIGURES.....	121
<u>CHAPITRE 4</u>.....	131
IV.) TROISIÈME ARTICLE: “POLYAMINES REGULATE NMDA-INDUCED RETINAL GANGLION CELL DEATH <i>IN VIVO</i>”.....	131
IV.1.) ABSTRACT.....	133
IV.2.) INTRODUCTION.....	134
IV.3.) EXPERIMENTAL METHODS.....	135
IV.3.1.) Surgical procedures.....	135
IV.3.2.) Quantification of neuronal survival.....	137
IV.3.3.) Retina immunohistochemistry.....	137
IV.3.4.) Western blot analysis.....	138
IV.4.) RESULTS.....	138
IV.4.1.) NMDA promotes rapid RGC loss <i>in vivo</i>.....	138
IV.4.2.) RGCs and Müller glia express arginase I in intact and NMDA-treated retinas.....	139
IV.4.3.) BDNF does not regulate arginase I levels in the adult retina.....	139
IV.4.4.) Polyamines potentiate NMDA-induced RGC death.....	140
IV.4.5.) Polyamines increase RGC death by binding to NMDAR.....	141

IV.5.) DISCUSSION.....	141
IV.6.) REFERENCES.....	144
IV.7.) FIGURES.....	155
<u>CHAPITRE 5</u>.....	162
V.) DISCUSSION GÉNÉRALE.....	162
V.1.) La voie BDNF/TrkB/Erk_{1/2} dans la survie des neurones axotomisés.....	163
V.1.1.) L'activation de Erk_{1/2} stimule la survie neuronale <i>in vivo</i>.....	163
V.1.2.) Le degré et la durée d'activation de P-Erk_{1/2} dans la survie neuronale.....	163
V.1.3.) Les effets peu durables de P-Erk_{1/2} sur la survie neuronale.....	165
V.2.) La voie BDNF/TrkB/Erk_{1/2} dans la régénération axonale <i>in vivo</i>.....	167
V.2.1.) Le rôle de BDNF/Erk_{1/2} dans l'inhibition de la croissance axonale par la myéline.....	167
V.2.2.) La signalisation cellulaire dans l'initiation de la croissance axonale.....	167
V.2.3.) L'activation de la croissance neuritique par la translocation nucléaire de P-Erk_{1/2}.....	168
V.2.4.) Les effets secondaires du BDNF et de P-Erk_{1/2} dans les axones blessés.....	169
V.2.4.1) La phosphorylation du cytosquelette dans la dystrophie axonale.....	169
V.2.5.) La préservation du segment axonal dans la rétine par rapport à l'axone du nerf optique ?.....	172

V.3.) La voie BDNF/CREB/ArgI/polyamines dans la mort excitotoxique des neurones adultes induite par la NMDA.....	173
V.3.1.) Le manque de neuroprotection du BDNF contre l'excitotoxicité du NMDA.....	173
V.3.2.) L'exacerbation de la toxicité du NMDA par les polyamines.....	174
V.3.3.) Mode d'action des polyamines dans la rétine.....	174
V.3.4.) L'expression des polyamines dans la rétine.....	175
V.4.) Orientations futures.....	175'
V.5.) Conclusion générale.....	176
RÉFÉRENCES.....	178

ANNEXE A

“ACTIVATION OF THE EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE 1/2 PATHWAY BY AAV GENE TRANSFER PROTECTS RETINAL GANGLION CELLS IN GLAUCOMA”.....	208
--	------------

ANNEXE B

DYSTROPHIE AXONALE CAUSÉE PAR AAV.MEKI DANS LE NERF OPTIQUE.....	244
---	------------

ANNEXE C

Contributions aux articles.....	245
--	------------

ANNEXE D

Autorisation des co-auteurs des articles.....	246
--	------------

LISTE DES TABLEAUX

Table 1: Survival of axotomized RGCs following in vivo MEK1 gene transfer.....	81
---	-----------

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1. Le cône de croissance et la navigation intra-rétinienne.....	7
Figure 2. Projections rétinotopiques des cellules ganglionnaires de la rétine.....	13
Figure 3. Protocole expérimental pour l'étude de la survie et de la régénération axonale <i>in vivo</i>.....	16
Figure 4. La blessure du nerf optique.....	19
Figure 5. Les protéines inhibitrices de la myéline.....	22
Figure 6. Structure du BDNF et de ses récepteurs TrkB et p75.....	28
Figure 7. Mécanismes de survie de BDNF/TrkB contre l'apoptose.....	32
Figure 8. Mécanismes d'excitotoxicité du NMDA dans les cellules ganglionnaires de la rétine.....	46

CHAPITRE 2

Figure 1. Experimental protocol used to test the effect of MEK1 gene transfer on RGC survival and regeneration.....	82
Figure 2. AAV mediates MEK-ca gene product expression in adult RGCs.....	83
Figure 3. AAV.MEK-ca activates Erk1/2 in adult RGCs <i>in vivo</i>.....	84
Figure 4. MEK1 transgene products are transported along RGC axons to targets in the brain.....	85
Figure 5. AAV.MEK-ca protects RGCs from axotomy-induced death.....	86
Figure 6. RGC survival correlates with AAV-mediated MEK-ca expression in injured RGCs.....	87
Figure 7. MEK-ca gene transfer does not stimulate RGC axon regeneration.....	88

CHAPITRE 3

Figure 1. BDNF and lens injury have synergistic effects on RGC survival.....	121
Figure 2. Intravitreal injection of BDNF, but not CNTF, strongly decreases the number of regenerating axons induced by lens injury.....	122

Figure 3. BDNF does not alter the macrophage or Müller cell response induced by lens injury.....	123
Figure 4. BDNF does not alter macrophage activation and infiltration in the optic nerve.....	124
Figure 5. Visualization of RGC axon morphology in the retina and optic nerve by green fluorescent protein (GFP) gene transfer.....	125
Figure 6. Growth arrest correlates with hypertrophic axonal swellings in the optic nerve.....	126
Figure 7. Hypertrophic swellings are not present in intraretinal axons.....	127
Figure 8. Structural analysis of RGC axonal swellings induced by combined BDNF and lens injury.....	128
Supplementary figure 1. Synaptophysin staining in injured, control optic nerves....	129
Supplementary figure 2. Axonal swellings induced by combined BDNF and lens injury are positive for other synaptic vesicle markers.....	130

CHAPITRE 4

Figure 1. Polyamine synthesis cascade.....	155
Figure 2. Time course of NMDA-induced RGC death <i>in vivo</i>.....	156
Figure 3. Arginase I is up-regulated in Müller glial cells by NMDA injection.....	157
Figure 4. BDNF does not stimulate arginase I expression in adult retina.....	158
Figure 5. Polyamine synthesis inhibition promotes RGC survival after NMDA injection.....	159
Figure 6. Quantitative analysis of RGC survival.....	160
Figure 7. Polyamine exacerbation of NMDA toxicity is not only mediated by NMDAR facilitation.....	161

CHAPITRE 5

Figure 9. Modèle hypothétique de survie des cellules ganglionnaires de la rétine.....	166
Figure 10. Modèle hypothétique de régénération et de dystrophie axonale.....	170

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAV	Adeno-Associated Virus
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Akt	Protéine Kinase B
AMPA	Acide (S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionique
AMPc	Adénosine MonoPhosphate Cyclique
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor-1
ArgI	Arginase I
ARMS	Ankyrin Rich Membrane-Spanning
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
Ca ²⁺	Calcium
CAMKII	Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II
CGR	Cellules ganglionnaires de la rétine
CNTF	Ciliary NeuroTrophic Factor
CREB	Cyclic AMP-Response Element Binding protein
CSPG	Chondroitin Sulfate ProteoGlycans
CT β	Choléra β subunit/sous-unité β de la toxine du Choléra
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DD	Death Domain
DFMO	Di-Fluoro-Methyl-Ornithine
DRG	Dorsal Root Ganglion Cells
DSPG	Dermatan Sulfate ProteoGlycans
EGF	Epidermal Growth Factor
Ena	Enabled
Erk _{1/2}	Extracellular signal-Regulated Kinase _{1/2}
FG	FluoroGold
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2
Frs2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2
Gab1	Grb2-Associated Binder 1

GABA	Gamma-Amino-Butyric Acid
GAG	GlycosAminoGlycans
GAP	GTPase Activating Protein
GAP-43	Growth-Associated Protein 43
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GDP	Guanosine Di-Phosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl Inositol
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
GTPase	Guanosine Tri-Phosphatase
HA	HémAgglutinine
HSPG	Heparan Sulfate ProteoGlycan
Ig	Immunoglobuline
kDa	kiloDalton
KSPG	Keratan Sulfate ProteoGlycan
LI	Lens Injury
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LINGO	Lrr and Ig domain containing NoGO receptor interacting protein
MAG	Myelin-Associated Glycoprotein
MAPK _{1/2}	Mitogen Activated Protein Kinase _{1/2}
MEKI	Mapk/Erk KinaseI
Mg ²⁺	Magnésium
MK-801	Maléate de Dizocilpine
NF	NeuroFilament
NF-H	NeuroFilament Heavy
NF-M	NeuroFilament Medium
NFκB	Nuclear Factor κ B

NGF	Nerve Growth Factor
NgR	Nogo-66 Receptor
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
NMDAR	Récepteur du N-Méthyl-D-Aspartate
NO	Nitric Oxide/Oxyde Nitrique
NOS	Nitric Oxide Synthase
NR	NMDA Receptor subunit
NT	Neurotrophine
NT3	Neurotrophin 3
NT4/5	Neurotrophin 4/5
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OMgp	Oligodendrocyte Myelin glycoprotein
ONOO ⁻	Peroxinitrite
PDK	Phosphoinositide Dependent Kinase
PI-3K	Phosphatidyl Inositol-3 Kinase
PKA	Protein Kinase A
PLC- γ	PhosphoLipase C- γ
RGM	Repulsive Guidance Molecule
Rho-GDI	Rho GDP Dissociation Inhibitor
ROCK	Rho Kinase
Rsk	Ribosomal S6 kinase
RTK	Récepteur à Tyrosine Kinase
Shc	Src homologous and collagen-like
Shh	Sonic hedge hog
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SOS	Son Of Sevenless
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAF	TnfR Associated Factor
Trk	Tropomyosin-related kinase
VAA	Virus Adéno-Associé

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Adriana de m'avoir confié dès le départ un projet aussi intéressant que celui sur Erk_{1/2} et de m'avoir fait profiter de son expérience pour améliorer mes aptitudes de communications scientifiques en général. Je lui suis reconnaissant de m'avoir laissé une grande liberté d'exploration et de suggestion qui a été un facteur important de motivation pendant mon Ph.D., et qui reflète sa grande ouverture d'esprit. Nos échanges ont été déterminants dans l'aboutissement des articles et de cette thèse.

Sandrine est quelqu'un que je dois remercier spécifiquement dans le contexte de ma thèse, en plus de la place particulière qu'elle occupe dans ma vie. Il est évident que sans elle, je n'aurais pu vivre ma thèse dans de si bonnes conditions. Le fait que Sandrine fasse sa thèse parallèlement à moi a été une grande source d'encouragements et d'apprentissage. Je me suis toujours fié à son jugement dans les moments de doute. Notre complicité a fait de ces années des souvenirs inoubliables.

Mon Ph.D. n'aurait pas été le même sans un prince polonais à mes côtés! J'ai eu beaucoup de plaisir à discuter de science et d'autres sujets avec Mike. Son aide m'a été précieuse dans l'apprentissage des techniques, et son attachante personnalité fut un grand soutien moral.

Je remercie Philippe pour son dévouement et la rigueur de son travail. J'ai trouvé très plaisant de travailler avec lui.

Il y a plusieurs autres personnes qui ont mis de la vie dans le laboratoire et qui ont marqué mes années d'études telles que Laure, Céline, Yu, Isabelle, Fred, et Ali.

Je tiens aussi à remercier le département de pathologie et biologie cellulaire qui a instauré un financement minimum de 16 000 \$ par année pour les étudiants de doctorat, pendant trois ans (à participation égale avec les directeurs de recherche). Je remercie également le

groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC) de m'avoir octroyé une bourse d'étude ces deux dernières années.

Le *réseau vision* du FRSQ m'a donné la possibilité de rencontrer plusieurs chercheurs très intéressants dans les différents champs spécialisés de la vision. Je remercie le réseau et son directeur, le Dr Pierre Lachapelle, pour l'organisation des réunions scientifiques locales et le support financier au congrès annuel international de *l'Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)*.

Je remercie le Dr. Laurent Descarries et Michel Lauzon de m'avoir fait profiter de leur expertise en microscopie électronique et le secrétariat du département de pathologie et biologie cellulaire pour sa grande efficacité.

Je suis reconnaissant aux différents collaborateurs d'Adriana qui ont donné leur avis sur les manuscrits des articles et qui ont contribué à améliorer la qualité des publications de la thèse.

Ma liste de remerciements ne suit pas d'ordre de valeur. Donc, finalement et non des moindres, je remercie mon père, ma mère, mon frère et ma sœur qui m'ont solidement soutenu au cours de mon Ph.D.. Le soutien familial est particulier car il est moins spécifique à mon doctorat, il englobe mes années d'université entières et est certainement à la source de mes intérêts pour la biologie et la recherche. Il s'agit donc de sentiments plus fondamentaux qui dépassent le cadre de mon Ph.D. et ne s'arrêtent pas à cette thèse.

CHAPITRE 1

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

I.1.) Contribution du modèle rétinocolliculaire à l'étude des blessures du système nerveux central.

Au début du XX^{ème} siècle, les expériences réalisées dans le laboratoire de Ramón y Cajal ont démontré que le système nerveux central (SNC) était incapable de régénérer après une blessure (Ramon y Cajal, 1928). Dès lors, le nerf optique et la moelle épinière furent des parties privilégiées du SNC pour décrire la réponse axonale à une blessure traumatique. Puisque les nerfs périphériques étaient capables de régénérer, il fut postulé que les nerfs périphériques représentaient des milieux plus favorables (ou permissifs) à la croissance axonale des neurones blessés. En collaboration avec Leoz, Tello (1907) testa cette hypothèse en greffant des nerfs sciatiques sur des nerfs optiques de lapin. Il constata que certaines fibres axonales du nerf optique avaient traversé la cicatrice entre le nerf optique et le greffon et s'avançaient loin dans la greffe périphérique. Ces premières observations de régénération dans le SNC furent reprises par Aguayo et son équipe au début des années 1980. En employant des techniques modernes de traçage axonal et les greffes de nerfs périphériques, Aguayo et ses collaborateurs observèrent que les neurones centraux de la moelle épinière (Richardson et al., 1980; David and Aguayo, 1981), du cortex cérébral (Benfey and Aguayo, 1982), et de la rétine (So and Aguayo, 1985) pouvaient régénérer sur de longues distances. C'est encore en utilisant le système visuel qu'on démontra que les axones régénérant à travers un nerf sciatique pouvaient reformer des synapses fonctionnelles dans le cerveau (Vidal-Sanz et al., 1987; Carter et al., 1989; Keirstead et al., 1989). Les données récoltées chez Aguayo ont prouvé que la régénération des neurones centraux n'est pas impossible après une blessure axonale.

Depuis, l'élucidation des mécanismes moléculaires et cellulaires permettant aux neurones centraux de régénérer a fait l'objet de nombreuses études. Un but premier de cette recherche est de mieux protéger et de rétablir la fonction des neurones lésés. En effet, les greffes de nerfs périphériques ne permettent qu'à un nombre très limité de neurones de régénérer leur axone et de survivre. Par exemple, on évalue à ~3% la proportion des axones du nerf optique capables de régénérer à travers une greffe de nerf périphérique de 3-3,5cm de long, après 8-10 semaines (Vidal-Sanz et al., 1987). Ce faible taux de régénération s'explique par la mort massive des neurones mais aussi par le succès très partiel des neurones survivant à faire repousser leur axone (~20%) (Villegas-Perez et al., 1988a). Le

rétablissement des fonctions nerveuses du SNC blessé requiert d'améliorer la régénération axonale et la survie neuronale simultanément (Bray et al., 1987). Cet objectif passe par une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlant la croissance axonale et la neuroprotection.

Comme nous le verrons dans l'introduction générale de cette thèse, le système visuel est un modèle de choix pour étudier les mécanismes de mort et de régénération dans le SNC. Dans un premier temps, je présenterai la formation des projections rétino-colliculaires des cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) pendant le développement. Ensuite, je ferai une revue des principaux facteurs qui nuisent à la régénération axonale et à la survie des neurones blessés. L'utilisation des facteurs neurotrophiques, avec principalement le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), sera exposée comme stratégie réparatrice des neurones lésés. Enfin, j'établirai les objectifs de la thèse.

I.2.) Développement du système rétinocolliculaire.

Connaître le développement du système rétinocolliculaire est un préalable à l'étude de la survie neuronale et de la régénération axonale chez l'adulte. Les CGRs sont les neurones qui transmettent l'information visuelle entre la rétine et le cerveau. Les corps cellulaires des CGRs sont placés dans une monocouche de la rétine interne et projettent de très longs axones à travers le nerf optique jusqu'aux cellules cibles du cerveau. Chez les rongeurs, la plupart des terminaisons synaptiques des CGRs se trouve dans le collicule supérieur, qui sert de relais cérébral pour la vision non-consciente. Seules 30% des CGRs projettent des branches collatérales vers le corps genouillé latéral où transitent les informations visuelles conscientes (Isenmann et al., 2003). L'établissement du système rétinocolliculaire est complexe et fait intervenir de nombreuses molécules qui contrôlent la différenciation cellulaire et la croissance axonale au cours du développement.

I.2.1.) Différenciation des cellules ganglionnaires de la rétine.

Pendant la neurogenèse, les cellules optiques primordiales sont générées par la division et la migration rostrale de cellules du diencephale. Les 6 différents types de cellules rétiniennes dérivent toutes des mêmes cellules neuroblastiques ou cellules progénitrices (Turner and Cepko, 1987). Les CGRs sont les premières cellules de la rétine

qui se différencient et sont suivies des cellules horizontales, des cônes, des cellules amacrines, des bâtonnets, des cellules bipolaires et des cellules de Müller (La Vail et al., 1991; Cepko et al., 1996; Rapaport et al., 2004). Les cellules progénitrices sont multipotentes jusqu'à leur dernière mitose. Les progéniteurs sortent du cycle cellulaire et acquièrent un phénotype cellulaire sous l'influence de facteurs génétiques intrinsèques et de facteurs extrinsèques présents dans le milieu extracellulaire (Livesey and Cepko, 2001).

I.2.1.1.) Les facteurs génétiques intrinsèques.

La « naissance » des CGRs commence vers E11-E13 chez les rongeurs. Les CGRs apparaissent en une « vague de différenciation » qui commence au centre de la rétine et se propage vers la périphérie (Young, 1985; Hu and Easter, 1999; McCabe et al., 1999; Neumann and Nusslein-Volhard, 2000). On ne sait pas exactement comment une cellule postmitotique devient compétente pour se différencier en CGR. Il a cependant été proposé que le partage asymétrique d'ARNm et de protéines comme Numb serait un mécanisme précoce qui dirige une cellule mitotique vers la différenciation cellulaire (Cayouette et al., 2001). De plus, on reconnaît l'activation hiérarchique de gènes régulant la différenciation et la spécification des CGRs (Mu and Klein, 2004). La cascade d'activation des facteurs de transcription Pax-6, Math-5 (homologue mammalien d'atonal 5 chez la drosophile et de Xath5 chez le xénope) et Brn-3b est essentielle à la différenciation des neuroblastes en CGRs dans le règne animal. Plus les gènes impliqués dans cette cascade sont en aval et plus ils sont spécifiques aux CGRs. Par exemple, si Pax-6 est inactivé, hormis les cellules amacrines (des interneurons dans la rétine), aucun autre type de cellule rétinienne ne peut se différencier (Marquardt et al., 2001). Par contre, la délétion du gène de math5 chez des souris transgéniques conduit spécifiquement à l'absence de CGRs et du nerf optique (Brown et al., 1998; Brown et al., 2001). Parallèlement au déficit de CGRs, un plus grand nombre de cellules amacrines et de cônes est observé (Brown et al., 1998; Wang et al., 2001). La délétion de Brn-3b n'empêche pas la différenciation en CGRs (Gan et al., 1999) mais altère profondément l'axonogenèse (voir ci dessous) (Erkman et al., 2000; Wang et al., 2000). L'analyse des souris mutantes permet de spéculer sur l'existence d'un ou plusieurs facteurs de transcription entre Math-5 et Brn-3b qui induirait la différenciation des CGRs (Mu and Klein, 2004).

I.2.1.2.) Les facteurs extrinsèques.

Un des facteurs sécrétés le mieux connu dans la différenciation des CGRs est *Sonic hedge hog* (Shh). Les premières CGRs différenciées régulent l'apparition de nouvelles CGRs grâce à la sécrétion de Shh. L'expression de Shh est transitoire et suit l'onde de différenciation des CGRs du centre vers la périphérie de la rétine (Neumann and Nüsslein-Volhard, 2000). Alors que Shh semble induire la différenciation en CGRs à faible concentration, la forte concentration en Shh derrière la vague de différenciation réprime le phénotype en CGR (Zhang and Yang, 2001; Wang et al., 2005). La fonction duale de Shh permet l'autorégulation de la production de CGRs dans la rétine. Jusqu'à récemment, la fonction connue de Shh se limitait à la différenciation des CGRs mais des travaux ont montré que Shh était aussi impliquée dans la projection et le guidage des axones. Shh agit comme une molécule chimioattractrice sur les axones de la moelle épinière (Charron et al., 2003). Dans la rétine, Shh a d'abord été considéré comme un facteur restreignant la motilité du cône de croissance et l'augmentation de Shh semblait perturber le guidage axonal (Trousse et al., 2001). Mais dernièrement, il a été démontré que Shh exerçait des effets biphasiques sur la croissance axonale en fonction de sa concentration (Kolpak et al., 2005).

I.2.2.) Projections axonales des cellules ganglionnaires de la rétine.

I.2.2.1.) Contrôle intrinsèque de la croissance axonale.

Les CGRs émettent un prolongement axonal dans l'ordre de leur apparition, du centre vers la périphérie de la rétine (Dräger, 1985). Le programme de croissance axonale intrinsèque des CGRs est activé pendant un temps limité qui va de la différenciation des CGRs (E11-E13) jusqu'à la naissance de l'animal (P0) (Goldberg et al., 2002a). Il a été suggéré qu'après cette période, les cellules amacrines libèrent un signal faisant basculer les CGRs d'un mode de croissance axonale à un mode de croissance dendritique (Goldberg, 2004). Peu de choses sont connues sur le contrôle génétique du programme de croissance axonale des CGRs. Mais il a été démontré que certains facteurs de transcription à domaine POU de la famille Brn-3 ont un rôle essentiel dans l'établissement des prolongements axonaux. La délétion de Brn-3b réduit fortement le nombre d'axones et provoque de nombreuses anomalies de projection pour le peu d'axones qui s'étendent dans le nerf optique (Gan et al., 1999; Erkman et al., 2000; Wang et al., 2000). De façon remarquable,

le développement des dendrites ne semble pas inhibé par l'absence de Brn-3b. Donc, la fonction de Brn-3b contrôlerait spécifiquement la croissance neuritique de type axonale. D'autres facteurs de la famille de Brn-3b, tels que Brn-3a et Brn-3c sont aussi exprimés dans les CGRs et peuvent partiellement compenser la perte de Brn-3b (Wang et al., 2002c). Le programme de croissance intrinsèque aux CGRs est indispensable à la projection des axones, mais des facteurs extérieurs à la cellule sont nécessaires pour stimuler la croissance axonale et orienter le cône de croissance dans l'environnement (Goldberg et al., 2002b).

I.2.2.2.) Le guidage axonal.

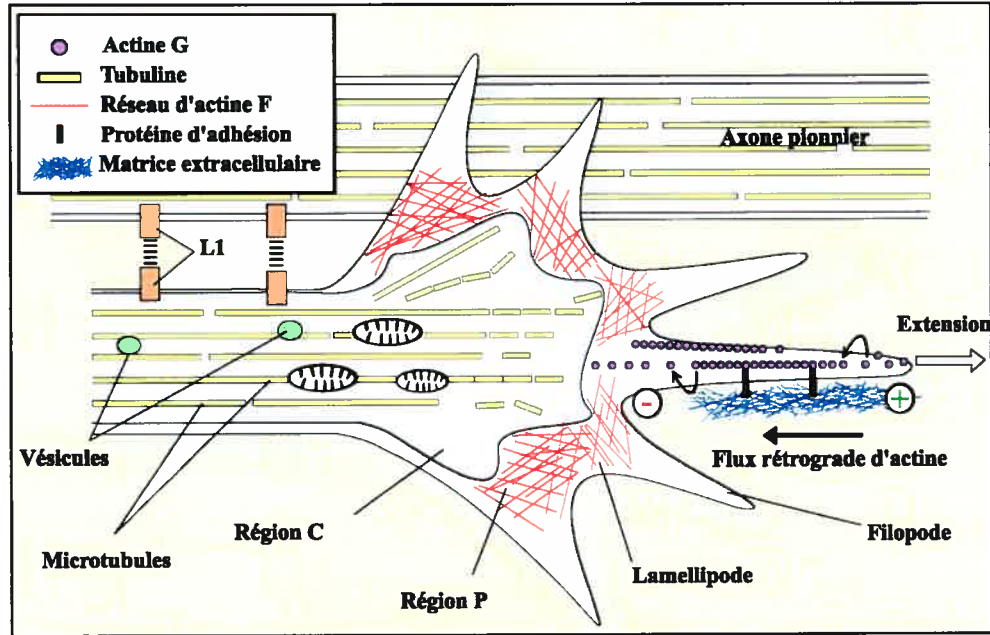
Pour se connecter au cerveau, les axones doivent d'abord trouver l'entrée du nerf optique, traverser le chiasma optique, voyager à travers le tractus optique et reconnaître leur cellule cible dans le thalamus et le mésencéphale. Les étapes de cet itinéraire sont balisées par des molécules de guidage répulsives et attractives qui constituent la carte de route chimique pour le cône de croissance.

I.2.2.2.a.) Le cône de croissance.

Le cône de croissance est la protubérance terminale motile qui permet l'allongement de l'axone. Le cône de croissance est composé d'une région centrale (C) aplatie (lamellipodes) et d'une région périphérique (P) où la membrane cytoplasmique se déforme en doigts de gants (filopodes) (Figure 1A). Les microtubules s'avancent jusque dans la région centrale et les organelles y sont transportées antérogradement. Dans la région périphérique (P), les filaments d'actine polymérisent et forment des faisceaux dans les filopodes et un réseau de microfilaments d'actine moins organisé dans les lamellipodes (Gallo and Letourneau, 2000).

Lorsqu'une molécule attractrice est détectée au niveau d'un filopode, la polymérisation de l'actine en filament d'actine F est favorisée du côté distal qui est noté «+» par rapport à la dépolymérisation du côté proximal noté «-» (Figure 1A). L'allongement de l'actine provoque une extension des filopodes appelée aussi « *protrusion* » du cône de croissance (Goldberg and Burmeister, 1986). Pour que ce mouvement soit efficace, des contacts entre les protéines de la matrice extracellulaire et les

A) Le cône de croissance



B) Croissance axonale intra-rétinienne

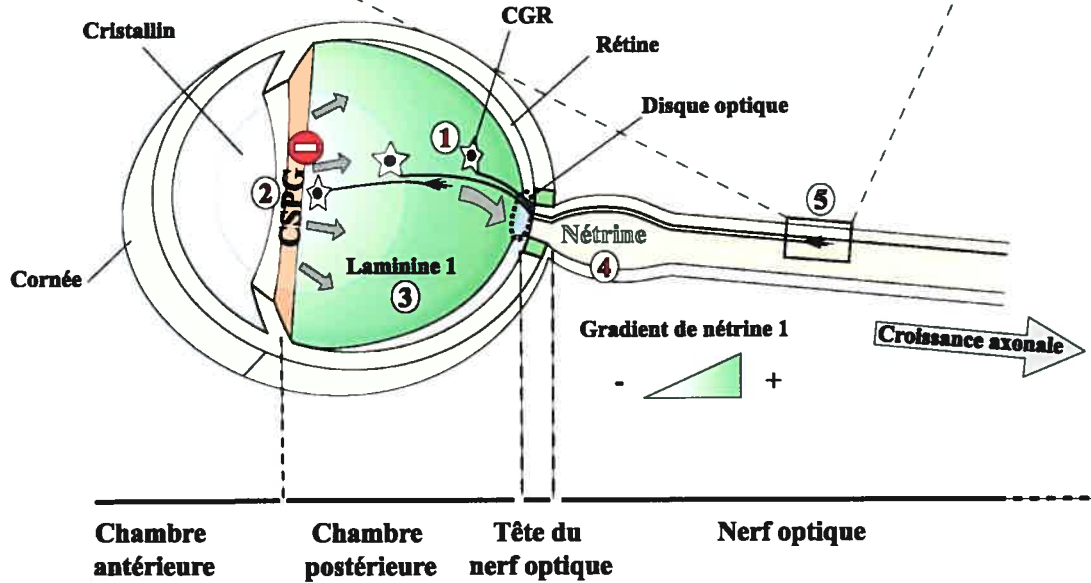


Figure 1. Le cône de croissance et la navigation intra-rétinienne. (A) Le cône de croissance est l'extrémité motile de l'axone où l'assemblage du cytosquelette est très dynamique. La polymérisation de l'actine à l'extrémité positive du filopode et la dépolymérisation de l'actine à l'extrémité négative régulent l'extension et la rétraction du filopode respectivement. **(B)** Les premières CGRs qui se différencient au centre de la rétine émettent des prolongements axonaux dits pionniers **(1)**. Les axones sont attirés vers l'entrée du nerf optique par un gradient diffusible et croissant de nétrine 1 **(4)** sécrétée par des cellules du neuroépithélium qui entourent le disque optique. Le retour des cônes de croissance vers la rétine est inhibé par l'action conjuguée de la nétrine 1 et de la laminine 1 **(3)** qui change la nature attractive de nétrine 1 en signal répulsif. L'orientation des cônes de croissance vers la périphérie est inhibée par un revêtement de protéoglycan à chondroïtine sulfate (CSPG) dans la matrice extracellulaire **(2)**. Ultérieurement, les axones émis par les CGRs périphériques forment des fascicules avec les axones pionniers grâce à des contacts homophiles entre les immunoglobulines L1 **(5)** et Figure 1A) et rampent le long des axones pré-existants. © Vincent Pernet.

récepteurs d'adhésion moléculaires (molécules d'adhésion cellulaires, intégrines et cadhérines) liés aux filaments d'actine sont nécessaires. Ainsi, les filaments d'actine poussent vers l'avant le filopode qui s'appuie sur le substrat de croissance pour que s'exerce la traction. La quantité d'actine dans le cône de croissance ne change pas mais est plutôt recyclée du pôle « - » au pôle « + » de l'actine F. Les microtubules envahissent la région P suivant la progression de l'actine dans les filopodes et « consolident » l'avancée de l'axone (Goldberg and Burmeister, 1986).

À l'inverse, des substances chimiorépulsives activent la dépolymérisation de l'actine F qui produit la rétraction du cône de croissance ou son effondrement. De plus, un flux rétrograde des filaments d'actine est causé par les mouvements contractiles de la myosine II (non musculaire) (Brown and Bridgman, 2003). Le mouvement rétrograde de l'actine F engendré par la myosine II s'oppose à l'extension du pôle « + » (Lin et al., 1996).

Un changement de direction du cône de croissance représente un mouvement plus subtil que l'extension ou la rétraction. On pense que c'est la polymérisation asymétrique de l'actine dans le cône de croissance qui amorce un changement de direction (Dent and Gertler, 2003).

I.2.2.2.b.) Contrôle de l'assemblage du cytosquelette dans le cône de croissance par les molécules de guidage.

Le remodelage du cytosquelette supportant la chimioattraction et la chimiorépulsion dépend des enzymes de polymérisation et dépolymérisation de l'actine, du transport rétrograde de l'actine F, de l'endocytose et de la polymérisation des microtubules. Les mécanismes de réorganisation du cytosquelette sont influencés dans la cellule par les petites GTPases de la famille de Rho qui sont RhoA, Cdc42 et Rac1.

Les protéines de la famille de Rho sont activées par une liaison au GTP et redeviennent inactives lorsqu'elles hydrolysent le GTP en GDP grâce à leur activité GTPasique intrinsèque. L'état d'activation des GTPases est régulé par les protéines *Guanine nucleotide Exchange Factor* (GEF) qui libèrent le GDP, ce qui permet au GTP de venir se lier et d'activer la protéine Rho. Inversement, les *GTPase Activating Protein* (GAP) augmentent l'activité GTPasique endogène et donc favorisent le retour à l'état inactif sous la forme couplée au GDP (Huber et al., 2003). Par ailleurs, il a récemment été

montré que Rho pouvait être activée grâce au clivage de sa liaison avec l'inhibiteur *Rho GDP Dissociation Factor* (Rho-GDI), facilitant ainsi le passage vers la forme active RhoA-GTP (Yamashita and Tohyama, 2003).

Les différentes classes de molécules de guidage axonal utilisent les Rho-GTPases comme médiateurs intracellulaires. En se liant au récepteur *Deleted in Colorectal Cancer* (DCC), nétrine 1 stimule l'élaboration de filopodes via l'activation de Cdc42 et Rac1 (Li et al., 2002; Shekarabi and Kennedy, 2002; Shekarabi et al., 2005). L'éphrine A5 (Wahl et al., 2000) et l'éphrine A2 (Shamah et al., 2001) exercent une action répulsive sur le cône de croissance des cellules ganglionnaires de la rétine par l'activation de RhoA et simultanément l'inactivation de Rac et Cdc42. De manière très générale, l'activation de RhoA apparaît comme le médiateur de la chimiorépulsion alors que Rac et Cdc42 sont considérés comme les médiateurs de l'attraction du cône de croissance (Huber et al., 2003).

Les mécanismes contrôlant la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine et des microtubules n'ont pas encore été clairement reliés aux molécules de guidage dans les cellules nerveuses (Huber et al., 2003). Par contre, on sait que la polymérisation de l'actine dans le cône de croissance est contrôlée par la profiline en tête du filopode (pôle « + ») (Suetsugu et al., 1998) et que des mutations des protéines de la famille *Enabled* (Ena), régulant la profiline, provoquent des anomalies des projections axonales pendant le développement. (Lanier et al., 1999; Wills et al., 1999; Yu et al., 2002). De plus, la dépolymérisation de l'actine F du côté « - » par l'enzyme *Actin Depolymerizing Factor* (ADF)/cofiline est nécessaire au recyclage des monomères d'actine du côté « + » et à l'extension des filopodes. La phosphorylation d'ADF/cofiline par la kinase LIMK inactive la dépolymérisation de l'actine F et inhibe la projection des filopodes. Inversement, Slingshot est une phosphatase qui déphosphoryle ADF/cofiline et la rend active (Huber et al., 2003). Des travaux très récents ont impliqué l'activation de la voie RhoA/ROCK/LIMK dans l'inhibition du cône de croissance par les protéines de la myéline (Hsieh et al., 2006), alors que son inhibition par les neurotrophines se traduit par l'élaboration de filopodes dans le cône de croissance (Gehler et al., 2004a; Gehler et al., 2004b).

I.2.2.3.) La croissance axonale dans la rétine.

La croissance axonale dans le système visuel implique de nombreuses molécules de guidage qui influencent la navigation du cône de croissance (Figure 1) (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Oster et al., 2004). Dans la rétine, les premiers axones partent du centre de la rétine et sont qualifiés de pionniers. Les axones des CGRs plus périphériques se hissent sur les axones pré-existants (pionniers) par l'intermédiaire d'interactions homophiles entre les immunoglobulines L1 membranaires (Brittis et al., 1995; Brittis and Silver, 1995). La présence de molécule d'éphrine-B dans la rétine semble contribuer également à la fasciculation des axones par répulsion (Birgbauer et al., 2000; Birgbauer et al., 2001). Les axones grandissent vers le centre de la rétine et sont attirés vers l'intérieur du nerf optique par un gradient chimioattracteur de protéine de nétrine-1 sécrétée par des cellules neuroépithéliales entourant le disque optique (Deiner et al., 1997). En même temps, l'orientation du cône de croissance vers la périphérie de la rétine est inhibée par un anneau de protéines à chondroïtine sulphate (CSPG) dans la matrice extracellulaire (Snow et al., 1991; Brittis et al., 1992).

I.2.2.4.) La décussation axonale dans le chiasma optique.

Les cônes de croissance qui atteignent le chiasma optique doivent décider de traverser la ligne médiane vers le côté contralatéral ou de continuer leur progression du côté ipsilatéral. La majorité (97-99%) des axones choisissent de passer du côté contralatéral et ~1-3% continuent leur chemin ipsilatéralement chez le rongeur (Isenmann et al., 2003; Jeffery and Erskine, 2005). Chez le primate, 50% des CGRs, qui se trouvent dans la rétine temporale, projettent du côté ipsilatéral après le chiasma optique (Isenmann et al., 2003). Dans la région du chiasma optique, les protéines répulsives Slit1 et 2 de la famille des immunoglobulines sont sécrétées sur la surface ventrale de l'hypothalamus et servent à indiquer le lieu de croisement des axones sur l'axe médian rostro-caudal (Figure 2, (1)) (Erskine et al., 2000; Ringstedt et al., 2000; Plump et al., 2002). L'expression d'éphrine-B2 sur la ligne médiane chiasmatisque pourrait agir comme un aiguilleur chimique repoussant les axones ipsilatéraux qui portent le récepteur ÉphB1 (Jeffery and Erskine, 2005). Mais d'autres molécules que les éphrines semblent requises pour la décussation des axones dans le chiasma optique. De plus, l'expression de certains gènes est intrinsèquement impliquée

dans le croisement du chiasma tels que celui du *Growth-Associated Protein* (GAP-43) (Zhu and Julien, 1999) ou encore les facteurs de transcription *Zic2* (Herrera et al., 2003), et *Isl2* (Pak et al., 2004).

1.2.2.5.) La carte rétinotopique: l'importance des éphrines.

Des cellules CGRs voisines dans la rétine font synapse avec des cellules voisines du collicule supérieur, de sorte qu'il y a une correspondance spatiale entre les CGRs dans la rétine et les cellules colliculaires : il s'agit de la carte rétinotopique (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Par exemple, les axones de la rétine nasale établissent des synapses dans le collicule postérieur alors que les axones de la rétine temporale s'arrêtent dans le collicule antérieur (Figure 2).

Dès 1963, Sperry a proposé que le positionnement antéro-postérieur et médio-temporal des terminaisons axonales des CGRs dans le collicule supérieur était dicté par des molécules de guidage établies en gradient (Sperry, 1963). Les éphrines-A et -B sont des molécules chimiorépulsives distribuées en gradient dans le collicule supérieur qui participent à la localisation des terminaisons sur l'axe antéro-postérieur et médio-temporal respectivement (Knoll and Drescher, 2002). Un gradient rostro-caudal croissant d'éphrine-A (éphrine-A2, éphrine-A5, éphrine-A6) à la surface du collicule repousse les cônes de croissance des CGRs exprimant le récepteur aux éphrines ÉphA3 (Figure 2, (2)). L'expression du récepteur ÉphA3 par les cellules ganglionnaires suit un gradient temporo-nasal croissant, rendant les axones temporaux plus sensibles à la répulsion des éphrines-A dans la région postérieure du collicule supérieur (Figure 2, (3)). De façon analogue, les éphrines-B sont exprimées suivant un gradient médio-temporal croissant dans le collicule supérieur et inhibent la croissance des axones porteurs de récepteur ÉphB. En outre, il faut noter que la dénomination de ligands et récepteurs est subjective dans la description ci-dessus puisque les cellules présentatrices d'éphrines et celles exhibant Éph s'activent mutuellement et que la signalisation est considérée comme « bidirectionnelle » (Knoll and Drescher, 2002). L'expression complémentaire de ÉphA et ÉphB dans la rétine et des éphrines A et B dans le collicule supérieur illustre comment l'expression intrinsèque de récepteurs peut conditionner la réponse des cônes de croissance aux molécules présentes dans l'environnement.

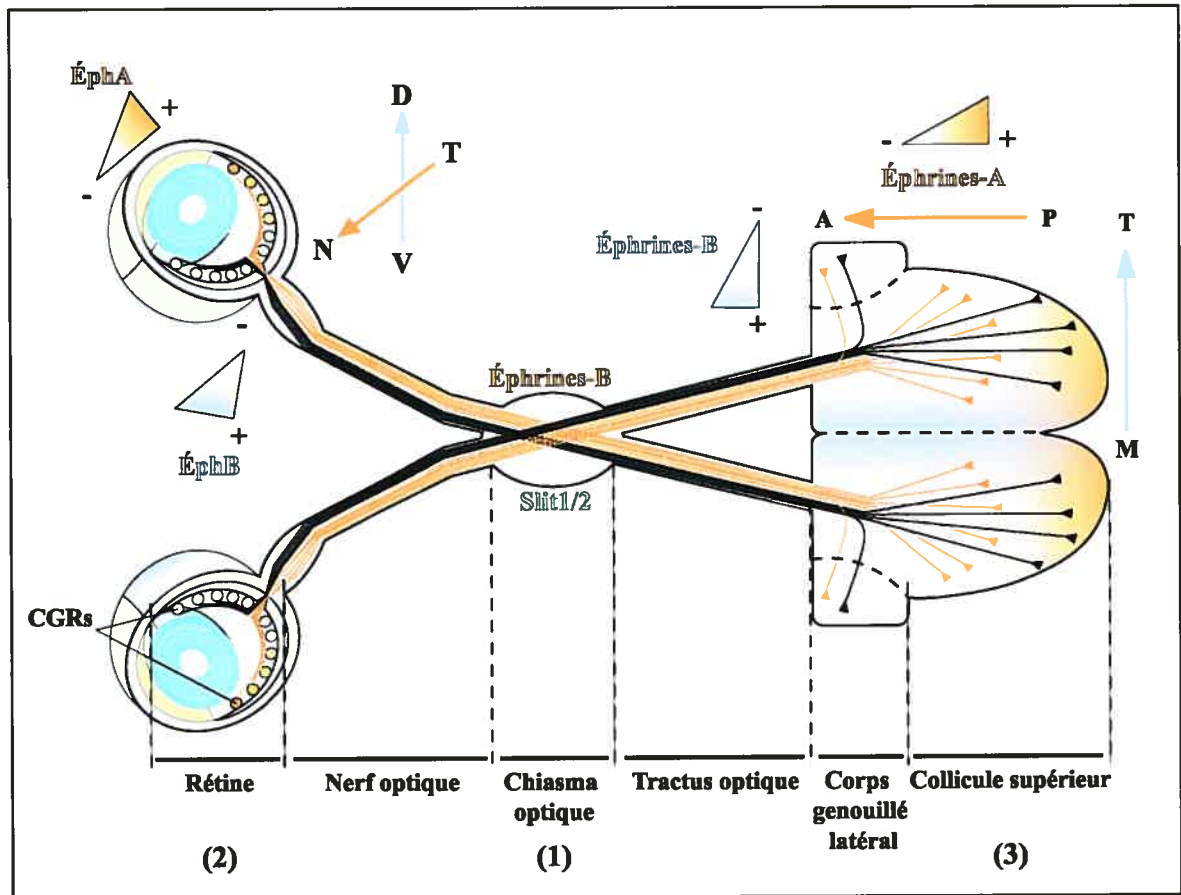


Figure 2. Projections rétinotopiques des cellules ganglionnaires de la rétine. La très grande majorité (97-99%) des axones du nerf optique traversent le chiasma optique et continuent leur chemin dans le tractus optique contralatéral chez les rongeurs ((1), les projections ipsilatérales ne sont pas représentées pour la clarté du dessin). Les axones ont pour cible principale le collicule supérieur, alors que seuls 30% des axones envoient des branches collatérales vers le corps genouillé latéral. L'expression en gradient des récepteurs ÉphA et ÉphB dans la rétine (2) confère aux axones une sensibilité plus grande au gradient répulsif d'éphrines A et B dans le collicule supérieur. Les axones de la rétine temporale exprimant le récepteur ÉphA sont sensibles à la répulsion des éphrines présentes à la surface du collicule supérieur suivant un gradient croissant postéro-antérieur (P-A) (orange). Un gradient croissant d'éphrine-B médio-temporal (M-T) dans le collicule supérieur repousse les axones de la rétine ventrale (V) possédant le récepteur ÉphB (violet) (non illustrés pour une question d'espace) (3). L'exclusion par chimiorépulsion des éphrines oriente le positionnement des terminaisons axonales. © Vincent Pernet.

La présence d'autres molécules comme la *Repulsive Guidance Molecule* (RGM), répartie selon un gradient antéro-postérieur dans le collicule, semble agir de la même façon que les éphrines dans le guidage des axones bien que n'étant pas apparentée à cette famille de molécules (Monnier et al., 2002).

I.3.) Le modèle de blessure du nerf optique.

I.3.1.) La perte du programme de croissance axonale chez l'adulte.

La croissance axonale des CGRs chute brutalement après la naissance (après E21 chez le rat) (Goldberg et al., 2002a; Avwenagha et al., 2003). À cette période, il a été suggéré que les cellules amacrines envoient un signal faisant basculer les CGRs d'un mode de croissance axonale à un mode de croissance dendritique (Goldberg, 2004). Cette transition est rapide et irréversible. Les facteurs venant des cellules amacrines affectent la capacité intrinsèque des CGRs à émettre un axone. L'expression de facteurs de transcription comme Brn-3b ou Shh, activés précocement lors de la différenciation des CGRs et rapidement éteints après le développement, pourrait être impliquée dans la baisse de croissance axonale chez l'adulte (Weishaupt et al., 2005). Les CGRs adultes possèdent donc une très faible capacité intrinsèque à faire repousser leur axone blessé. Par exemple, sur des substrats de croissance équivalents, les axones de neurones adultes poussent 10 fois moins vite que ceux des neurones embryonnaires (Goldberg et al., 2002a). Néanmoins, bien que les neurones adultes soient peu aptes à régénérer leur axone sectionné, une faible proportion d'entre eux y arrive lorsque le milieu de croissance devient permissif.

Les mécanismes de guidage et de croissance axonale qui sont impliqués dans le développement doivent être réinitiés chez l'adulte pour permettre la régénération axonale après une blessure. Les nombreuses données disponibles sur le développement du système rétinocolliculaire contribuent à rendre le modèle de blessure du nerf optique très pertinent pour étudier les mécanismes de régénération axonale dans le SNC adulte blessé (Oster et al., 2004).

Depuis les travaux pionniers d'Aguayo, la blessure du nerf optique est devenue un modèle standard pour étudier les processus dégénératifs des axones et les mécanismes de mort dans le système nerveux central (Aguayo et al., 1987). L'œil est une fenêtre donnant un accès direct aux corps cellulaires des CGRs. Il est donc relativement facile de tester des

molécules sur les CGRs en les injectant dans l'humeur vitrée (Figure 3A). De plus, la compartimentation exceptionnelle des corps cellulaires (dans la rétine) et des axones (dans le nerf optique) des CGRs fait de ces neurones un modèle unique pour l'étude de la survie neuronale et de la régénération axonale dans le SNC *in vivo* (Figure 3D). Par exemple, les corps cellulaires des CGRs peuvent être spécifiquement marqués dans la rétine par le transport axonal rétrograde de traceurs déposés au niveau des terminaisons axonales sur le collicule supérieur (Figure 3A) (Vidal-Sanz et al., 1988; Villegas-Perez et al., 1993). Les axones du nerf optique peuvent être visualisés *in vivo* grâce à des traceurs tels que la peroxydase de radis noir (HRP) ou la sous-unité β de la toxine du choléra (CT β) injectés dans l'espace vitréen et transportés antérogradement dans les axones (Figure 3E) (Angelucci et al., 1996; Selles-Navarro et al., 2001). L'anatomie du système rétino-colliculaire se prête particulièrement bien à l'application des techniques d'études de la régénération axonale et de la survie neuronale *in vivo*.

1.3.2.) Changements histologiques dans le nerf optique blessé.

1.3.2.1.) La réponse axonale.

La transection ou l'écrasement du nerf optique provoque des changements histologiques importants et évolutifs dans le temps. De façon générale, la réponse des axones du nerf optique et des cellules non-nerveuses à l'axotomie est semblable à celle d'autres blessures traumatiques dans le SNC et le système nerveux périphérique (SNP) (Stichel and Muller, 1998). Dans les premières heures suivant l'axotomie (24 hres<), les terminaisons des axones proximaux s'hypertrophient et prennent la forme de bâtons de golf (Figure 4). Les jours qui suivent, les extrémités bourgeonnent localement dans la région blessée mais la croissance est rapidement avortée; les extensions émises finissent par régresser de quelques dizaines de microns et se stabilisent avant la blessure (Ramon y Cajal, 1928; Zeng et al., 1994; Selles-Navarro et al., 2001). Les axones distaux, séparés de leur corps cellulaire, se fragmentent et subissent la dégénérescence wallérienne qui s'étend sur plusieurs semaines (Ludwin, 1990; Stichel and Muller, 1998).

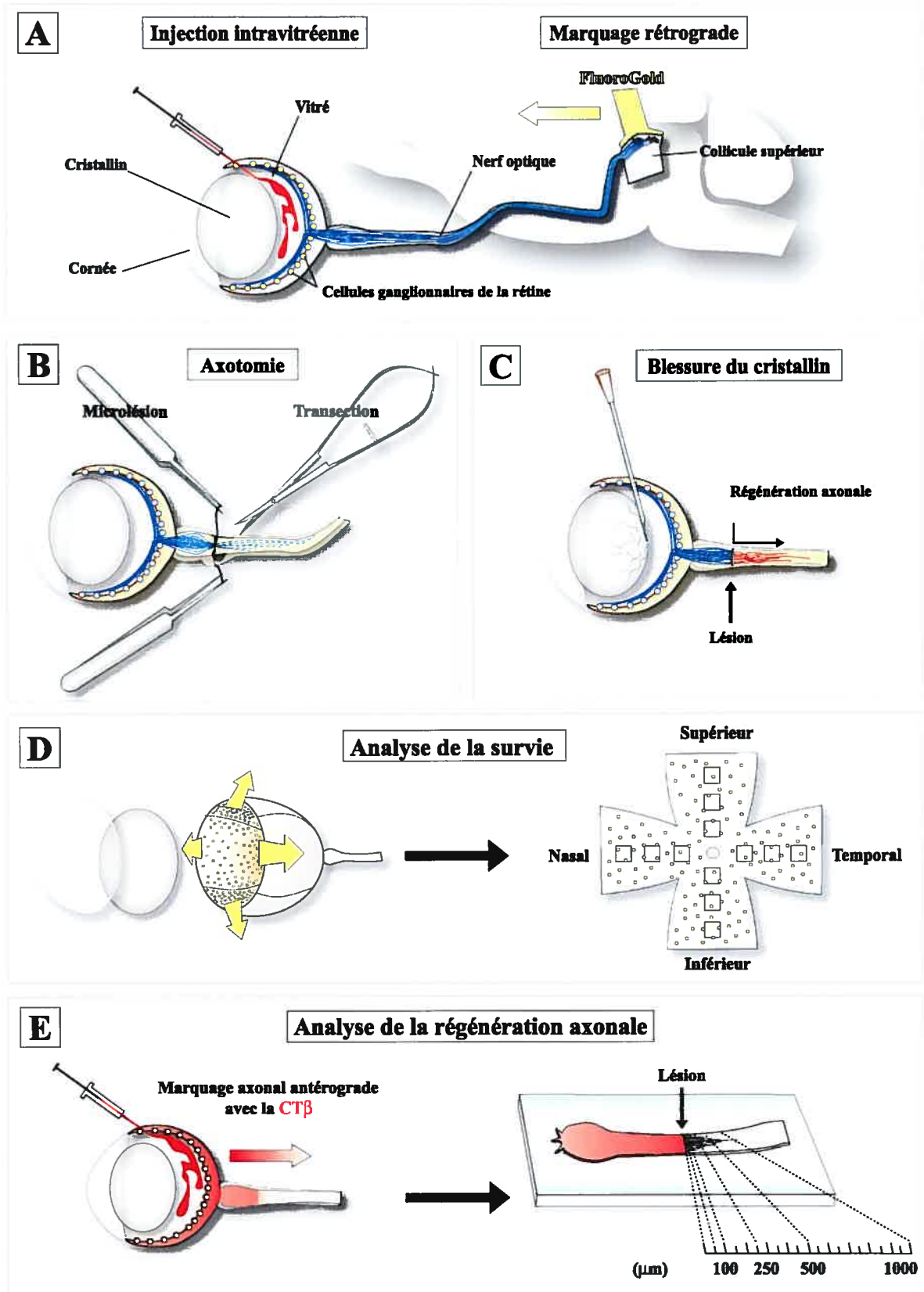


Figure 3. Protocole expérimental pour l'étude de la survie et la régénération axonale *in vivo*. (A) Les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) sont marquées grâce au transport axonal rétrograde d'un traceur fluorescent, le FluoroGold (FG), déposé à la surface du collicule supérieur. Les corps cellulaires des CGRs, situés dans la partie la plus interne de la rétine, peuvent être directement traités par injection intravitréenne à travers la sclérotique. (B) Dans le modèle d'axotomie des CGRs, le nerf optique est exposé hors de sa gaine en préservant l'apport sanguin par l'artère ophtalmique. Pour étudier la régénération axonale, une microlésion est réalisée en nouant une fine suture (10.0) autour du nerf optique. La ligature est maintenue serrée pendant une minute, puis retirée afin de replacer le nerf optique dans sa position anatomique. (E) Treize jours après la microlésion, les axones sont marqués par le transport antérograde de la sous-unité β de la toxine du choléra (CT β). Vingt-quatre heures plus tard, les nerfs optiques sont traités pour observer par immunohistochimie les axones marqués à la CT β sur coupes longitudinales. Les axones poussant dans le nerf optique distal, 50 μm , 100 μm , 250 μm , 500 μm et 1000 μm après le site de lésion sont dénombrés pour établir un profil quantitatif de régénération axonale pour chaque traitement. (B) Dans l'étude de la survie, le nerf optique est coupé avec des micro-ciseaux chirurgicaux à 1,5-2 mm de la tête du nerf optique. (D) Entre 1 et 4 semaines après la blessure, les CGRs ayant survécu sont visualisées grâce à la fluorescence du FG sur des rétines étalées. La survie est quantifiée dans 12 grilles disposées à 1, 2 et 3 mm du nerf optique à la surface des quatre quadrants (supérieur, temporal, inférieur, nasal) de la rétine. La surface de la rétine échantillonnée avec les 12 grilles représente 1 mm². (C) Selon le modèle de blessure du cristallin, une simple perforation du cristallin avec une aiguille induit l'activation des macrophages dans la rétine et la régénération axonale dans le nerf optique après microlésion. © Vincent Pernet.

I.3.2.2.) La réponse des cellules non-nerveuses.

Les astrocytes sont abondants dans le nerf optique entier et leurs fines extensions constituent un réseau dense communiquant par des jonctions lacunaires (*gap junction*) (Berry et al., 1996). Après un écrasement du nerf optique, les astrocytes deviennent réactifs, gonflent et libèrent de nombreuses molécules dans la matrice extracellulaire. Dans un premier temps, les astrocytes sont exclus du site de blessure puis envahissent la région endommagée (Selles-Navarro et al., 2001). Les astrocytes contribuent très activement à la formation d'une cicatrice qui représente une barrière inhibitrice à la régénération axonale dans le SNC (voir I.3.3.2., p21). La cicatrice gliale produite par les astrocytes est considérée comme une cause importante de l'absence de régénération axonale dans le SNC par rapport au SNP (Dezawa and Adachi-Usami, 2000).

Les macrophages activés infiltrent rapidement la région du nerf optique autour du site de lésion et phagocytent les débris des axones et de la myéline. Le recrutement des macrophages est très proéminent le 3^{ème} jour et reste élevé pendant la première semaine qui suit l'axotomie (Zeng et al., 1994). Bien que le nettoyage des débris de myéline par les macrophages semble a priori profitable à la croissance axonale, il n'est clairement pas suffisant pour observer de la régénération dans le nerf optique (David et al., 1990; Lazarov-Spiegler et al., 1996). Les macrophages sont normalement rares dans la rétine saine (Garcia-Valenzuela and Sharma, 1999; Leon et al., 2000). L'activation provoquée des macrophages dans la rétine stimule la croissance axonale et la survie neuronale (voir section I.5., p41).

Les cellules microgliales sont des monocytes qui dérivent des mêmes cellules progénitrices que les macrophages. Dans la rétine intacte, les cellules microgliales résident naturellement dans la couche fibreuse (où se trouvent les axones des CGRs) et dans la couche des cellules ganglionnaires (Raibon et al., 2002). Elles ont alors des extensions ramifiées qui sont caractéristiques de leur état de repos. Après une blessure du nerf optique, les cellules microgliales prolifèrent et leur état d'activation devient reconnaissable à leur forme améboïde (Figure 4). L'activation de la microglie est systématique et proportionnelle à la mort des CGRs lésés (Fischer et al., 2000). Les cellules microgliales facilitent la mort des CGRs et phagocytent leur débris dans la rétine (Thanos et al., 1993), alors que dans le nerf optique leur rôle paraît plutôt bénéfique à la régénération axonale (Raibon et al., 2002).

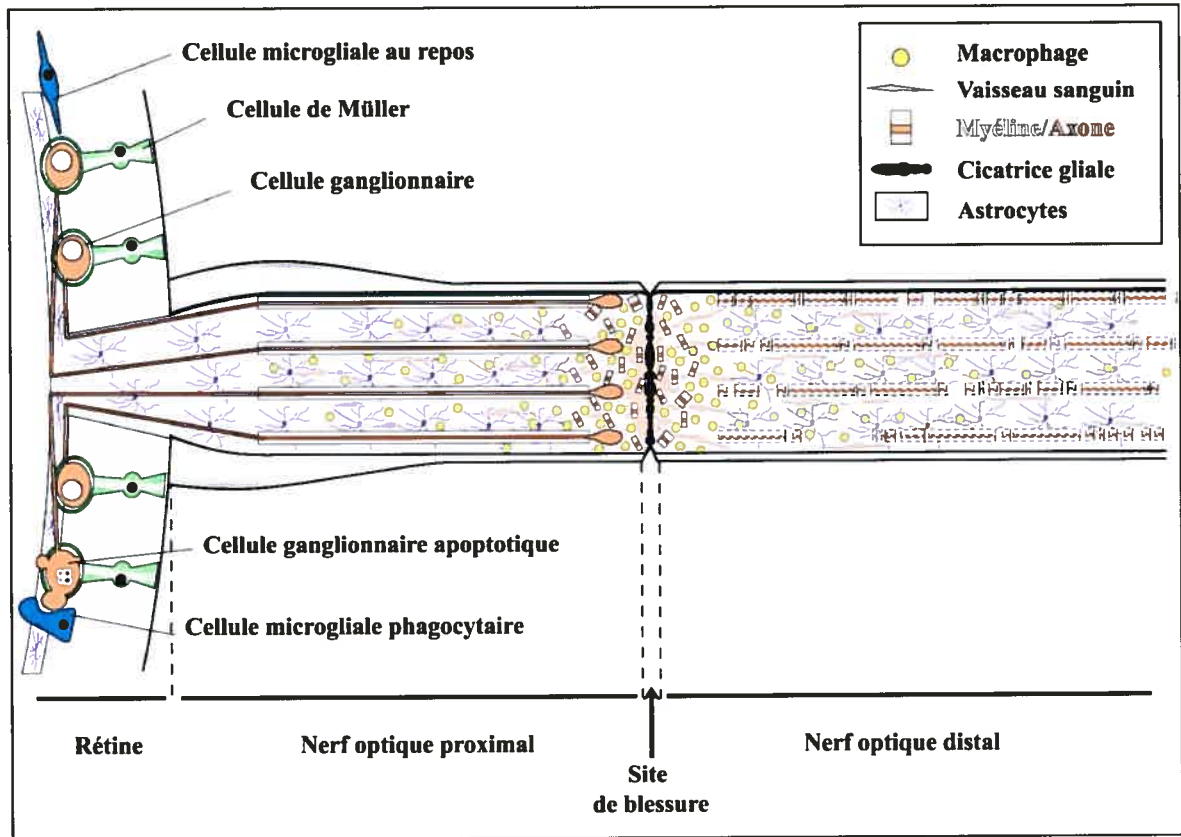


Figure 4. La blessure du nerf optique. L'écrasement du nerf optique sectionne les axones. Dans un premier temps, les terminaisons proximales des axones s'hypertrophient et prennent la forme de bâtons de golf. Ensuite, de fins prolongements bourgeonnent localement à partir des terminaisons ($\sim 5^{\text{eme}}$ jour post-axotomie) mais régressent par la suite. Dans le nerf optique distal, les axones se fragmentent et dégèrent (dégénérescence wallérienne). Les jours qui suivent l'axotomie, une cicatrice gliale est formée par les astrocytes du nerf optique et constitue une barrière physique et chimique à la croissance des axones. Les macrophages s'infiltrent autour du site de blessure pour débarrasser les débris de myéline et des axones endommagés. La région écrasée est très activement néovascularisée. Dans la rétine, les CGRs montrent des signes de mort tels que les corps apoptotiques et la condensation de la chromatine. Les cellules microgliales s'activent et phagocytent les débris des CGRs détruites. © Vincent Pernet.

Les cellules de Müller sont les principales cellules gliales dans la rétine. Les corps cellulaires des cellules de Müller sont localisés dans la couche nucléaire interne de la rétine et leurs extensions radiaires traversent l'épaisseur de la rétine (Figure 4). Les cellules de Müller jouent un rôle important d'osmorégulateur, de régulateur du pH, de recycleur des neurotransmetteurs (GABA et glutamate) et de réserves énergétiques dans la rétine (Newman and Reichenbach, 1996). Les prolongements des cellules de Müller s'élargissent en un pied qui englobe les corps cellulaires des CGRs. Après la blessure du nerf optique, les cellules de Müller entrent en gliose et se mettent à exprimer la *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) (Chen and Weber, 2002). La GFAP est un filament intermédiaire fortement augmenté par les astrocytes dans le cerveau après une blessure traumatique (Lewis and Fisher, 2003). Néanmoins, la fonction de la GFAP et les conséquences de la gliose sur la survie des CGRs sont mal connues.

Outre l'activation des nombreuses cellules immunitaires et des cellules gliales dans la rétine, la blessure du nerf optique s'accompagne de néovascularisation importante qui peut être visualisée par marquage immunohistochimique de la laminine (Selles-Navarro et al., 2001).

I.3.3.) Les molécules inhibitrices de la croissance axonale dans l'environnement.

I.3.3.1.) Les protéines inhibitrices de la myéline.

Depuis très longtemps, les protéines contenues dans la myéline ont été suspectées d'inhiber la croissance axonale après des blessures dans le SNC (Ramon y Cajal, 1928), mais ce n'est qu'au cours des 10 dernières années que les molécules inhibitrices de la myéline ont été identifiées. La découverte de la *Myelin-Associated Glycoprotein* (MAG) (McKerracher et al., 1994), Nogo-A (GrandPre et al., 2000) et *Oligodendrocyte Myelin glycoprotein* (OMgp) (Kottis et al., 2002; Wang et al., 2002b) a permis de clarifier l'origine inhibitrice de la myéline. Récemment, le récepteur *Nogo-66 Receptor* (NgR) pour une partie de Nogo-A (Nogo-66) a été identifié (Fournier et al., 2001; Fournier et al., 2002). En dépit de la différence de structure entre les protéines Nogo-A, MAG et OMgp, il a été démontré que toutes activaient le récepteur NgR de Nogo-66 (Fournier et al., 2001; Domeniconi et al., 2002; Liu et al., 2002; Wang et al., 2002b) (Figure 5). Cependant, NgR est attaché à la membrane cytoplasmique externe par un lien glycosylphosphatidylinositol

(GPI) et ne possède donc pas de domaine intracellulaire. La transduction du signal inhibiteur passe par p75 qui interagit avec NgR par l'intermédiaire de *Lrr and Ig domain-containing, noGO receptor-interacting protein* (LINGO) (Wang et al., 2002a; Mi et al., 2004). Cependant, plusieurs types de neurones du SNC comme les CGRs adultes n'expriment pas le récepteur p75 (Hu et al., 1998; Hu et al., 1999a; Park et al., 2005). La découverte récente de TROY, un récepteur de la famille des *Tumor Necrosis Factor Receptors* (TNFR) fortement exprimé par les CGRs, a démontré que p75 ou TROY jouait un rôle analogue dans le mécanisme de transduction du signal inhibiteur (Park et al., 2005; Shao et al., 2005) (Figure 5). De plus, on suspecte l'existence d'autres co-récepteurs de NgR similaires à p75 et TROY (Mandemakers and Barres, 2005).

I.3.3.2.) La cicatrice gliale.

En réponse à la blessure du nerf optique et du SNC en général, la formation d'une cicatrice gliale par les astrocytes réactifs a un impact très négatif sur la croissance axonale (Dezawa and Adachi-Usami, 2000). Les astrocytes envahissent le site de la lésion et sécrètent de nombreuses molécules dans la matrice extracellulaire tels que la laminine, la ténascine, et de nombreux protéoglycans (protéoglycan à héparan sulfate (HSPG), protéoglycan à chondroïtine sulfate (CSPG), protéoglycan à kératan sulfate (KSPG), protéoglycan à dermatan sulfate (DSPG)). En particulier, les CSPGs sont très inhibiteurs de la croissance axonale. Les CSPGs forment une famille de protéoglycans qui comportent un domaine glycosaminoglycan (GAG) répulsif pour les cônes de croissance (Properzi et al., 2003). Après un écrasement très local du nerf optique, l'expression de CSPG est focalisée sur le site de blessure (Selles-Navarro et al., 2001; Sapieha et al., 2005). La dégradation de la partie inhibitrice des CSPGs (GAG) par la chondroïtinase ABC dérivée de la bactérie *Proteus vulgaris* permet la régénération axonale *in vitro* et *in vivo* (Silver and Miller, 2004). La gliose des astrocytes dans la blessure du nerf nuit à la régénération axonale en formant une barrière physique et chimique.

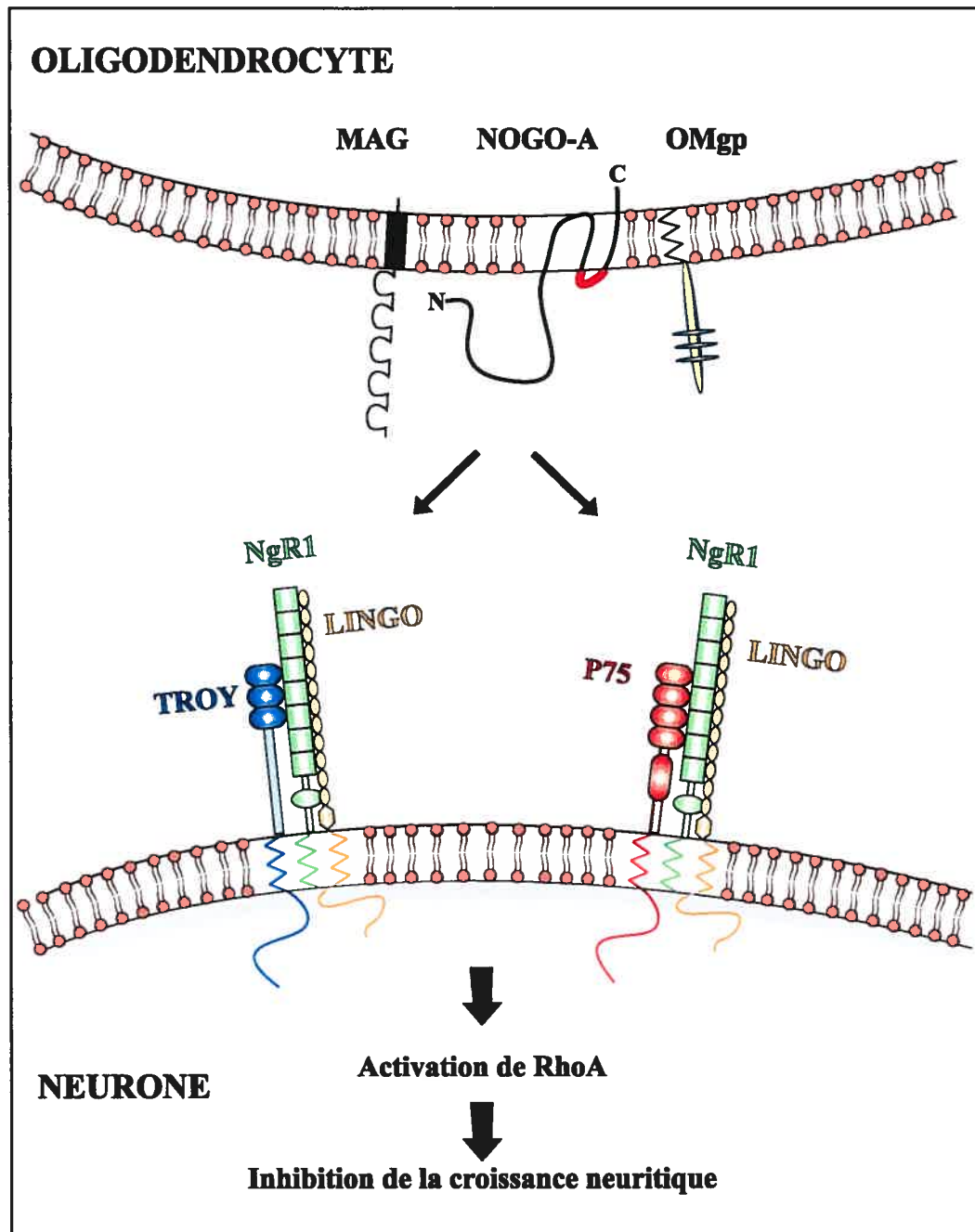


Figure 5. Les protéines inhibitrices de la myéline. Les protéines de la myéline MAG, NOGO-A et OMgp ont pour récepteur commun NgR. Le récepteur NgR forme un complexe hétérotrimérique avec LINGO et p75 ou TROY qui sont nécessaires à la transduction du signal intracellulaire. L'activation intracellulaire de RhoA inhibe la polymérisation du cytosquelette dans le cône de croissance et bloque la régénération axonale. © Vincent Pernet.

I.3.3.3.) L'activation intracellulaire de RhoA.

La protéine GTPase RhoA régule l'assemblage du cytosquelette du cône de croissance pendant le développement mais est aussi un médiateur intracellulaire commun aux différentes protéines inhibitrices de la myéline (Lehmann et al., 1999; Dubreuil et al., 2003; Fournier et al., 2003). La liaison de MAG et NOGO-A avec p75 est capable d'initier l'activation de RhoA en le dissociant de son inhibiteur Rho-GDI (Yamashita and Tohyama, 2003). La convergence des différentes molécules inhibitrices sur RhoA permet de lever les multiples inhibitions à la croissance axonale en ciblant RhoA. Par exemple, l'inhibition de RhoA par C3-ADP-ribosyltransférase (C3) extrait de *Botulinium clostridium* rend possible la croissance axonale sur des substrats très inhibiteurs comme ceux recouverts par MAG ou par des protéines de la famille des CSPGs (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002; Borisoff et al., 2003). *In vivo*, l'inhibition de RhoA ou de la molécule en aval, *Rho Kinase* (ROCK), a notamment permis d'observer de la régénération dans le nerf optique et la moelle épinière après axotomie (Lehmann et al., 1999; Dergham et al., 2002; Fournier et al., 2003; Fischer et al., 2004; Bertrand et al., 2005).

I.3.4.) La mort apoptotique des cellules ganglionnaires de la rétine.

L'axotomie du nerf optique, provoque la mort des CGRs de manière stéréotypée. Chez le rat albinos, la densité de CGRs commence à diminuer vers le 5^{ème} jour après l'axotomie du nerf optique effectuée au niveau de la tête du nerf optique (1,5-2 mm derrière la rétine) (Villegas-Perez et al., 1988b; Mansour-Robaey et al., 1994). Environ 50% des CGRs meurent une semaine après la transection du nerf optique et elles ne sont plus que 5-10% à survivre après deux semaines. En outre, ce patron de mort est directement influencé par la distance à laquelle l'axone est sectionné du corps cellulaire. Par exemple, les cellules meurent plus lentement après la blessure intracrânienne du nerf optique, plus éloignée de la rétine (Villegas-Perez et al., 1993; Berkelaar et al., 1994).

Les mécanismes d'initiation de la mort des CGRs axotomisées ne sont pas connus, mais de nombreuses études ont décrit les signes spécifiques de l'apoptose et démontrent sa prépondérance dans ce type de blessure. La condensation de la chromatine et le fractionnement de l'ADN nucléaire des CGRs, typique de l'apoptose, sont détectables dès le 2^{ème} jour après l'axotomie du nerf optique (Bonfanti et al., 1996; Garcia-Valenzuela and

Sharma, 1999). Le pic d'apoptose est atteint vers le 6^{ème} jour, dans la phase rapide de la mort des CGRs.

I.4.) Les facteurs neurotrophiques dans le modèle de l'axotomie.

I.4.1.) Les facteurs neurotrophiques dans la mort neuronale.

I.4.1.1.) La théorie des facteurs neurotrophiques.

Les protéines de la famille des neurotrophines sont de puissants agents de croissance neuritique et de survie neuronale. Au début des années 1950, le *Nerve Growth Factor* (NGF) fut le premier facteur neurotrophique découvert par Levi-Montalcini et Hamburger initialement dans les sarcomes de souris (Levi-Montalcini and Hamburger, 1951), puis le venin de serpent (Levi-Montalcini and Cohen, 1956) et la glande salivaire sous-maxillaire (Levi-Montalcini and Cohen, 1960). Ces trois sources de NGF montrèrent une impressionnante activation de la croissance axonale sur des co-cultures de neurones sympathiques et sensoriels. *In vivo*, l'injection de NGF dans des œufs de poulet induisit l'hyperinnervation des viscères et l'intrusion des fibres nerveuses sympathiques dans les veines (Levi-Montalcini and Cohen, 1956, 1960). Par la suite, d'autres protéines analogues à NGF, le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) (Barde et al., 1982), la *Neurotrophin 3* (NT3) (Hohn et al., 1990) et la *Neurotrophin 4/5* (NT4/5) (Berkemeier et al., 1991; Hallbook et al., 1991) ont été découvertes et ont formé la famille des neurotrophines (NT).

En plus de leur effet sur la croissance neuritique, les NT se sont avérées des facteurs de survie neuronaux puissants. Il a été proposé que la survie des neurones dépendait des neurotrophines produites par leurs organes cibles, lieu où aboutissent les terminaisons axonales (Oppenheim, 1989). On a suspecté que la mort développementale des neurones surnuméraires était due à la quantité limitée de facteurs neurotrophiques délivrés par la cible (Levi-Montalcini, 1987). Les axones seraient donc en compétition pour se connecter à leur cible et pour le maintien de leur survie. De plus, ce lien trophique donnait une explication à la mort de certains neurones centraux après leur dénervation. Dans le SNC, la théorie des facteurs neurotrophiques a été développée autour des effets du BDNF sur les CGRs.

I.4.1.2.) Rôle du BDNF dans le maintien des cellules ganglionnaires de la rétine.

Après la purification du BDNF par Barde (1982) à partir de cerveaux de porc, des études ont mis en évidence les propriétés exceptionnelles de ce facteur neurotrophique sur la croissance axonale et la survie neuronale de neurones sensoriels de la moelle épinière (Lindsay et al., 1985; Davies et al., 1986). Les premières observations des effets de survie du BDNF dans le SNC ont été réalisées sur des cellules ganglionnaires de la rétine en culture (Johnson et al., 1986). Le fait que la survie des CGRs devenait dépendante du BDNF après la période de projection axonale a été considéré comme la validation de la théorie des facteurs neurotrophiques dans le SNC (Rodriguez-Tebar et al., 1989). Cette idée a été particulièrement exploitée dans le modèle d'axotomie du nerf optique pour expliquer la mort des CGRs. En effet, le BDNF est produit en grande quantité par le collicule supérieur (et le tectum pour les vertébrés inférieurs) et transporté rétrogradement dans les axones jusqu'aux corps cellulaires des CGRs (Herzog and von Bartheld, 1998; Ma et al., 1998). Donc, après axotomie, les CGRs perdant leur contact avec leur cellule cible dépériraient par privation de facteurs neurotrophiques transportés rétrogradement. Cette hypothèse semble particulièrement valide pour les CGRs en développement. L'ablation du collicule supérieur ou sa destruction chimique chez le jeune rat conduit à la mort rapide des CGRs dont les premiers signes sont visibles dès 24 heures après la blessure (Harvey and Robertson, 1992; Spalding et al., 2004). L'injection de BDNF dans le collicule supérieur augmente le taux de survie des CGRs pendant la période de mort développementale (Ma et al., 1998). Mais dans la rétine adulte, la survie des CGRs est bien moins dépendante du collicule supérieur. Les CGRs adultes meurent beaucoup moins vite que les CGRs de rat nouveau-né après l'axotomie (Bonfanti et al., 1996) et l'élimination chirurgicale ou chimique du collicule supérieur n'affecte pas la survie des CGRs adultes (Perry and Cowey, 1982; Delisle and Carpenter, 1984). Il est possible que les CGRs postnatales s'affranchissent de leur lien trophique avec leur cible grâce à la production croissante de BDNF dans la rétine postnatale (Ma et al., 1998; Seki et al., 2003).

La génération de souris mutantes dépourvues des gènes encodant pour les neurotrophines a permis d'étudier l'importance de ces facteurs dans la mort développementale et le maintien des CGRs adultes. De manière très surprenante, l'élimination du gène de BDNF ne semble pas augmenter la mort des CGRs pendant le

développement (Cellerino et al., 1997). Chez ces animaux, une compensation par NT4/5, qui active aussi le récepteur *Tropomyosin-related kinase B* (TrkB) (voir I.4.1.4.b., p27), est improbable. En effet, la délétion de *trkb* n'accroît le taux de mort pendant le développement que de façon transitoire mais ne modifie pas le nombre final des CGRs après la période de maturation (Pollock et al., 2003). Toutefois, une baisse légère et lente (20%) des CGRs chez les animaux adultes *trkb*^{-/-} suggère que le BDNF participe au maintien de la survie à plus long terme (Rohrer et al., 2001).

I.4.1.3.) Effets des facteurs neurotrophiques sur les cellules ganglionnaires de la rétine axotomisées.

L'administration de NT exogènes telles que le BDNF, NT3, ou NT4/5 dans l'espace vitréen ralentit la mort des CGRs après la transection du nerf optique. Néanmoins, les effets de survie varient beaucoup entre ces facteurs neuroprotecteurs. Parmi eux, le BDNF est celui qui protège le plus et le plus longtemps les CGRs après l'axotomie (Mey and Thanos, 1993; Mansour-Robaey et al., 1994; Peinado-Ramon et al., 1996; Di Polo et al., 1998; Klocker et al., 2000; Chen and Weber, 2001). Par exemple, *in vivo* le BDNF protège 40% de CGRs 2 semaines après axotomie par rapport à une rétine non traitée où seules 5-10% CGRs survivent. L'action neuroprotectrice du BDNF est dépendante de la dose administrée (Rodriguez-Tebar et al., 1989; Mansour-Robaey et al., 1994). Toutefois, *in vivo*, la survie des CGRs requiert un niveau de BDNF nettement supérieur à ceux utilisés *in vitro*. Par exemple, pour stimuler la survie des CGRs il suffit de 50-100 ng/mL de BDNF en culture, alors qu'*in vivo* la dose de BDNF injectée dans le vitré doit correspondre à ~100 000 ng/mL. Les puissants effets neuroprotecteurs du BDNF ont fait de cette neurotrophine un facteur très étudié dans les mécanismes de survie neuronale en général.

I.4.1.4.) Mécanismes moléculaires de la survie induite par le BDNF.

I.4.1.4.a.) Sécrétions des facteurs neurotrophiques.

Les NT partagent une grande homologie de séquence bien qu'ils soient transcrits à partir de gènes distincts. Les protéines des NT sont d'abord traduites sous forme de pré-pro-protéines de ~240 à 260 acides aminés. La maturation protéique est assurée par le clivage enzymatique des pré-séquences dans le réticulum endoplasmique et l'excision des

pro-domaines dans le réseau transgolgien ou les vésicules de sécrétion immatures (Figure 6A) (Lessmann et al., 2003). Les NT matures et immatures sont transportées dans des vésicules de petit calibre (50-100 nm) et sont sécrétées dans le milieu extracellulaire de façon constitutive. Alternativement, les NT sont contenues dans de larges granules (100-300 nm) dont la fusion avec la membrane cytoplasmique dépend du Ca^{2+} . Ainsi, le BDNF est sécrété dans le cerveau par une voie continue, non-réglée, et par une autre voie dépendante du niveau d'activité neuronale.

Dans la rétine, le BDNF est principalement produit par les cellules de la couche des CGRs, et plus faiblement par les cellules de la couche nucléaire interne. L'expression du BDNF est modulée par les stimuli visuels. Entre l'ouverture des paupières à l'âge postnatal P14-P15 et le stade adulte, le niveau d'ARNm (Cao et al., 1997; Seki et al., 2003) et de la protéine du BDNF (Frost et al., 2001; Seki et al., 2003) augmente de 2 à 3 fois dans la rétine de rongeur. La privation de lumière par la couture des paupières (Seki et al., 2003) ou le conditionnement à l'obscurité (Pollock et al., 2001) abaisse la production rétinienne de NT. Au contraire, les NT augmentent dans la rétine d'animaux élevés en lumière continue par rapport aux animaux gardés dans des conditions cycliques d'illumination (12h de lumière/12h d'obscurité). Le niveau plus bas de BDNF pendant la phase nocturne suggère que le BDNF suit des variations circadiennes (Pollock et al., 2001). La synthèse rétinienne de BDNF, contrôlée par la lumière, influence la maturation postnatale du système visuel jusque dans le cortex (Mandolesi et al., 2005).

I.4.1.4.b.) Les récepteurs du BDNF p75 et TrkB.

Le BDNF se lie spécifiquement au récepteur à tyrosine kinase TrkB et au récepteur p75 de la superfamille des *Tumor Necrosis Factor Receptors* (TNFR). Les autres NT (NT3, NT4/5, NGF) possèdent une affinité équivalente à BDNF pour le p75, mais se lient sélectivement à d'autres récepteurs de la famille Trk (Roux and Barker, 2002). NGF se lie au récepteur TrkA; NT3 a pour récepteur principal TrkC et se fixe avec une affinité plus faible à TrkA et TrkB. Le récepteur TrkB transmet les effets neuroprotecteurs du BDNF tandis que le p75 peut déclencher la mort neuronale. Donc, en fonction des récepteurs qui

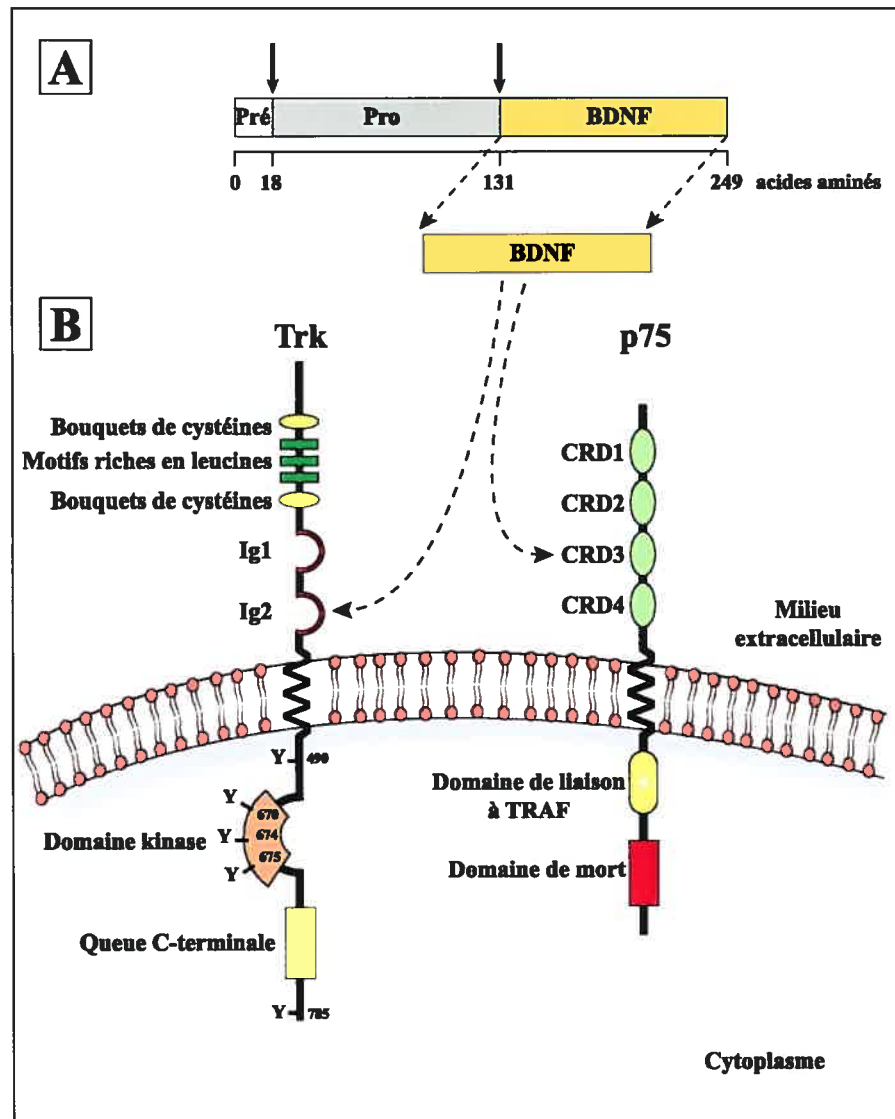


Figure 6. Structure du BDNF et ses récepteurs TrkB et p75. (A) La forme pré-proprotéine du BDNF est transformée par des convertases en une forme mature (flèches). **(B)** Le BDNF se lie aux domaines Ig2 et CRD3 des récepteurs TrkB et p75 respectivement. De manière générale, les récepteurs Trk comportent des bouquets de cystéines et des motifs riches en leucine dans la région extracellulaire N-terminale. Deux domaines à immunoglobulines Ig1 et Ig2 jouxtent la membrane cytoplasmique. Lors de l'activation du récepteur, le domaine kinase phosphoryle les tyrosines (Y670, Y674, Y675) dans la boucle intracellulaire et deux autres tyrosines (Y490 et Y785) importantes dans les mécanismes de signalisation (voir figure 6). Le récepteur p75 appartient à la superfamille des récepteurs de mort TNFR. Quatre répétitions de domaines riches en cystéines (CDR1-4) sont typiques des récepteurs de cette famille. Du côté intracellulaire, un « domaine de mort » (DD) initie la cascade d'apoptose. Certains effets de survie activés par le p75 seraient médiés par l'interaction des protéines TRAF avec un domaine de liaison en amont de DD. © Vincent Pernet.

ont présents à la surface des neurones, un même facteur neurotrophique peut paradoxalement activer la mort ou la survie (Miller and Kaplan, 2001).

Les Trk partagent une structure similaire avec deux bouquets de cystéines encadrant des motifs riches en leucine du côté N-terminal extracellulaire, suivis de deux domaines à immunoglobulines (Ig1 et Ig2) jouxtant la membrane (Figure 6B). Le domaine Ig2 de TrkA et TrkB joue un rôle particulièrement important dans les interactions avec les NT (Huang and Reichardt, 2003). La région cytoplasmique contient un domaine tyrosine kinase essentiel pour la transduction du signal (voir section I.4.1.4.c., p30). Dans la rétine des vertébrés en général, le récepteur TrkB est largement exprimé par les cellules de la rétine interne, incluant les CGRs et les cellules amacrines, et dans une sous-population de photorécepteurs de la rétine externe (Jelsma et al., 1993; Cellerino and Kohler, 1997; Di Polo et al., 2000). Le BDNF peut donc directement activer les voies de survie en se liant à TrkB sur les CGRs.

Le récepteur p75 appartient à la famille des TNFR étroitement liés à la mort cellulaire. L'extrémité extracellulaire de p75 comprend 4 répétitions de domaines riches en cystéine (CRD1-4) qui sont communs aux TNFR (Roux and Barker, 2002) (Figure 6B). Le domaine CDR3 serait notamment impliqué dans les interactions avec les NT. La région cytoplasmique présente un domaine de mort de ~80 acides aminés caractéristique des TNFR (*Death Domain*, DD) en amont de la signalisation apoptotique. Par ailleurs, le p75 aurait certains effets de survie par l'intermédiaire d'autres régions interagissant avec les *TNFR-Associated Factors* (TRAF4,6).

Dans la rétine, l'expression de p75 est généralement retrouvée dans les cellules de Müller et les cellules bipolaires mais sa présence dans les CGRs varie entre les espèces. Le récepteur p75 est exprimé dans les CGRs de poulet qui ont souvent été utilisées pour étudier les effets du BDNF ou d'autres neurotrophines (Herzog and von Bartheld, 1998; von Bartheld and Butowt, 2000). Par exemple, l'activation du récepteur p75 par le NGF stimule la mort des CGRs embryonnaires de poulet (Frade and Barde, 1998; Frade et al., 1999). De plus, chez les CGRs de poulet adulte, le BDNF est transporté antérogradement dans l'axone en se liant à p75 ou TrkB (Butowt and von Bartheld, 2005). Néanmoins, il est important de souligner que chez les CGRs de rats adultes, intactes ou axotomisées, le récepteur p75 n'est pas exprimé et donc n'est pas impliqué dans la signalisation du BDNF

(Hu et al., 1998; Hu et al., 1999b; Park et al., 2005). Par conséquent, chez le rat, p75 ne participe pas à la mort développementale des CGRs (Ding et al., 2001) et seul TrkB est impliqué dans le transport antérograde du BDNF dans les axones des CGRs de rat.

I.4.1.4.c.) Signalisation intracellulaire de la survie passant par TrkB.

La présence du récepteur TrkB à la surface des neurones du SNC est régulée par l'activité neuronale. La dépolarisation ou l'augmentation intracellulaire d'AMPC recrutent les récepteurs TrkB de la réserve intracellulaire vers la membrane (Meyer-Franke et al., 1998). C'est pourquoi la dépolarisation ou l'AMPC sont nécessaires à la survie induite par les facteurs neurotrophiques *in vitro* (Meyer-Franke et al., 1995). Une fois activés par la liaison des facteurs neurotrophiques, les récepteurs Trk forment des homodimères qui s'autophosphorylent sur les résidus tyrosines du côté cytoplasmique (Figure 6B et Figure 7). Les groupes phospho-tyrosines (Y490, Y670, Y674, Y675, Y785) stimulent les voies de signalisation intracellulaires *Extracellular Signal-Regulated Kinase*_{1/2} (Erk_{1/2}), *Phosphatidylinositol-3-Kinase* (PI-3K) et *Phospholipase Cγ* (PLCγ) (Kaplan and Miller, 2000; Chao, 2003; Huang and Reichardt, 2003). Les voies Erk_{1/2} et PI-3K sont toutes les deux activées par la liaison de la protéine adaptatrice *Src homologous and Collagen-like* (Shc) à la tyrosine phosphorylée en position Y490. Si cette tyrosine est substituée par un acide aminé phénylalanine dans TrkA ou TrkB, l'activation de P-Erk_{1/2} et P-Akt par les facteurs neurotrophiques NGF et BDNF devient impossible et leurs effets sur la survie et la croissance axonale disparaissent chez des neurones sympathiques (Atwal et al., 2000).

Dans la voie de Erk_{1/2}, la tyrosine phosphorylée Y490 recrute Shc qui active successivement *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), *Son Of Sevenless* (SOS), Ras, *Mapk/Erk Kinase1* (MEK1), Erk_{1/2}, *Ribosomal S6 kinase* (Rsk), et *cAMP Response Element Binding protein* (CREB). Bonni et ses collègues ont rapporté que la survie des cellules granulaires du cervelet supportée par le BDNF dépendait de la voie Erk_{1/2}. En absence de support trophique, l'activation directe de MEK1 est suffisante pour inhiber l'apoptose, ce qui démontre l'importance de la voie Erk_{1/2} dans les mécanismes de survie. En aval de Erk_{1/2}, Rsk supprime les mécanismes d'apoptose en phosphorylant la protéine pro-apoptotique Bad sur la sérine 112 (voir I.4.1.4.d., p35). Rsk active également le facteur de transcription CREB par phosphorylation de la sérine 133 (Bonni et al., 1999). La

phosphorylation de CREB sur la sérine 133 peut être déclenchée par l'administration de NGF directement sur le corps cellulaire des neurones sympathiques ou bien à l'extrémité de l'axone et par le transport rétrograde du complexe NGF-TrkA activé jusqu'au noyau (Riccio et al., 1999). Le NGF active le promoteur du gène de bcl-2 dans les cellules PC12 selon un mécanisme dépendant de Erk_{1/2} (Liu et al., 1999). *In vivo*, l'expression d'une forme constitutivement active de CREB dans les cellules olfactives sensorielles inhibe la mort apoptotique et s'accompagne de l'expression de Bcl-2 (Watt et al., 2004). La transcription de Bcl-2 par CREB apparaît comme un mécanisme de survie important des facteurs neurotrophiques. Il a donc été proposé que le BDNF stimulait la survie neuronale à deux niveaux : en réprimant l'apoptose par Bad dans le cytoplasme et en activant l'expression de gènes de survie dans le noyau via CREB (Bonni et al., 1999). La voie PI-3K passe par l'activation en série des intermédiaires Shc, Grb2, *Grb2-associated binder 1* (Gab1), PI-3K, *Phosphoinositide-dependent kinase-1, 2* (PDK-1/PDK-2) et *Protein Kinase B* (Akt) qui forment une autre cascade de signalisation à partir de Trk. La voie de signalisation PI-3K/Akt est étroitement impliquée dans la survie neuronale activée par les neurotrophines telles que le BDNF ou le NGF (Kaplan and Miller, 2000). Pour activer PI-3K, Shc requiert la participation de la protéine adaptatrice Gab1 (Figure 7). En aval de PI-3K, la protéine kinase à sérine/thréonine Akt (protéine kinase B) est nécessaire aux effets de survie du NGF et peut, à elle seule, maintenir les neurones sympathiques en vie (Crowder and Freeman, 1998). Dans les cellules granulaires du cervelet, Akt inhibe l'apoptose en phosphorylant la protéine pro-apoptotique Bad sur la sérine 136 (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997). Une fois phosphorylée, Bad n'interagit plus avec la protéine de survie Bcl-x_L et se fixe à la protéine cytosolique 14-3-3 (Zha et al., 1996). Dans ce cas, Bad ne peut donc plus initier la cascade apoptotique passant par les caspases (voir I.4.1.4.d., p35).

L'importance relative des voies PI-3K et Erk_{1/2} dans la survie neuronale fait encore l'objet de beaucoup de controverse. En effet, les facteurs neurotrophiques activent les voies de signalisation MEK/Erk_{1/2} et PI-3K/Akt qui, en théorie, ont toutes les deux la capacité de stimuler la survie neuronale. Cependant, la survie des motoneurones stimulée par le BDNF semble être uniquement supportée par la voie Erk_{1/2} alors que l'inhibition de la voie PI-3K avec des inhibiteurs pharmacologiques n'affecte pas la survie (Dolcet et al., 1999).

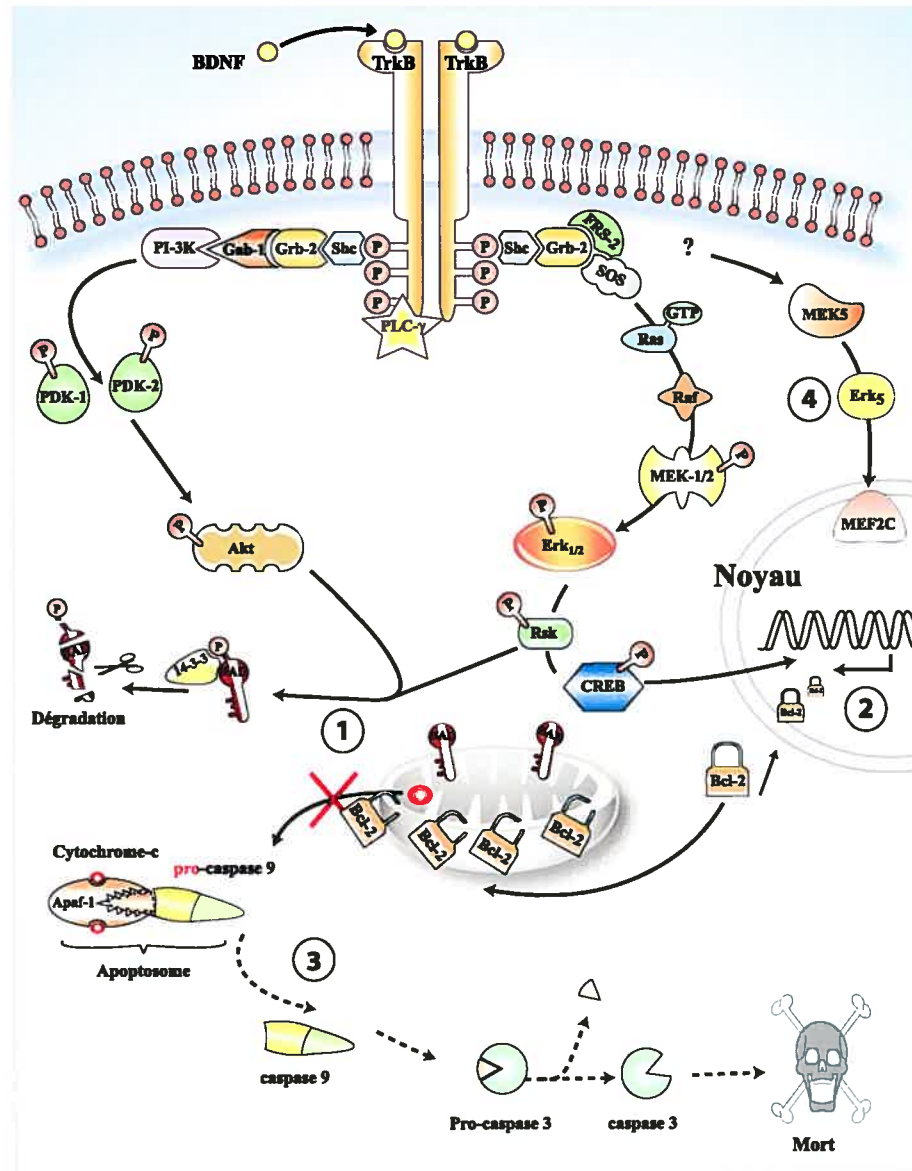


Figure 7. Mécanismes de survie du BDNF/TrkB contre l'apoptose. La liaison du BDNF à son récepteur TrkB active les voies de signalisation PLC γ , Ras/Raf/Erk $_{1/2}$ et PI-3K/Akt. Ces deux dernières cascades moléculaires inhibent l'activation des caspases en dégradant la protéine pro-apoptotique Bad et en empêchant la formation de l'apoptosome (1). De plus, la voie Erk $_{1/2}$ /CREB maintient les caspases inactives grâce à la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (2). La voie MEK5/Erk $_5$ est une voie parallèle de survie qui est activée par les neurotrophines (4). La présence de Bcl-2 dans la membrane mitochondriale externe empêche la libération du cytochrome-c dans le cytoplasme et s'oppose à la formation de l'apoptosome. Après la blessure, la cascade des caspases est déclenchée par la formation de l'apoptosome grâce à la libération de cytochrome-c hors de la mitochondrie (3). Le clivage de la procaspase 9 en caspase 9 active stimule à son tour le passage de la procaspase 3 en caspase 3. La caspase 3 est une caspase effectrice qui dégrade les macromolécules (ADN, protéines) vitales pour la cellule. © Vincent Pernet.

À l'inverse, certains groupements ont rapporté que la voie PI-3K/Akt contribuait à ~80% des effets de survie du NGF sur les neurones sympathiques (Kaplan and Miller, 2000). Pour expliquer ces différences, certains auteurs ont proposé que la voie PI-3K jouait un rôle prépondérant dans la survie neuronale « basale », induite par les facteurs neurotrophiques, alors que la voie Erk_{1/2} serait plus spécifiquement requise pour inhiber la mort neuronale après une blessure (Kaplan and Miller, 2000; Hetman and Gozdz, 2004). En culture, la privation de facteurs neurotrophiques est une technique largement employée pour étudier les mécanismes d'apoptose qui se mettent en place « par défaut ». Ainsi, Cavanaugh et ses collaborateurs ont observé que la survie des neurones corticaux est soutenue par le BDNF selon un mécanisme dépendant de la voie PI-3K/Akt (Hetman et al., 1999). Dans cette même étude, la voie Ras/Erk_{1/2} serait la voie majeure de survie activée par le BDNF pour empêcher l'apoptose déclenchée chimiquement par la camptothécine. Cette hypothèse fait une distinction importante entre la mort par défaut et la mort induite par une blessure, mais n'est pas vérifiée dans plusieurs autres études. Par exemple, l'érythropoïétine (EPO) stimule la survie des CGRs *in vitro* après la privation de facteur neurotrophique et *in vivo* après une blessure du nerf optique (Weiskaupt et al., 2004). L'inhibition de la phosphorylation d'Akt induite par l'EPO abolit la survie neuronale aussi bien dans le modèle de privation de support trophique que celui de blessure axonale. Dans un même modèle de blessure comme celui de la transection du nerf optique, le rôle respectif de Erk_{1/2} et PI-3K dans la survie n'est pas clair. En utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de Erk_{1/2} (PD98059) et PI-3K (wortmannin ou LY294002), Klocker et ses collègues ont trouvé que les effets de survie du BDNF sur les CGRs axotomisées n'étaient pas atténués par l'inhibition de l'une ou de l'autre voie (Klocker et al., 2000). Ces auteurs en ont déduit que les deux voies de signalisation activaient des mécanismes de survie intracellulaires redondants. Le travail de Nakazawa et de ses collègues est en totale contradiction avec ces conclusions. Ces derniers ont observé que l'inhibition de la voie Erk_{1/2} (avec U0126) ou PI-3K (avec LY294002) réduisait séparément de ~40% la survie des CGRs axotomisées après l'administration de BDNF, suggérant que les deux voies de signalisation sont nécessaires à la neuroprotection (Nakazawa et al., 2002). Néanmoins, plusieurs études ont montré que la survie des CGRs par le BDNF ou TrkB requerrait l'activation de Erk_{1/2} alors que la voie PI-3K n'apparaissait pas indispensable (Meyer-Franke et al., 1995; Cheng et al., 2002). Par

exemple, la survie des CGRs par l'activation de TrkB est perdue après le blocage de la voie Erk_{1/2} avec l'inhibiteur de MEKI, PD98059 (Cheng et al., 2002). Par contre, l'inactivation de la voie PI-3K avec la molécule LY294002 n'affecte pas la survie passant par TrkB. Au contraire, dans la survie des CGRs induite par l'administration d'*Insulin-like Growth Factor* (IGF-1), la phosphorylation d'Akt apparaît primordiale (Kermer et al., 2000). L'activation d'Akt par IGF-1 est réduite par l'inhibition de PI-3K avec la wortmannin et mène à l'abolition complète des effets neuroprotecteurs. Dans ce dernier exemple, IGF-1 est donc capable de stimuler la survie en activant uniquement PI-3K/Akt. L'importance de la voie PI-3K/Akt et Erk_{1/2} dans la survie des neurones blessés est une question fondamentale qui reste très controversée avec l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques. Un des objectifs principaux de la thèse a été de tester l'implication de la voie Erk_{1/2} dans la survie des neurones adultes blessés en régulant directement cette cascade de signalisation.

Il a récemment été démontré que les neurotrophines activaient la survie neuronale par une autre voie de signalisation, la voie passant par *Extracellular signal-regulated kinase5* (Erk₅). Le BDNF et les autres neurotrophines NGF, NT3, NT4 stimulent la survie des cellules ganglionnaires de la racine dorsale de la moelle épinière (DRG) (Watson et al., 2001), des cellules granulaires du cervelet (Shalizi et al., 2003) et des cellules corticales (Cavanaugh et al., 2001; Liu et al., 2003) en activant la phosphorylation de Erk₅ pendant le développement. L'activation de Erk₅ dépend de l'activité kinase des récepteurs Trk mais présente la particularité d'être indépendante de la dépolarisation, et donc de l'activité neuronale, contrairement à Erk_{1/2} (Cavanaugh et al., 2001). La voie Erk₅ induit la survie neuronale en activant spécifiquement l'expression du facteur de transcription *Myocyte Enhancer Factor 2C* (MEF2C) dans les neurones embryonnaires. L'inhibition de Erk₅ ou de MEF2C bloque la survie des neurones corticaux stimulée par le BDNF (Liu et al., 2003). De plus, la transfection avec le gène encodant la forme constitutivement active de MEF2C suffit à stimuler la survie des DRG et des cellules corticales (Watson et al., 2001; Liu et al., 2003). Une preuve témoignant de l'indépendance des deux voies est que, contrairement à Erk_{1/2}, Erk₅ n'active pas le facteur de transcription Elk1 dans les cellules de phéochromocytome (PC12) (Cavanaugh et al., 2001). Parallèlement à la voie Erk_{1/2}, la cascade de signalisation Erk₅/MEF2C est capable d'exécuter les mécanismes

intracellulaires de la survie neuronale en aval de Trk. Cette voie alternative à Erk_{1/2} n'a cependant pas encore été explorée dans la survie des neurones adultes. Par ailleurs, il s'est avéré que les inhibiteurs pharmacologiques de MEK1 couramment utilisés pour étudier Erk_{1/2} dans la survie neuronale, tels que U0126 et PD098059, bloquent également MEK5, l'activateur de MAPK5/Erk₅ (Kamakura et al., 1999; Mody et al., 2001). Par conséquent, certains effets attribués dans un premier temps à Erk_{1/2} pourraient être dus à Erk₅. Par exemple, la survie des CGRs axotomisées observée après la stimulation avec le BDNF pourrait impliquer la voie MEK5/Erk₅. Cette éventualité renforce le premier objectif de la thèse qui était de déterminer l'implication de la voie Erk_{1/2} dans la survie des CGRs.

I.4.1.4.d.) La cascade des caspases.

L'activation de la cascade des caspases par l'apoptosome est déterminante pour la dégradation cellulaire dans l'apoptose (Hengartner, 2000) (Figure 7). C'est la sortie du cytochrome-c de la mitochondrie vers le cytoplasme qui déclenche la formation de l'apoptosome par l'assemblage du cytochrome-c avec *Apoptosis protease-activating factor-1* (Apaf-1) et la procaspase 9 (Figure 7). La sortie du cytochrome-c de la mitochondrie est normalement inhibée par la présence des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la membrane mitochondriale externe. Cependant, lorsque la quantité de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, telles que Bad et Bax, dépasse celle des protéines anti-apoptotiques, la membrane mitochondriale devient perméable au cytochrome-c. Cette situation se produit dans les CGRs axotomisées avec l'augmentation rapide de Bax (Isenmann et al., 1997). La libération du cytochrome-c de la mitochondrie devient alors visible dans le cytoplasme des CGRs par immunohistochimie (Isenmann et al., 1997; He et al., 2004). Avant même la diminution du nombre de cellules, la procaspase 3 inactive est clivée en caspase 3 active dans les CGRs (Klocker et al., 1999; Klocker et al., 2000). La caspase 3 est une caspase effectrice c'est-à-dire qu'elle est une enzyme de clivage des protéines constitutives (ADN, etc) contribuant directement à la dégradation cellulaire.

La survie des CGRs peut être stimulée en inhibant les molécules pro-apoptotiques ou en activant les molécules anti-apoptotiques. L'inhibition ciblée des caspases réduit très fortement l'apoptose après lésion du nerf optique (Kermer et al., 1998; Klocker et al., 1999; Cheung et al., 2004). Plus spécifiquement, l'injection intraoculaire d'ARN antisense

inhibant la synthèse de Bax réduit la mort des CGRs (Isenmann et al., 1999). L'utilisation d'ARN d'interférence (siARN) dirigé contre Apaf-1 atténue la perte de CGRs après lésion du nerf optique (Lingor et al., 2005). À l'inverse, si Bcl-2 est surexprimée dans les CGRs de souris transgéniques ($bcl-2^{+/+}$), l'apoptose causée par la blessure du nerf optique est fortement réduite. Par exemple, 65% des CGRs adultes survivent chez les souris $bcl-2^{+/+}$ par rapport à moins de 10% chez une souris de type sauvage, 3,5 mois après l'axotomie du nerf optique (Cenni et al., 1996). La surexpression du gène de Bcl-x_L, un analogue de Bcl-2, grâce à un vecteur viral, permet de maintenir les CGRs en vie longtemps après la blessure du nerf optique chez le rat (Malik et al., 2000). Ces résultats démontrent l'importance des caspases dans la mort apoptotique des CGRs axotomisées.

I.4.1.5.) La désensibilisation des neurones au BDNF.

Les facteurs neurotrophiques ne stimulent la survie des CGRs que de façon transitoire et partielle après l'axotomie (Mansour-Robaey et al., 1994; Meyer-Franke et al., 1995). Pourtant des injections répétées de protéine de BDNF ou l'expression du gène de BDNF dans les cellules de Müller entretiennent un niveau élevé de neurotrophine dans la rétine après l'axotomie (Di Polo et al., 1998; Klocker et al., 1998). Donc la diminution de la survie ne peut être uniquement imputée à la dégradation du BDNF injecté dans le vitré. Par exemple, l'action de BDNF semble atténuée par la baisse d'expression de TrkB dans les CGRs. La transection du nerf optique diminue de ~50% la transcription du gène *trkb* dans les CGRs (Cheng et al., 2002). L'augmentation de TrkB dans les CGRs par transfection virale (AAV.TrkB), associée à l'injection vitréenne de BDNF, augmente fortement le niveau et la durée de neuroprotection. Néanmoins, le traitement combiné de TrkB et BDNF n'arrête pas complètement la mort neuronale.

I.4.1.6.) Les effets secondaires du BDNF.

Une autre hypothèse expliquant le manque de survie à long terme est l'apparition d'effets secondaires du BDNF survenant spécifiquement après l'axotomie du nerf optique. Le BDNF amplifie la production d'oxyde nitrique qui survient dans les CGRs, les cellules microgliales et amacrines, après la blessure du nerf optique (Klocker et al., 1999). Toutefois, si le BDNF est injecté conjointement avec des bloqueurs de la synthèse du NO

ou des épurateurs de radicaux libres, la survie est augmentée d'environ 70% (Klocker et al., 1998). De meilleures connaissances des mécanismes moléculaires de survie permettraient d'activer la survie en évitant les effets délétères non désirés.

I.4.2.) Les facteurs neurotrophiques dans la croissance neuritique.

I.4.2.1) Rôle du BDNF *in vitro*.

I.4.2.1.a) Le guidage axonal.

Des expériences *in vitro* ont montré que le BDNF possédait des propriétés chimioattractrices ressemblant à celles de la nétrine 1. Les cônes de croissance de CGRs exposés à un gradient de BDNF s'orientent vers la source de diffusion comme ils le feraient avec la nétrine 1 (Song et al., 1997). De façon très intéressante, la chimioattraction de la nétrine 1 et du BDNF est convertie en chimiorépulsion si l'AMPc ou PKA sont inhibés (Song et al., 1997). La conversion du signal attracteur en répulsif dépend du flux calcique intracellulaire (Ming et al., 1997). Le rapport élevé de cAMP/cGMP favorise l'entrée de calcium dans la cellule et l'attraction du cône de croissance, alors qu'un rapport faible entre cAMP et cGMP induit la répulsion en présence de nétrine 1 (Nishiyama et al., 2003). Il apparaît donc que la nétrine 1 et le BDNF sont capables d'influencer le guidage axonal en utilisant des mécanismes biochimiques semblables.

I.4.2.1.b) Les mécanismes moléculaires de la croissance neuritique.

La chimioattraction et la croissance axonale sont deux phénomènes distinctement régulés dans la cellule. Sur des CGRs embryonnaires isolées, il a été démontré que le BDNF faisait parti, avec le *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) et le *Ciliary NeuroTrophic Factor* (CNTF), des facteurs neurotrophiques les plus puissants pour induire la croissance axonale, alors que la nétrine 1 a un effet relativement faible (Goldberg et al., 2002b). Chez certains neurones, les facteurs neurotrophiques, incluant le BDNF, provoquent l'allongement des filopodes du cône de croissance grâce à l'activation de p75. Il a été proposé que la liaison du BDNF et du NGF avec p75 pouvait causer la dissociation de p75 et *Rho GDP dissociation inhibitor* (Rho-GDI) qui devient libre d'inhiber RhoA dans la cellule (Yamashita et al., 1999; Yamashita and Tohyama, 2003). Chez les CGRs et les cellules ganglionnaires de la racine dorsale de la moelle épinière (DRG), le BDNF

augmente le nombre et la longueur des filopodes en inhibant RhoA et en stimulant Cdc42 en même temps (Gehler et al., 2004a; Chen et al., 2005). Le blocage de RhoA lève l'inhibition de la cofiline par un mécanisme dépendant de la *Rho Kinase* (ROCK) et favorise ainsi la polymérisation de l'actine-F (Arber et al., 1998; Gehler et al., 2004b). Ce mécanisme présente l'avantage d'expliquer comment un facteur neurotrophique peut influencer l'arrangement du cytosquelette lors de l'extension du filopode. Cependant, ce mécanisme repose entièrement sur la présence de p75 dans les CGRs qui est hautement improbable chez les rongeurs (Park et al., 2005).

I.4.2.1.c.) La croissance neuritique sur des substrats inhibiteurs.

En culture, un prétraitement ou « *priming* » des neurones avec le BDNF ou d'autres NT (GDNF ou NGF) avant l'étalement des cellules rend la croissance neuritique possible sur des substrats inhibiteurs de myéline (Cai et al., 1999; Gao et al., 2003). Ces facteurs neurotrophiques élèvent le niveau d'AMPC intracellulaire qui active la transcription de l'enzyme arginase I (ArgI) par CREB (Cai et al., 2002). En induisant la synthèse des polyamines telles que la spermine et la putrescine, l'ArgI stimule la croissance neuritique sur un substrat inhibiteur recouvert de MAG ou de myéline (Cai et al., 2002). Des tests sur la moelle épinière hémi-sectionnée montrent que la stimulation soutenue de CREB ou d'AMPC améliore la récupération de la motricité (Qiu et al., 2002; Nikulina et al., 2004). Chez le poisson doré, les polyamines sont transportées dans les axones du nerf optique et sont nécessaires au processus de croissance axonale des CGRs (Schwartz et al., 1981; Ingolia et al., 1982). L'élucidation de la cascade biochimique BDNF/CREB/ArgI par l'équipe de Filbin est une découverte très importante même si des données sur la régénération axonale et la survie neuronale *in vivo* restent à apporter (Cai et al., 1999; Cai et al., 2002; Gao et al., 2003; Gao et al., 2004).

I.4.2.2.) Rôle du BDNF *in vivo*.

I.4.2.2.a.) Les projections axonales.

L'expression du BDNF ou de son récepteur TrkB ne sont pas absolument nécessaires pour la projection des axones *in vivo*. Chez les souris mutantes *bdnf*^{-/-} et *trkb*^{-/-}, le nombre d'axones dans le nerf optique n'est pas différent des animaux de type sauvage, ce

qui indique que le BDNF et le TrkB ne sont pas indispensables au guidage et à l'extension des axones (Cellerino et al., 1997; Rohrer et al., 2001). Toutefois, la surexpression du BDNF dans le collicule supérieur augmente de 10 fois le nombre des axones ipsilatéraux pendant la période de projection axonale chez le rat (Isenmann et al., 1999). Chez le rat postnatal (P4-P10), le BDNF transporté antérogradement (de la rétine au cerveau) est nécessaire au maintien des projections axonales des CGRs dans le corps genouillé latéral (Menna et al., 2003). Si le BDNF endogène est inhibé par un ARN antisense, les axones ipsi- et contralatéraux des CGRs se rétractent de 86% et 16% respectivement. Donc, le BDNF aurait un rôle dans la ségrégation et le maintien des projections axonales.

I.4.2.2.b.) La régénération axonale dans le nerf optique adulte blessé.

De façon générale, les facteurs neurotrophiques agissant sur les récepteurs de la famille Trk ne stimulent pas la régénération axonale dans le nerf optique (Yip and So, 2000; Isenmann et al., 2003). Le BDNF, qui est le plus puissant facteur de survie pour les CGRs blessées, n'est pas capable d'augmenter la croissance axonale même dans un environnement permissif comme un greffon de nerf périphérique (Mansour-Robaey et al., 1994). Il a été proposé que l'absence de régénération axonale des CGRs après l'administration de BDNF résultait de son incapacité à induire l'expression de protéines du cytosquelette comme les tubulines $T\alpha-1$ ou les tubulines $\beta-II$ et $\beta-III$ (Fournier et al., 1997; Fournier and McKerracher, 1997). En effet, l'expression et le transport axonal antérograde lent de ces protéines cytosquelettiques sont nécessaires à l'extension du cône de croissance et la régénération axonale (McKerracher et al., 1990a; McKerracher et al., 1990b). Bien que le BDNF et les autres NT apparentées ne stimulent pas la repousse des axones sectionnés, ils peuvent provoquer l'excroissance des branches axonales entre le corps cellulaire et le site de lésion (Sawai et al., 1996). Cet effet peut être du à l'absence des protéines inhibitrices de la myéline dans la rétine. Contrairement aux observations faites avec des neurones embryonnaires en cultures, les études menées dans des systèmes adultes *in vivo*, incluant celles de cette thèse, montrent que le BDNF ne cause pas de régénération axonale après le site de blessure.

I.4.2.3.) Relation entre survie neuronale et régénération axonale.

Contrairement au BDNF, d'autres facteurs neurotrophiques comme le CNTF ou le *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2) se sont avérés efficaces pour induire ou accroître la croissance axonale dans le nerf optique ou des explants de nerf périphérique respectivement (Cui and Harvey, 2000; Cui et al., 2003; Sapieha et al., 2003). Par exemple, l'expression ectopique de FGF2 dans les CGRs permet de stimuler la croissance axonale dans le nerf optique blessé (Sapieha et al., 2003). Cependant, de façon tout à fait remarquable, le FGF2 ne permet pas d'augmenter la survie des CGRs dans ces mêmes conditions. Les effets contraires du BDNF et du FGF2 indiquent que les mécanismes moléculaires régissant la survie et la régénération axonale peuvent être activés séparément, même par des facteurs neurotrophiques. Bien sûr, des études antérieures avaient établi que la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 maintenait les CGRs en vie en absence de support trophique et après blessure axonale, mais était incapable d'induire de croissance neuritique (Bonfanti et al., 1996; Cenni et al., 1996; Chierzi et al., 1999; Lodovichi et al., 2001; Goldberg et al., 2002b; Inoue et al., 2002). Mais, à la différence de Bcl-2, les facteurs neurotrophiques activent des mécanismes moléculaires et cellulaires complexes que l'on croyait convergents dans les phénomènes de survie et de régénération.

I.4.2.4.) L'importance de Erk_{1/2} dans la régénération axonale.

Erk_{1/2} est un régulateur essentiel du guidage et de la croissance axonale chez les CGRs embryonnaires. Au moment des projections axonales vers le cerveau, Shh déclenche une vague d'activation d'Erk_{1/2} chez les CGRs qui parcourt la rétine du centre vers la périphérie (Neumann and Nusslein-Volhard, 2000). Cela suggère que Erk_{1/2} pourrait être impliqué dans l'émission des projections axonales tôt dans le développement. Dans le guidage axonal, la voie Erk_{1/2} est aussi bien impliquée dans la chimioattraction de la nétrine 1 et du BDNF que dans la chimiorépulsion de la sémaphorine 3A du cône de croissance (Forcet et al., 2002; Ming et al., 2002; Campbell and Holt, 2003). Par ailleurs, Erk_{1/2} est indispensable à l'extension axonale induite par des facteurs neurotrophiques. L'activation de Erk_{1/2} est nécessaire pour la croissance neuritique induite par TrkB/BDNF (Atwal et al., 2000). Le facteur de croissance neuritique FGF2 active fortement Erk_{1/2} dans les CGRs embryonnaires (Perron and Bixby, 1999). Si Erk_{1/2} est inhibé, la croissance neuritique

induite par le FGF2 est fortement réduite chez les CGRs embryonnaires. Au contraire, la stimulation intracellulaire de Erk_{1/2} par une forme constitutivement active de MEK1 augmente la longueur des neurites des CGRs embryonnaires et des cellules PC12 en culture (Robinson et al., 1998; Dimitropoulou and Bixby, 2000). Ces observations donnent à Erk_{1/2} une place importante dans les phénomènes de croissance neuritiques, tout au moins chez les neurones en développement.

Chez l'adulte, le rôle de la voie Erk_{1/2} dans la régénération axonale demeure néanmoins ambigu. Par exemple, Erk_{1/2} est activée dans les CGRs aussi bien par des facteurs neurotrophiques induisant la régénération axonale, comme le FGF2 (Perron and Bixby, 1999; Kinkl et al., 2001), que par d'autres facteurs qui n'ont pas d'incidence sur la croissance, tel que le BDNF (Klocker et al., 2000). La question sur le rôle de Erk_{1/2} dans la régénération axonale du nerf optique reste donc entière.

1.5.) Activation de la régénération axonale par les macrophages.

La très faible capacité des facteurs neurotrophiques à stimuler la croissance axonale a incité certaines équipes à rechercher de nouvelles molécules qui activeraient la régénération axonale. Chez plusieurs espèces de mammifères (souris, rat, chat), il a été démontré que la blessure du cristallin induisait une forte croissance axonale dans le nerf optique blessé (Fischer et al., 2000; Leon et al., 2000; Lorber et al., 2005; Okada et al., 2005). Après la blessure du cristallin, il fut observé que les macrophages envahissaient massivement la rétine interne (comprenant la couche des CGRs). L'activation directe des macrophages par l'injection d'un lysat de paroi cellulaire de levure, le zymosan, stimulait la régénération axonale dans le nerf optique sans que le cristallin ait été endommagé (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003). La recherche de facteurs peptidiques libérés par les macrophages a d'abord permis d'écarter l'implication des facteurs neurotrophiques. Ultérieurement, un peptide de 12 kDa a été isolé à partir des macrophages et semblait reproduire les effets du cristallin et des macrophages sur la régénération axonale. Ce peptide pourrait être l'oncomoduline, plus anciennement connu comme chelateur intracellulaire du calcium (Yin et al., 2005). Plusieurs facteurs de transcriptions associés à la croissance axonale sont activés dans les CGRs après la blessure du cristallin (Fischer et al., 2004). Leur contribution respective au phénomène de régénération reste néanmoins à

éclaircir. Ces travaux ont montré de façon remarquable que les axones du SNC blessé pouvaient reprendre un programme de croissance dans le milieu inhibiteur du nerf optique.

I.6.) Le modèle d'excitotoxicité du NMDA sur les cellules ganglionnaires de la rétine.

Le modèle de blessure du nerf optique présenté jusqu'à maintenant est pertinent pour étudier les lésions axonales, mais d'autres types de blessures du SNC, comme l'ischémie cérébrale, passent par des mécanismes de mort distincts. Par exemple, la libération de glutamate semble être un mécanisme majeur dans la mort neuronale consécutive à une ischémie/reperfusion. On ne sait pas si l'action neuroprotectrice de certaines molécules, comme le BDNF, peut être élargie à d'autres blessures que l'axotomie qui sont de type excitotoxique.

I.6.1.) L'excitotoxicité du glutamate dans les blessures du SNC.

Dans les blessures du SNC (traumatisme, ischémie), on pense que le glutamate est un médiateur important de la mort neuronale (Lipton and Rosenberg, 1994). D'après la théorie de l'excitotoxicité, la libération excessive de glutamate dans le milieu extracellulaire tuerait les neurones en les sur-excitant. Bien que l'augmentation de la concentration de glutamate dans le milieu extracellulaire fasse encore l'objet de beaucoup de controverse, il existe des preuves directes montrant que le glutamate joue un rôle dans la mort neuronale. Par exemple, *in vitro*, différentes populations de neurones telles que les neurones corticaux (Choi et al., 1987), hippocampiques (Peterson et al., 1989), et du cervelet (Eimerl and Schramm, 1991) sont sensibles à la toxicité du glutamate. De plus, les antagonistes du glutamate réduisent les dommages cérébraux et notamment ceux produits par l'ischémie (Simon et al., 1984; Rothman and Olney, 1986; Park et al., 1988). Comme pour le SNC en général, le glutamate a été particulièrement bien impliqué dans les lésions ischémiques de la rétine (Osborne et al., 2004). Par conséquent, la compréhension des mécanismes d'excitotoxicité du glutamate représente un enjeu majeur dans la protection des neurones blessés.

I.6.2.) La sensibilité des cellules ganglionnaires de la rétine à la toxicité du NMDA.

Les premières observations de l'excitotoxicité du glutamate dans le système nerveux furent effectuées sur la rétine après des injections sous-cutanées de glutamate (Lucas and Newhouse, 1957). De manière plus naturelle, une diète riche en glutamate peut aussi augmenter la concentration de glutamate dans l'espace vitréen et causer la destruction de la couche des CGRs (Ohguro et al., 2002). Le glutamate active plusieurs types de récepteurs ionotropes qui sont les récepteurs à l'acide (S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolpropionique (AMPA), au kainate et au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA). En particulier, l'activation du récepteur au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDAR) par le glutamate est directement impliquée dans la mort excitotoxique des CGRs (Lipton, 2003). L'expression des récepteurs au NMDA dans les CGRs (Brandstatter et al., 1994; Fletcher et al., 2000) rend cette population de cellules particulièrement sensible à la toxicité au glutamate (Siliprandi et al., 1992). Expérimentalement, l'injection de NMDA dans l'espace vitréen produit une perte de CGRs proportionnelle à la dose administrée pouvant aller jusqu'à la disparition de toutes les CGRs (Siliprandi et al., 1992; Manabe and Lipton, 2003). La mort des CGRs provoquée par injection de NMDA dans l'humeur vitrée représente un modèle fiable et pertinent pour l'étude de la mort excitotoxique des neurones.

I.6.3.) Rôle du glutamate dans la mort des cellules ganglionnaires de la rétine axotomisées.

L'apoptose est un mécanisme essentiel dans la mort des CGRs axotomisées mais plusieurs indices expérimentaux soutiennent l'existence d'une partie excitotoxique. Chez le raton P2, la mort nécrotique et excitotoxique des CGRs survient dans les 6 premières heures, suivie de la mort apoptotique 24 heures après l'ablation du collicule supérieur (Cui and Harvey, 1995). Dans ce cas, le blocage des récepteurs NMDAR peut empêcher la mort nécrotique précoce des CGRs (Cui and Harvey, 1995). Chez l'adulte, l'inhibition des récepteurs au NMDA protège les CGRs de la mort après l'axotomie du nerf optique (Kikuchi et al., 2000). Donc, l'activation des NMDAR intervient dans la mort excitotoxique des CGRs causée par la blessure du nerf optique. Dans la pathologie du glaucome, l'excitotoxicité passant par le NMDAR semble aussi impliquée dans la mort des CGRs (Lipton, 2003). De plus, on pense que l'augmentation de pression intraoculaire, qui survient

fréquemment dans le glaucome, comprime la tête du nerf optique et blesse de cette façon les axones comme dans l'axotomie (Morrison et al., 2005). Dans le glaucome, le blocage de la mort excitotoxique passant par le NMDAR est une des stratégies thérapeutiques les plus envisagées pour préserver les CGRs.

I.6.4.) Mécanismes biochimiques de l'excitotoxicité induite par le NMDA.

I.6.4.1.) Le stress oxydatif: importance du peroxynitrite.

L'entrée massive de Ca^{2+} à travers les canaux NMDAR déclenche la production de molécules oxydatives et de radicaux libres dans l'espace intracellulaire. L'activation de l'enzyme synthase de l'oxyde nitrique (NOS) par l'influx calcique est nécessaire à la mort induite par les NMDAR (Figure 8A) (Dawson et al., 1991; Dawson et al., 1993). L'oxyde nitrique (NO) réagit avec l'anion superoxyde (O_2^-) pour former du peroxynitrite ($ONOO^-$), une molécule hyper-réactive très destructrice pour les composants cellulaires (peroxydation des lipides membranaires, dégradation de la chromatine et des protéines). Les inhibiteurs de la NOS bloquent en grande partie les dommages dans la rétine interne, incluant les CGRs, provoqués par l'injection intraoculaire de NMDA (Morizane et al., 1997). La formation de peroxynitrite dans la cellule est un événement majeur dans la dégradation cellulaire déclenchée par l'excitotoxicité du NMDA.

I.6.4.2.) L'activation de l'apoptose.

Les NMDAR induisent l'apoptose par la régulation de voies de signalisation intracellulaires (Figure 8A). Dans l'apoptose induite par le NMDA, la Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CAMKII) cause le fractionnement de l'ADN nucléaire et l'activation de la caspase 3 (Laabich and Cooper, 1999; Laabich et al., 2000, 2001). Le blocage de la CAMKII inhibe l'apoptose et stimule la survie dans la couche des CGRs (Laabich and Cooper, 2000). De plus, la voie MAPK p38 semble contribuer activement à la mort des CGRs exposées à un niveau toxique de NMDA. Après l'injection intravitréenne de NMDA, la forme active de p38, phospho-p38, augmente dans la rétine et coïncide avec l'apparition de cellules apoptotiques dans la couche des CGRs (Manabe and Lipton, 2003). Dans cette même étude, l'inhibition de phospho-p38 double la survie après l'induction de l'excitotoxicité par le NMDA. En outre, le facteur de transcription *Nuclear Factor κ B*

(NF κ B) a été récemment impliqué dans la mort excitotoxique des CGRs mais n'y jouerait qu'un rôle modeste (Kitaoka et al., 2004). L'excitotoxicité du NMDA n'emprunte pas exclusivement les voies du stress oxydatif pour causer la mort cellulaire mais fait aussi appel aux voies d'apoptose.

I.6.5.) La stimulation de la survie.

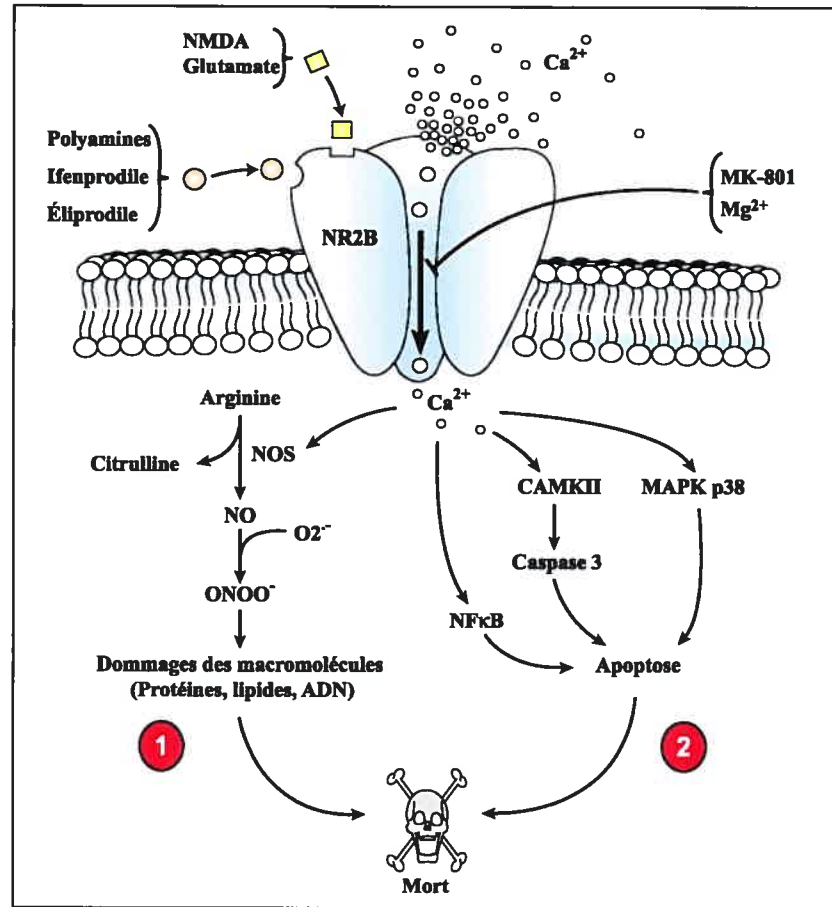
I.6.5.1.) Le blocage de l'influx de Ca²⁺.

Une stratégie efficace pour bloquer l'excitotoxicité au NMDA est l'inhibition de l'influx de calcium, en amont des divers mécanismes de mort. Par exemple, la mort des CGRs induite par l'injection intravitreuse de glutamate ou de NMDA est presque complètement inhibée par l'administration d'antagonistes des NMDAR tel que le maléate de dizocilpine (MK-801) (Kashii et al., 1994; Kikuchi et al., 1995; Sun et al., 2001). Le MK-801 se fixe sur le site de liaison du Mg²⁺ et bouche littéralement le pore ionique pour le passage du Ca²⁺ (Figure 8A) (Lipton, 2003). La forte affinité du MK-801 pour ce site de liaison lui confère un temps d'occupation du canal très long, ce qui explique ses puissants effets contre l'excitotoxicité au NMDA. L'inconvénient est que les canaux des NMDAR ont un rôle dans la neurotransmission qui est très affectée par un blocage complet et prolongé des NMDAR. Par exemple, l'application thérapeutique de MK-801 n'est pas envisageable chez l'humain car il provoquerait des effets secondaires trop importants pouvant aller jusqu'au coma (Lipton, 2003). De plus, plusieurs études ont démontré que le blocage complet des NMDAR entraînait la mort neuronale dans le cerveau (Ikonomidou et al., 1999; Ikonomidou et al., 2000; Dziejko et al., 2004; Hansen et al., 2004). Les effets secondaires du MK-801 ont incité la recherche d'autres régulateurs qui limiteraient l'excès d'activation des NMDAR tout en conservant une activité de ces récepteurs nécessaire au fonctionnement neuronal.

I.6.5.2.) Les polyamines.

Les récepteurs au NMDA sont composés de sous-unités NR1 et NR2A-D qui portent plusieurs sites de régulation. Les polyamines sont synthétisées de façon endogène par les neurones et peuvent se lier spécifiquement à la sous-unité NR2B pour faciliter l'activation des récepteurs du NMDA (Williams, 1997). Les polyamines regroupant la

A



B

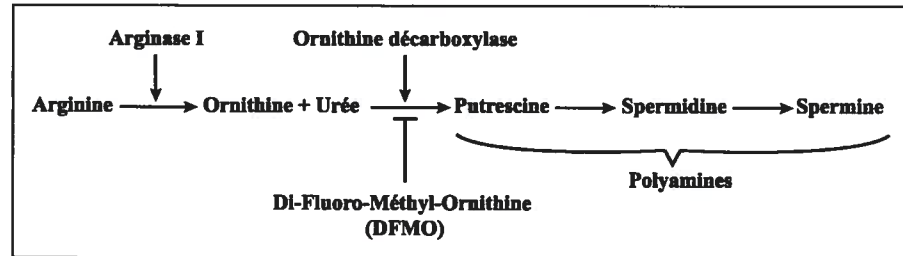


Figure 8. Mécanismes d'excitotoxicité du NMDA dans les cellules ganglionnaires de la rétine. (A) L'influx massif de calcium à travers les NMDAR active la production de molécules oxydantes via l'oxyde nitrique (NO) (1) et stimule les voies d'apoptose (2). Les dommages excitotoxiques du NMDA peuvent être diminués en bloquant le pore ionique avec du MK-801 ou en agissant sur les sites de liaison des polyamines. (B) Les polyamines sont synthétisées de manière endogène dans les neurones à partir de l'arginine. Les enzymes arginase I et ornithine décarboxylase limitent la production de polyamines dans la cellule. Le Di-Fluoro-Méthyl-Ornithine est un puissant inhibiteur de la conversion de l'ornithine en putrescine qui est souvent utilisé pour étudier les effets des polyamines. © Vincent Pernet.

putrescine, la spermidine et la spermine, sont produites par la transformation de l'acide aminé arginine en ornithine puis en putrescine, respectivement par l'arginase I et l'ornithine décarboxylase (Figure 8B). Les polyamines sont synthétisées par l'allongement de la chaîne carbonée et des aminations successives qui augmentent la polarité positive de ces composés dans la voie de biosynthèse.

Des antagonistes synthétiques qui se fixent sur le site de liaison des polyamines sur NMDAR ont des effets neuroprotecteurs contre le NMDA (Reynolds and Miller, 1989; Gallagher et al., 1996; Kew and Kemp, 1998). Par exemple, l'éliprodile et l'ifenprodile protègent les cellules de la rétine de rat nouveau-né en culture sans entièrement bloquer le courant électrique évoqué par le NMDA (Pang et al., 1999; Zhang et al., 2000). Chez le rat adulte *in vivo*, l'éliprodile induit la survie des cellules de la couche des CGRs, qui peuvent être les CGRs elles-mêmes ou les cellules amacrines (Kapin et al., 1999). Ces données suggèrent que les polyamines pourraient être des régulateurs naturels des NMDAR. Plus directement, des études ont montré que les polyamines produites par les neurones sont impliquées dans la mort excitotoxique engendrée par le NMDA. Chez les cellules de rétine en développement, la synthèse des polyamines est activée dans les premières minutes suivant la stimulation avec le NMDA (Trout et al., 1993). L'inhibition de la synthèse des polyamines par le Di-Fluoro-Méthyl-Ornithine (DFMO) (Figure 8B) limite la neurotoxicité du NMDA chez les neurones corticaux (Markwell et al., 1990), les neurones striataux (Porcella et al., 1991) et les neurones rétiniens embryonnaires (Trout et al., 1993; Ientile et al., 1999). Cependant, des changements importants d'expression des sous-unités NR1 et NR2 ont cours dans la rétine pendant la vie postnatale et peuvent influencer le contrôle des NMDAR par les polyamines (Grunder et al., 2000). Il faut par ailleurs souligner qu'entre l'âge néonatal et adulte, la rétine devient considérablement plus sensible à la toxicité du NMDA (Izumi et al., 1995). Ceci indique que la régulation des NMDAR évolue beaucoup au cours du développement et que les données récoltées sur des rétines immatures ne sont pas nécessairement valables chez l'adulte.

De plus, on pense que les polyamines ne sont pas seulement capables de réguler l'ouverture des canaux des NMDAR, mais pourraient aussi directement agir sur les mécanismes d'apoptose et les radicaux libres (Seiler and Raul, 2005). Il est possible que les

polyamines régulent la mort des neurones adultes en agissant sur les récepteurs NMDAR ou sur les cascades de signalisation intracellulaires, mais cela reste à vérifier.

I.6.5.3.) Le rôle du BDNF dans l'excitotoxicité du NMDA.

Dans les neurones corticaux, il a été rapporté que le BDNF pouvait stimuler la survie neuronale contre l'excitotoxicité du NMDA (Kume et al., 1997; Tremblay et al., 1999; Husson et al., 2005). Chez les CGRs, beaucoup d'études se sont penchées sur les effets neuroprotecteurs du BDNF après l'axotomie du nerf optique mais très peu se sont intéressées au rôle du BDNF dans la mort excitotoxique. Les rares données disponibles indiquent que le BDNF aurait un effet neuroprotecteur très modeste sur des CGRs exposées à un niveau toxique de NMDA (Kido et al., 2000). Ces derniers résultats sont surprenants car le BDNF active des mécanismes qui sont étroitement liés à l'excitotoxicité du NMDA. Notamment, il a été démontré que le BDNF augmentait la production des polyamines par la voie AMPc/CREB/ArgI (Cai et al., 2002). Comme nous venons de le voir, les polyamines semblent jouer un rôle modulateur des récepteurs au NMDA. Le BDNF pourrait augmenter les dommages excitotoxiques des NMDAR en activant la synthèse des polyamines ou paradoxalement stimuler la survie en inhibant les mécanismes d'apoptose (Figure 7). Le rôle du BDNF n'est donc pas clair dans l'excitotoxicité induite par les NMDAR.

I.7.) Objectifs de la thèse et approches expérimentales.

À la lumière de ce qui vient d'être présenté, la voie Erk_{1/2} semble être importante dans la signalisation de la neuroprotection mais la contribution individuelle d'Erk_{1/2} à la survie neuronale est encore controversée. De plus, chez des neurones adultes *in vivo*, on ne sait pas si l'activation de Erk_{1/2} suffirait à activer un programme de croissance axonale et à réprimer les signaux inhibiteurs présents autour du site de blessure des axones. Dans la première partie de la thèse, nous avons donc voulu tester le rôle de Erk_{1/2} dans la survie et la régénération axonale des CGRs après une blessure du nerf optique. Notre approche expérimentale a consisté à activer intracellulairement Erk_{1/2} en introduisant une forme constitutivement active du gène de MEK (MEK-ca) dans les CGRs *in vivo*. Nous avons choisi d'utiliser des virus adéno-associés (AAV) comme vecteurs du gène de MEK-ca car ils offrent les avantages 1) d'infecter sélectivement les CGRs dans la rétine (Cheng et al.,

2002; Sapieha et al., 2003), 2) de provoquer une réponse immunitaire négligeable dans la rétine (Xiao et al., 1996; Xiao et al., 1997), et 3) de permettre l'expression d'un transgène à très long terme dans les cellules transfectées (plusieurs années) (Dudus et al., 1999; Guy et al., 1999). Pour étudier la survie neuronale, les corps cellulaires des CGRs ont été marqués rétrogradement en déposant un marqueur fluorescent, le FluoroGold (FG), au niveau des terminaisons synaptiques, dans le collicule supérieur (Figure 3A). Après la transection du nerf optique (Figure 3B), la survie a été évaluée en quantifiant les CGRs sur des rétines étalées (Figure 3D). La régénération axonale a été observée grâce à un traceur antérograde, la sous-unité β de la toxine du choléra (CT β), transporté dans les axones du nerf optique après microlésion (Figure 3C). La microlésion est une technique de blessure que nous avons préférée à un écrasement du nerf car 1) elle limite la largeur du site de blessure et de la cicatrice gliale (Selles-Navarro et al., 2001), 2) elle garde en apposition le nerf proximal et le nerf distal pour la régénération des axones après le site de blessure (Sapieha et al., 2003; Bertrand et al., 2005), et 3) elle blesse de la même façon que la transection du nerf optique les axones des CGRs, et induit un patron de mort similaire (Sapieha et al., 2003)

Le BDNF et la blessure du cristallin ont des effets complémentaires sur la survie et la régénération axonale. Notre deuxième objectif a donc été de vérifier si la combinaison des 2 traitements permettrait d'additionner leurs effets respectifs afin d'améliorer la survie et la régénération axonale après la blessure du nerf optique. Dans ce but, des animaux ont reçu une injection intraoculaire de BDNF et la région postérieure du cristallin a été perforée avec une aiguille au moment de la blessure du nerf optique (Figure 3C). La survie et la régénération axonale ont été observées deux semaines après la lésion, selon le même protocole *in vivo* que décrit précédemment (Figure 3).

Le troisième objectif de la thèse était d'étudier les effets du BDNF dans les mécanismes d'excitotoxicité causée par le NMDA, à travers la voie AMPc/CREB/ArgI/polyamines. À cette fin, la mort des CGRs a été stimulée par injection intravitréenne de NMDA et les effets du BDNF et des polyamines ont été testés sur la survie neuronale (Figure 3A, D).

CHAPITRE 2

II. PREMIER ARTICLE: “EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE 1/2 MEDIATES SURVIVAL, BUT NOT AXON REGENERATION, OF ADULT INJURED CNS NEURONS *IN VIVO*”.

Journal of Neurochemistry, 2005, 93(1):72-83.

**EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE 1/2 MEDIATES SURVIVAL,
BUT NOT AXON REGENERATION, OF ADULT INJURED CNS NEURONS *IN*
VIVO.**

Vincent Pernet¹, William W. Hauswirth² and Adriana Di Polo¹.

¹Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, 2900 Boulevard Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec, Canada H3T 1J4; ²Departments of Ophthalmology and Powell Gene Therapy Center, P.O. Box 100284, University of Florida Gainesville, FL 32610-0284.

Corresponding Author: **Adriana Di Polo, Ph.D.**
Department of Pathology and Cell Biology
Université de Montréal
2900, Boul. Edouard-Montpetit
Pavillon Principal, Room N-535
Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada
Phone: (514) 343-6109
Fax: (514) 343-5755
E-mail: XXXXXXXXXX

II.1.) ABSTRACT

Neurotrophins play important roles in the response of adult neurons to injury. The intracellular signaling mechanisms used by neurotrophins to regulate survival and axon growth in the mature CNS *in vivo* are not well understood. The goal of this study was to define the role of the extracellular signal-regulated kinases 1/2 (Erk1/2) pathway in the survival and axon regeneration of adult rat retinal ganglion cells (RGCs), a prototypical central neuron population. We used recombinant adeno-associated virus (AAV) to selectively transduce RGCs with genes encoding constitutively active or wild-type MEK1, the upstream activator of Erk1/2. In combination with anterograde and retrograde tracing techniques, we monitored neuronal survival and axon regeneration *in vivo*. MEK1 gene delivery led to robust and selective transgene expression in multiple RGC compartments including cell bodies, dendrites, axons and targets in the brain. Furthermore, MEK1 activation induced *in vivo* phosphorylation of Erk1/2 in RGC bodies and axons. Quantitative analysis of cell survival demonstrated that Erk1/2 activation promoted robust RGC neuroprotection after optic nerve injury. In contrast, stimulation of the Erk1/2 pathway was not sufficient to induce RGC axon growth beyond the lesion site. We conclude that the Erk1/2 pathway plays a key role in the survival of axotomized mammalian RGCs *in vivo*, and that activation of other signaling components is required for axon regeneration in the growth inhibitory CNS environment.

Keywords: Regeneration, Retinal Ganglion Cell, Mitogen Activated Protein Kinase, Neuroprotection, Gene Therapy, Neurotrophic Factors.

Running Title: Role of ERK 1/2 in survival and regeneration in retina.

II.2.) INTRODUCTION

Neurotrophins mediate a variety of key cellular responses in the developing and mature central nervous system (CNS) including proliferation, differentiation, survival, axon growth, and dendrite formation (Huang and Reichardt 2001; Miller and Kaplan 2003; Lu 2004). There has been great interest in the identification of the intracellular signaling pathways that regulate these cellular processes. Upon binding to Trk receptors, neurotrophins stimulate multiple signaling pathways, most notably the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2), the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/Akt and the phospholipase C pathways (Chao 2003; Huang and Reichardt 2003). The signaling mechanisms that mediate the effects of neurotrophins, particularly as they relate to neuronal survival, have been extensively studied *in vitro* (Kaplan and Miller 2000; Harper and LoGrasso 2001; Hetman and Gozdz 2004). However, the signaling pathways involved in neurotrophin-induced survival and axon growth of adult central neurons *in vivo* remain poorly defined.

The rat retinocollicular system is ideal to address the role of neurotrophin signaling in the survival and regeneration of adult retinal ganglion cells (RGCs), a well-characterized CNS neuronal population. Among neurotrophins, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is the most potent survival factor for injured RGCs (Mey and Thanos 1993; Mansour-Robaey et al. 1994; Peinado-Ramon et al. 1996; Di Polo et al. 1998; Klöcker et al. 2000; Chen and Weber 2001). In addition, BDNF has been shown to stimulate the growth of axotomized RGC axon branches within the retina where axons are not myelinated (Mansour-Robaey et al. 1994; Sawai et al. 1996). Consistent with these findings, adult RGCs express high levels of the BDNF receptor TrkB (Pérez and Caminos 1995; Rickman and Brecha 1995). We recently reported that although both the Erk1/2 and the PI3K pathways are stimulated in RGCs upon TrkB activation *in vivo*, only the Erk1/2 pathway mediates survival of axotomized RGCs (Cheng et al. 2002). For example, pharmacological inhibition of the obligate upstream activator of Erk1/2, the mitogen activated protein (MAP) kinase kinase 1 (MEK1), blocked the survival effect produced by TrkB overexpression, while PI3K inhibition did not alter this neuroprotective effect.

The identification of a signaling pathway critical for BDNF/TrkB-induced survival of adult RGCs (Cheng et al. 2002), prompted us to ask the following questions. First, is

selective stimulation of the Erk1/2 pathway sufficient to protect RGCs from axotomy-induced death? Second, does Erk1/2 activation also promote regeneration of severed RGC axons? To address these issues, we used recombinant adeno-associated virus (AAV) for *in vivo* gene delivery of constitutively active (ca) or wild-type (wt) MEK1 into RGCs. This vector system was selected based on our finding that RGCs are the primary cellular target for AAV transduction upon intravitreal virus administration (Cheng et al. 2002; Martin et al. 2003; Sapieha et al. 2003).

Our data demonstrate that *in vivo* stimulation of Erk1/2 by overexpression of a constitutively active MEK1 mutant potentiated RGC survival, but not axon regrowth, after nerve injury. These results define a role for Erk1/2 signaling in adult RGC neuroprotection *in vivo*, and suggest that activation of other signaling pathways is required for RGC axon regeneration within the injured optic nerve.

II.3.) EXPERIMENTAL METHODS

II.3.1.) Preparation of recombinant AAV serotype 2 vectors

The constitutively active MEK1 mutant used in our study was created by substitution of regulatory phosphorylation sites to acidic residues (S218D, S222D) and deletion of residues 44-55 N-terminal to the consensus catalytic core (MEK-ca; provided by Dr. N. Ahn, University of Colorado). Biochemical *in vitro* assays showed that this mutant was several-fold more active than wild-type MEK1 (Mansour et al. 1996).

The MEK-ca cDNA was inserted downstream of the hybrid chicken β -actin/CMV enhancer promoter in the plasmid pXX-UF12, a derivative of pTR-UF5 (Zolotukhin et al. 1996), containing the AAV terminal repeat sequences and a simian virus 40 polyadenylation sequence. The helper plasmid pDG (Grimm et al. 1998) that contains both the AAV genes (*rep* and *cap*) and helper genes required for AAV propagation was used to generate recombinant AAV. Vectors were packaged, concentrated and titered as previously described (Hauswirth et al. 2000). The number of infectious particles/ml (ip/ml) was determined by infectious center assay as described (McLaughlin et al. 1988) and was: 1.7×10^{10} ip/ml for AAV.MEK-ca, 3.7×10^{10} ip/ml for AAV.MEK-wt and 3.0×10^{10} ip/ml for AAV.GFP. No helper adenovirus or wild-type AAV contamination was detected in these

preparations. Control AAVs containing genes that encoded wild-type MEK1 (AAV.MEK-wt) or green fluorescent protein (AAV.GFP) were generated in identical fashion. The MEK1 genes used here contained a N-terminal hemagglutinin (HA) tag to track expression of AAV-mediated MEK1 proteins *in vivo*.

II.3.2.) Intraocular injection of viral vectors

All procedures were in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals. Surgeries were performed in adult female Sprague-Dawley rats (180-200 g) under general anesthesia (2% Isoflurane mixed in oxygen, 0.8 liter/min). Viral vectors (5 μ l) were injected into the vitreous chamber of the left eye using a 10- μ l Hamilton syringe adapted with a 32-gauge needle. Contralateral eyes or unoperated eyes from normal animals served as controls. The tip of the needle was inserted in the superior quadrant of the eye at a 45° angle through the sclera into the vitreous body. This route of administration avoided injury to eye structures, such as the iris or the lens, reported to promote survival and regeneration of RGCs (Mansour-Robaey et al. 1994; Leon et al. 2000). Once the tip of the needle reached the intravitreal space, it was held in place for injection of the viral solution over a period of ~2 min after which it was gently removed. The site of injection was then sealed with surgical glue (Indermill, Tyco Health Care, Mansfield, MA, USA). We, and others, have observed that AAV-mediated transgene expression reaches a plateau between 3-4 weeks after administration of the vector into the rodent eye (Bennett et al. 1997; Ali et al. 1998; Bennet et al. 2000; Cheng et al. 2002) and persists thereafter (Guy et al. 1999). Therefore, subsequent surgical procedures were performed 3-4 weeks after AAV administration (Fig. 1). The reason for delayed onset of AAV-mediated gene expression *in vivo* is unclear, but may arise from the need to convert single-stranded viral DNA to a double-strand prior to active transcription (Ferrari et al. 1996).

II.3.3.) Optic nerve axotomy and analysis of neuronal survival

RGCs were retrogradely labeled with 2% FluoroGold (Fluorochrome, Englewood, CO) in 0.9% NaCl containing 10% dimethyl sulfoxide by application of the tracer to both superior colliculi. Seven days later, the left optic nerve was transected at 0.5-1 mm from the

back of the eye avoiding injury to the ophthalmic artery. Rats were sacrificed at 7, 14 or 28 days post-lesion (Fig. 1A) by intracardial perfusion with 4% paraformaldehyde. Both the left (optic nerve lesion) and right (intact control) retinas were dissected, fixed for an additional 30 min and flat-mounted on a glass slide with the ganglion cell layer side up. FluoroGold-labeled neurons were counted in 12 standard retinal areas as described (Cheng et al. 2002; Sapieha et al. 2003). The vasculature of the retina was routinely monitored by fundus examination and animals showing signs of compromised blood supply were eliminated from the analysis. Groups included animals sacrificed at the following post-axotomy times: i) 1 week, treated with AAV.MEK-ca (n=8), AAV.MEK-wt (n=4) or AAV.GFP (n=4); ii) 2 weeks, treated with AAV.MEK-ca (n=10), AAV.MEK-wt (n=6) or AAV.GFP (n=3); and 4 weeks, treated with AAV.MEK-ca (n=9), AAV.MEK-wt (n=5) or AAV.GFP (n=4). Data analysis and statistics were performed using the GraphPad InStat software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) by a one-way analysis of variance (ANOVA) test.

II.3.4.) Micro-crush lesion and analysis of axon growth

The optic nerve was exposed and a 10-0 suture was used to tie a knot to completely constrict the nerve for 60 sec, after which the suture was carefully released as described (Sapieha et al. 2003). Thirteen days after injury, 5 μ l of 1% cholera toxin β subunit (CT β , List Biological Laboratories, Campbell, CA) was injected into the vitreous chamber. Twenty-four hrs later (2 weeks postlesion), animals were sacrificed (Fig. 1B) and the eyes processed for optic nerve immunostaining as described below. Groups included animals treated with AAV.MEK-ca (n=3) or AAV.GFP (n=3). We previously demonstrated that both micro-crush lesion and axotomy led to identical loss of RGCs within the first 2 weeks of injury (Sapieha et al. 2003), thus allowing us to compare the effect of these viral vectors on neuronal survival and axon growth.

Lens injury has been shown to stimulate RGC axon regeneration (Fischer et al. 2000; Leon et al. 2000). Hence, animals that received a small wound puncture to the lens (n=5) at the time of micro-crush lesion served as positive controls for axon growth. Briefly, a 30-gauge needle was used to puncture the posterior plane of the lens and the wound was

immediately monitored through the cornea. After this procedure, the lens became completely opaque within the first week of injury.

Axonal growth was evaluated by counting the number of CT β -positive axons that extended beyond the site of injury as described (Sapieha et al. 2003). Anterograde axonal tracing with CT β has been shown to be highly sensitive for revealing fine axonal morphology in the visual system (Mikkelsen 1992; Angelucci et al. 1996; Matteau et al. 2003). Axons that crossed a virtual line parallel to the lesion site at 50 μ m, 100 μ m, 250 μ m, 500 μ m and 1 mm were counted in four sections of optic nerve per animal. Sections were selected across the entire width of the nerve to analyze axon growth in both central and peripheral regions. The quantification of axons was carried out using two complementary methods: i) axons were counted directly on each section using a 100X objective (Zeiss), and ii) composite images of each nerve were generated at 60X magnification to verify axon counts with respect to the lesion site and for documentation. During quantification, the injury site was identified in the same optic nerve section by dark field microscopy. In addition, the location of the lesion site was routinely confirmed in the same section or in an immediately adjacent section using hematoxylin/eosin staining. The thickness of the optic nerve was measured at each point where axons were counted and this value was used to calculate the number of axons per mm of nerve width. Data analysis was performed using the GraphPad InStat program (GraphPad Software Inc.) by a Student's *t* test.

II.3.5.) Retina, optic nerve and brain immunohistochemistry

Rats were perfused transcardially with 4% PFA and the eyes, optic nerves and brains were immediately dissected. The anterior part of the eye and the lens were removed, and the remaining eye cup immersed in the same fixative for 2 hr at 4°C. Eye cups, optic nerves and brain tissue were equilibrated in graded sucrose solutions (10-30% in PB) at 4°C, embedded in O.C.T. compound (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN) and frozen in a 2-methylbutane/liquid nitrogen bath. Tissue cryosections (14-16 μ m) were collected onto gelatin-coated slides and processed. Sections were incubated in 10% normal goat serum (NGS), 0.2% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 30 min at room temperature to block nonspecific binding. Each primary antibody was added in 2% NGS, 0.05% Triton X-

100 and incubated overnight at 4°C. Sections were then incubated with the appropriate secondary antibody for 1 hr at room temperature, washed in PBS and mounted using an anti-fade reagent (SlowFade, Molecular Probes, Eugene, OR). Primary antibodies were: monoclonal HA antibody (2 µg/ml, clone 12CA5, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA), goat CTβ antibody (1:4,000 dilution, List Biological Labs), or monoclonal phospho-Erk1/2 that specifically recognizes Erk1/2 phosphorylated on Thr202/Tyr204 residues (10 µg/ml, BioSource International, Camarillo, CA). Fluorescent staining was examined using a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada, Kirkland, QC), pictures captured with a CCD video camera (Retiga, Qimaging) and analysed with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON).

II.3.6.) Western blot analysis

Retinas were quickly extracted and homogenized with an electric pestle (Kontes, Vineland, NJ) in lysis buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 135 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS and 10% glycerol supplemented with protease inhibitors) at 4 °C. Retinal lysates were incubated for 30 min on ice before centrifugation at 10,000 rpm for 5 min and the supernatant collected. The protein concentration of retinal extracts was determined by the Lowry method (Bio-Rad Life Science, Mississauga, Ontario, Canada). Samples (100-150 µg of protein) were separated by electrophoresis on 10% SDS polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Life Science, Mississauga, Ontario, Canada). Non-specific binding was blocked by incubating blots in 10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20 (TBST), and 5% lyophilized skim milk for 1h at room temperature. Membranes were incubated with the following primary antibodies: monoclonal phospho-Erk1/2 (10 µg/ml, BioSource Int.), polyclonal Erk1/2 (2.3 µg/ml, BioSource Int.), polyclonal phospho-Akt that recognizes Akt phosphorylated on Thr308 (0.6 µg/ml, Cell Signaling), polyclonal Akt (0.1 µg/ml, Cell Signaling), polyclonal phospho-Erk5 that recognizes Erk5 phosphorylated on Thr218/Tyr220 residues (2 µg/ml, Biosource Int.), and polyclonal Erk5 (1 µg/ml, Biosource Int.). Blots were washed in TBST and then incubated with anti-mouse or anti-rabbit peroxidase-linked secondary antibody (0.5 µg/ml, Amersham Pharmacia, Baie d'Urfé, QC). Protein signals were detected using a

chemiluminescence reagent (ECL, Amersham Biosciences) followed by exposure of blots to X-OMAT (Kodak) imaging film.

II.4.) RESULTS

II.4.1.) AAV serotype 2 directs selective MEK1 transgene expression in adult RGCs

AAV.MEK serotype 2 vectors were injected intraocularly in intact rat eyes to examine MEK1 gene expression in retinal cells *in vivo*. Retinas and optic nerves were examined at four weeks following administration of AAV vectors, the time required for transgene expression to reach a plateau in the rodent retina (Bennet et al. 2000; Cheng et al. 2002). To distinguish AAV-mediated MEK1 expression from endogenous MEK1, we used an antibody against the HA tag present only in MEK1 transgenes. Robust HA staining was observed in a large number of cells in the ganglion cell layer (GCL) of retinas treated with AAV.MEK-ca (Fig. 2A) or AAV.MEK-wt (Fig. 2B), but not in control eyes injected with AAV.GFP (Fig. 2C). In addition, staining was also observed in dendritic processes extending into the inner plexiform layer (IPL) and in axons in the fiber layer (FL) (Figs. 2D, 2G). Thus, the diffuse HA staining detected in the IPL (Fig. 2A, 2B) is likely due to the presence of MEK-ca in the dendrites of GCL neurons.

We, and others, have shown that >70% of RGCs can be effectively infected when recombinant AAVs are administered into the vitreous chamber (Cheng et al. 2002; Harvey et al. 2002; Martin et al. 2002; Fischer et al. 2004). To confirm this, we performed colocalization studies in retinas from eyes that received a single intravitreal injection of AAV.MEK vectors followed by retrograde labeling of RGCs using FluoroGold applied to the superior colliculus. Double-labeling experiments demonstrated that the vast majority of RGCs, visualized with FluoroGold (Figs. 2E, 2H), produced virally-mediated MEK1 proteins (Figs. 2F, 2I). In addition, we examined the ability of the MEK-ca transgene to stimulate phosphorylation of Erk1/2 in adult RGCs *in vivo*. Immunostaining of retinal sections with an antibody that recognized active, phosphorylated Erk1/2 demonstrated that only RGCs infected with AAV.MEK-ca upregulated P-Erk1/2 (Figs. 2J-L). Positive P-Erk1/2 immunostaining was observed in the cytoplasmic compartment and in the nucleus (Fig. 2L), consistent with the biological role of Erk1/2. In contrast, AAV.GFP did not induce P-Erk1/2 increase in neurons (Figs. 2M-O). No signs of inflammation, cytotoxicity,

abnormal growth or immune reaction were detected in any of the eyes following administration of AAVs.

To establish the efficacy of AAV.MEK vectors to stimulate the Erk1/2 pathway *in vivo*, we examined the levels of phosphorylated Erk1 and Erk2 in whole retinal homogenates using antibodies that specifically recognize the phosphorylated forms of these kinases (Fig. 3A). Because mostly RGCs are infected by AAV, changes in protein phosphorylation reflect changes that occur in these neurons. Low but detectable levels of phospho-Erk1/2 were observed in intact, uninjected retinas indicating basal activation of these kinases. AAV.MEK-ca significantly increased Erk1 and Erk2 activation above the levels found in intact or control retinas at 4 weeks after vector administration. Interestingly, AAV.MEK-ca induced more abundant phosphorylation of Erk2 than Erk1. A more modest, but clearly detectable, increase in phospho-Erk2 was found in retinas injected with AAV.MEK-wt consistent with an increase in the pool of MEK1 protein available to phosphorylate Erk1/2. AAV.GFP-infected retinas showed phospho-Erk1/2 levels similar to those found in intact retinas indicating that AAV infection by itself did not stimulate the Erk1/2 pathway.

To confirm the specificity of Erk1/2 activation *in vivo*, we examined the phosphorylation status of the following key signaling components following MEK-ca gene transfer: Akt, a critical downstream target of PI3K (Huang and Reichardt 2003), and Erk5, which has been shown to mediate neuronal survival (Cavanaugh 2004). There was no activation of Akt in the presence of AAV.MEK-ca (Fig. 3B). Similarly, phosphorylation of Erk5 was not stimulated by AAV.MEK-ca (Fig. 3C). Together, these results indicate that AAV.MEK-ca drives selective and sustained stimulation of the MEK1/Erk1/2 pathway in adult RGCs *in vivo*.

II.4.2.) MEK1 transgene products are transported along RGC axons to targets in the brain

We investigated the possibility that AAV-mediated MEK1 proteins could be anterogradely transported along RGC axons. After a single intraocular injection of viral vectors, we performed HA immunohistochemistry of intact optic nerves and brain regions that are highly innervated by RGC axon terminals: the superior colliculus (SC) and the

dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN). Bundles of HA-positive RGC axons containing transgenic MEK-ca were observed in the fiber layer within the retina, at the optic nerve head and in the optic nerve (Fig. 4A, 4B). Identical staining was observed with AAV.MEK-wt (not shown).

HA-labeled terminal arbors were also identified in the SC contralateral to the AAV-injected eye (Fig. 4C). Collicular HA staining was most abundant throughout the superficial gray layer (Figs. 4C, 4E), the location of many RGC terminal arbors. Positive immunostaining was also observed in the region corresponding to the contralateral dLGN (Fig. 4F, 4G). Only background staining was detected in the ipsilateral SC (Fig. 4D) and dLGN (not shown), likely due to the low number of RGC fibers from the contralateral (AAV-injected) eye that project to these regions. In rats, less than 1% of the total RGC population project to the ipsilateral SC (Isenmann et al. 2003). Our findings are in agreement with a previous study showing reporter gene expression in retinorecipient brain regions following AAV.GFP injection in the rat eye (Harvey et al. 2002). Our results indicate that AAV-mediated MEK1 transgene products are readily transported along RGC axons to terminals in the brain.

II.4.3.) AAV.MEK-ca protects RGCs from axotomy-induced death

The widespread expression of AAV-mediated MEK-ca in RGCs, its distribution in cytoplasm, dendrites and axons, and its ability to activate Erk1/2 *in vivo* prompted us to test its effect on neuronal survival after optic nerve transection (Fig. 1A). Four weeks after intraocular injection of viral vectors, RGCs were retrogradely labeled and subsequently axotomized. Retinas were examined histologically at 7, 14 and 28 days post-lesion to determine the density of surviving RGCs in all retinal quadrants. Macrophages and microglia that may have incorporated FluoroGold after phagocytosis of dying RGCs were excluded from our quantitative analysis based on their morphology and immunolabeling using specific markers as described (Cheng et al. 2002).

Injection of AAV vectors was routinely performed in the superior (dorsal) quadrant of the eye, consequently, a higher density of RGCs expressing MEK-ca was always observed in this retinal hemisphere (Fig. 5A). We anticipated that the effect of MEK-ca on RGC survival would be most noticeable in retinal regions with the highest density of

infected RGCs. Thus, we compared the effect of AAV.MEK-ca on RGC survival in the entire retina with that in the superior quadrant (Table 1, Figs. 5B, 5C). A single intraocular injection of AAV.MEK-ca increased RGC survival in all quadrants (Fig. 5B), but most notably in the superior hemisphere (Fig. 5C) at 14 and 28 days after axotomy. For example, at two weeks after axotomy AAV.MEK-ca protected 45% of the total number of RGCs in the superior retina compared to 22% with AAV.MEK-wt or 18% with AAV.GFP (ANOVA, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$). Neuronal survival in the superior quadrant following treatment with AAV.MEK-ca was still significant at four weeks post-lesion: 17% of the total number of RGCs remained alive in contrast to only 8% or 2% of neurons that survived with AAV.MEK-wt or AAV.GFP, respectively (ANOVA, **: $P < 0.01$). In two out of nine animals, as many as 42% and 38% of RGCs in the superior retinal quadrant survived at 4 weeks after nerve transection. This neuroprotective effect led to higher neuronal densities and better preservation of cellular integrity (Fig. 5D) than with control vectors (Fig. 5E, 5F).

To further confirm that MEK-ca gene transfer was involved in RGC survival, we examined the correlation between neuronal survival and transgene product expression (Fig. 6). Our analysis indicated that the vast majority of surviving RGCs, identified by their FluoroGold label, also expressed AAV-mediated MEK-ca (~86%) at four weeks after injury. Together, these results strongly suggest that activation of the Erk1/2 pathway via MEK-ca gene transfer supports RGC survival in this injury model.

II.4.4.) MEK-ca gene transfer does not stimulate RGC axon regeneration

We then investigated if increased RGC survival with AAV.MEK-ca treatment correlated with greater axon regeneration at two weeks after micro-crush lesion of the optic nerve (Fig. 1B). While all RGC axons are completely transected in this injury paradigm, the lesion site remains well-defined and the extent of the glial scar is minimized (Sapieha et al. 2003). Importantly, we previously showed that both micro-crush lesion and axotomy led to identical loss of RGCs within the first 2 weeks of injury (Sapieha et al. 2003), thus allowing us to compare AAV.MEK-ca mediated survival and axon growth.

First, we examined if MEK-ca gene transfer induced phosphorylation of Erk1/2 in injured RGC axons. Optic nerve immunostaining with an antibody that recognized the

active, phosphorylated forms of Erk1/2 demonstrated robust labeling in many severed RGC axons (Fig. 7A). In all cases, the lesion site was identified by visualization of the same optic nerve section using dark field microscopy (Fig. 7B) as described (Sapieha et al. 2003). Interestingly, positive labeling was found in the nerve segment close to the cell body, proximal to the lesion. Lack of phospho-Erk1/2 staining in the distal optic nerve, past the lesion site, was consistent with the complete transection of all RGC axons (Fig. 7A). This finding suggests that anterograde transport of MEK-ca transgenic protein was blocked by axotomy, thus impairing consequent activation of Erk1/2 in the distal nerve. Phospho-Erk1/2 staining was not observed in the distal nor proximal nerve segments from eyes treated with control AAV.GFP (Fig. 7C, 7D).

The anterograde tracer cholera toxin beta-subunit (CT β), injected intraocularly, was used to visualize regenerating axons (Figs. 7E, 7G, 7I). In both AAV.MEK-ca (Fig. 7E, 7F) and AAV.GFP (Fig. 7G, 7H) treated eyes, most CT β -positive axons were visible in the proximal segment of the optic nerve. In contrast, very few labeled fibers were detected beyond the lesion site in the distal nerve indicating lack of RGC axon regeneration in the presence of AAV.MEK-ca. As expected, a higher density of CT β -positive axons was detected only in the proximal nerve segment of AAV.MEK-ca treated eyes (Fig. 7E) consistent with increased RGC survival in this group with respect to controls (Fig. 7G).

Lens injury has been shown to stimulate RGC survival and axon regeneration in the mature rat optic nerve (Fischer et al. 2000; Leon et al. 2000). Thus, a group of animals that received a small puncture wound to the lens were used as positive controls for axon growth. Many RGC axons were detected growing into the distal optic nerve following lens injury (Fig. 7I, 7J), thus validating our ability to assess RGC axon regeneration in the mature optic nerve. Because all RGC axons were completely transected in this paradigm, fibers extending beyond the site of injury correspond to axons that are regrowing, and not to axons that were spared, following the initial lesion.

The extent of axonal growth was evaluated by counting the number of CT β -positive axons that extended beyond the lesion site (Fig. 7K). Quantitative analysis of axon growth was carried out using optic nerve sections that spanned the entire width of the nerve to include RGC axons projecting from all retinal quadrants. Although limited axon growth was observed at short distances (50 μ m and 100 μ m) from the lesion site, there was no

significant difference in the overall axon growth after AAV.MEK-ca or AAV.GFP treatment (two-tailed *t* test, $P > 0.05$). For example, the number of axons per mm of optic nerve at 500 μm from the lesion was 3 ± 1.1 (mean \pm S.E.M.) or 2 ± 1.5 in animals treated with AAV.MEK-ca ($n=3$) or AAV.GFP ($n=3$), respectively, while lens-injury stimulated the growth of 30 ± 7.9 axons ($n=5$). Together, these data indicate that selective activation of the Erk1/2 pathway stimulates robust RGC survival, but does not contribute to axon regeneration.

II.5.) DISCUSSION

Here we used recombinant AAVs to investigate the role of the Erk1/2 pathway in the survival and regeneration of adult RGCs. This gene therapy approach has several advantages over other strategies, such as the use of pharmacological inhibitors or transgenic mice, for the study of signaling mechanisms *in vivo*. Pharmacological inhibitors are known to have non-specific effects. For example, MEK1 inhibitors can also block MEK5 (Kamakura et al. 1999; Mody et al. 2001), an upstream activator of Erk5, which mediates neuronal survival (Cavanaugh 2004). AAV predominantly targets adult RGCs (Cheng et al. 2002; Martin et al. 2003; Fischer et al. 2004), thus no other neurons or glial cells are likely to contribute significantly to the outcome response. This approach also avoids potential developmental defects that may occur in transgenic mice, confusing the interpretation of phenotypic changes in adult neurons. Other advantages are that AAV evokes minimal immune response in the host (Xiao et al. 1996; Xiao et al. 1997) and mediates long-term transgene expression in the retina and optic nerve (Dudus et al. 1999; Guy et al. 1999; Cheng et al. 2002).

We provide evidence that the Erk1/2 pathway plays an important role in the protection of adult RGCs against axotomy-induced death *in vivo*. Importantly, the vast majority of surviving RGCs expressed transgenic MEK-ca indicating that neuroprotection was a direct consequence of sustained, intracellular Erk1/2 activation. Our results are consistent with a general consensus, derived largely from *in vitro* studies, in which the PI3K pathway regulates survival following growth factor deprivation (Datta et al. 1999; Kaplan and Miller 2000), while the Erk1/2 pathway mediates neurotrophin-induced survival following neuronal damage (Hetman and Gozdz 2004). Recent studies using

pharmacological inhibitors of MEK1 have implicated the Erk1/2 pathway in the control of adult RGC death (Choi et al. 2003; Diem et al. 2003). For example, methylprednisolone-induced inhibition of Erk1/2 increased RGC apoptosis in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis (Diem et al. 2003). Taken together, these data underscore the importance of the classical Erk1/2 pathway in the survival of adult injured RGCs.

The AAV vectors used in this study mediated robust MEK1 transgene expression in multiple RGC compartments, including dendrites, axons and terminals in the brain. Importantly, MEK1 activation led to phosphorylation of Erk1/2 in injured RGC axons in the optic nerve. Under these conditions, there was no enhancement of axon regeneration beyond the lesion site. These data clearly show that RGC survival alone is not sufficient to promote axon regeneration. Of interest, upregulation of Bcl-2 in RGCs was sufficient to keep neurons alive, but failed to promote axon extension in culture (Goldberg et al. 2002), within the optic nerve (Chierzi et al. 1999; Lodovichi et al. 2002) or into a peripheral nerve graft (Inoue et al. 2002). In contrast, FGF-2 gene transfer promoted low RGC survival, but enhanced RGC axon growth *in vivo* (Sapieha et al. 2003). Of interest, FGF2 has been shown to induced P-Erk1/2 upregulation in retinal cells (Kinkl et al. 2001) and pharmacological inhibition of this pathway reduced BDNF-induced neurite sprouting in adult RGCs *in vitro* ((Bonnet et al. 2004)). Although Erk1/2 activation by itself is not sufficient to promote axon growth, we cannot rule out the possibility that Erk1/2 may regulate this process in concert with other signaling components.

RGCs have a limited capacity to regenerate within the optic nerve partly due to the abundance of growth inhibitory proteins in myelin and the glial scar (David and Lacroix 2003; Filbin 2003; Schwab 2004). The growth inhibitory environment of the optic nerve is rich in proteins such as Nogo-A (Caroni and Schwab 1988a; Caroni and Schwab 1988b), myelin-associated glycoprotein (MAG) (McKerracher et al. 1994; Mukhopadhyay et al. 1994) and oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) (Kottis et al. 2002) that restrict the extension of axons on myelin by interacting with the Nogo receptor (Fournier et al. 2001; Liu et al. 2002; Wang et al. 2002b). Nonetheless, injured RGC axons can regrow under certain experimental conditions including lens injury (Fischer et al. 2000; Leon et al. 2000), RhoA inhibition (Lehmann et al. 1999) and FGF-2 upregulation (Sapieha et al. 2003). Interestingly, a recent study demonstrated that inhibition of the Nogo receptor, a major

mediator of inhibitory signals in myelin (Fournier et al. 2001; Liu et al. 2002; Wang et al. 2002a; Wang et al. 2002b), was not sufficient to promote robust RGC regeneration unless the intrinsic growth state of these neurons was activated (Fischer et al. 2004). Although the intracellular pathways that underlie active axon regeneration by RGCs have not been elucidated, we provide evidence that stimulation of the Erk1/2 pathway is not sufficient for axon growth *in vivo*. Previous studies reported neurite or axon outgrowth from PC12 cells, embryonic chick retinal neurons, sympathetic and sensory neurons following Erk1/2 activation (Atwal et al. 2000; Dimitropoulou and Bixby 2000; Miura et al. 2000; Sjogreen et al. 2000; Wiklund et al. 2002), however these studies were carried out *in vitro* using permissive substrates. Overall, our data suggest that activation of other signaling components, independently or in conjunction with Erk1/2, are required for RGC axon regeneration in the growth inhibitory optic nerve environment. Nevertheless, given that Erk1/2 are markedly phosphorylated by AAV.MEK-ca, possibly several-fold over basal levels, we cannot rule out that this approach may have inhibitory or adverse effects that prevent axon regeneration.

In summary, we demonstrate that the Erk1/2 pathway plays a key role in the regulation of adult RGC survival after traumatic injury. Future studies will be essential to elucidate the signaling components that mediate active axon growth *in vivo*, which together with neuroprotection and suppression of growth inhibitors may lead to effective strategies for CNS repair.

Acknowledgements: This work was supported by grants to A.D.P. from the Canadian Institutes of Health Research, Glaucoma Research Foundation and Glaucoma Foundation; and to W.W.H. from the National Institutes of Health (RO1-11123) and the Macular Vision Research Foundation. We thank Dr. Natalie Ahn for providing the cDNAs encoding MEK1 mutants, Drs. Samuel David and Timothy Kennedy for comments on the manuscript, and Vince Chiodo for technical assistance. A.D.P. is a scholar of Fonds de recherche en santé du Québec. A.D.P., W.W.H., the Université de Montréal, and the University of Florida could be entitled to patent royalties for inventions related to this work and W.W.H. owns equity in a company that may commercialize some of the technology described in this work.

II.6.) REFERENCES

- Ali R. R., Reichel M. B., De Alwis M., Kanuga N., Kinnon C., Levinsky R. J., Hunt D. M., Bhattacharya S. S. and Thrasher A. J. (1998) Adeno-associated virus gene transfer to mouse retina. *Hum. Gene Ther.* **9**, 81-86.
- Angelucci A., Clasca F. and Sur M. (1996) Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J. Neurosci. Met.* **65**, 101-112.
- Atwal J. K., Massie B., Miller F. D. and Kaplan D. R. (2000) The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and PI3-kinase. *Neuron* **27**, 265-277.
- Bennet J., Duan D., Engelhardt J. F. and Maguire A. M. (2000) Cross-species comparison of in vivo reporter gene expression after recombinant adeno-associated virus-mediated retinal transduction. *Met. Enzymol.* **316**, 777-789.
- Bennett J., Duan D., Engelhardt J. F. and Maguire A. M. (1997) Real-time, noninvasive in vivo assessment of adeno-associated virus-mediated retinal transduction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 2857-2863.
- Bonnet D., Garcia M., Vecino E., Lorentz J. G., Sahel J. and Hicks D. (2004) Brain-derived neurotrophic factor signalling in adult pig retinal ganglion cell neurite regeneration in vitro. *Brain Res* **1007**, 142-151.
- Caroni P. and Schwab M. E. (1988a) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* **1**, 85-96.
- Caroni P. and Schwab M. E. (1988b) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* **106**, 1281-1288.
- Cavanaugh J. E. (2004) Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2056-2059.
- Chao M. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 299-309.
- Chen H. and Weber A. J. (2001) BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 966-974.

- Cheng L., Sapielha P., Kittlerová P., Hauswirth W. W. and 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 M. C. and Maffei L. (1999) Optic nerve crush: axonal responses in wild-type and bcl-2 transgenic mice. *J. Neurosci.* **19**, 8367-8376.
- Choi J. S., Kim J. A. and Joo C. K. (2003) Activation of MAPK and CREB by GM1 induces survival of RGCs in the retina with axotomized nerve. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 1747-1752.
- Datta S. R., Brunet A. and Greenberg M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **13**, 2905-2927.
- David S. and Lacroix S. (2003) Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 411-440.
- Di Polo A., Aigner L. J., Dunn R. J., Bray G. M. and Aguayo A. J. (1998) Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3978-3983.
- Diem R., Hobom M., Maier K., Weissert R., Storch M. K., Meyer R. and Bahr M. (2003) Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway. *J. Neurosci.* **23**, 6993-7000.
- Dimitropoulou A. and Bixby J. L. (2000) Regulation of neurite dendrite growth by alterations in MAPK/ERK kinase (MEK) activity. *Brain Res.* **858**, 205-214.
- Dudus L., Anand V., Acland G. M., Chen S.-J., Wilson J. M., Fisher K. J., Maguire A. M. and Bennett J. (1999) Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV. *Vis. Res.* **39**, 2545-2553.
- Ferrari F. K., Samulski T., Shenk T. and Samulski R. J. (1996) Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **70**, 3227-3234.
- Filbin M. T. (2003) Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 703-713.

- 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., Zhigang H. and Benowitz L. I. (2004) Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J. Neurosci.* **24**, 1646-1651.
- Fournier A. E., GrandPre T. and Strittmatter S. M. (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* **409**, 341-346.
- Goldberg J. L., Espinosa J. S., Xu Y., Davidson N., Kovacs G. T. A. and Barres B. A. (2002) Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron* **33**, 689-702.
- Grimm D., Kern A., Rittner K. and Kleinschmidt J. A. (1998) Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2745-2760.
- Guy J., Qi X., Muzyczka N. and Hauswirth W. W. (1999) Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve. *Arch. Ophthalmol.* **117**, 929-937.
- Harper S. J. and LoGrasso P. (2001) Signalling for survival and death of neurons. The role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell. Signaling* **13**, 299-310.
- Harvey A. R., Kamphuis W., Eggers R., Symons N. A., Blits B., Niclou S., Boer G. J. and Verhaagen J. (2002) Intravitreal injection of adeno-associated viral vectors results in the transduction of different types of retinal neurons in neonatal and adult rats: a comparison with lentiviral vectors. *Mol. Cell Neurosci.* **21**, 141-157.
- Hauswirth W. W., Lewin A. S., Zolotukhin S. and Muzyczka N. (2000) Production and purification of recombinant adeno-associated virus. *Met. Enzymol.* **316**, 743-761.
- Hetman M. and Gozdz A. (2004) Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2050-2055.
- Huang E. J. and Reichardt L. F. (2001) Neurotrophins: role in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 677-736.
- Huang E. J. and Reichardt L. F. (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 609-642.

- Inoue T., Hosokawa M., Morigiwa K., Ohashi Y. and 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. and Cellerino A. (2003) Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **22**, 483-543.
- Kamakura S., Moriguchi T. and Nishida E. (1999) Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **274**, 26563-26571.
- Kaplan D. and Miller F. D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 381-391.
- Kinkl N., Sahel J. and Hicks D. (2001) Alternate FGF2-ERK1/2 signaling pathways in retinal photoreceptor and glial cells in vitro. *J Biol Chem* **276**, 43871-43878. Epub 42001 Sep 43824.
- Klöcker N., Kermer P., Weishaupt J. H., Labes M., Ankerhold R. and Bähr M. (2000) Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B signaling. *J. Neurosci.* **20**, 6962-6967.
- Kottis V., Thibault P., Mikol D., Xiao Z. C., Zhang R., Dergham P. and Braun P. E. (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J. Neurochem.* **82**, 1566-1569.
- 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.
- Liu B. P., Fournier A., GrandPre T. and Strittmatter S. M. (2002) Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* **297**, 1190-1193.
- Lodovichi C., Di Cristo G., Cenni M. C. and Maffei L. (2002) Bcl-2 overexpression per se does not promote regeneration of neonatal crushed optic fibers. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 833-838.

- Lu B. (2004) Acute and long-term synaptic modulation of neurotrophins. *Prog. Brain Res.* **146**, 137-150.
- Mansour S. J., Candia J. M., Matsuura J. E., Manning M. C. and Ahn N. (1996) Interdependent domains controlling the enzymatic activity of mitogen-activated protein kinase kinase 1. *Biochem.* **35**, 15529-15536.
- 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. USA* **91**, 1632-1636.
- Martin K. R., Klein R. L. and Quigley H. A. (2002) Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* **28**, 267-275.
- Martin K. R., Quigley H. A., Zack D. J., Levkovitch-Verbin H., Kielczewski J., Valenta D., Baumrind L., Pease M. E., Klein R. L. and Hauswirth W. W. (2003) Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 4357-4365.
- Matteau I., Boire D. and Ptito M. (2003) Retinal projections in the cat: a cholera toxin B subunit study. *Vis. Neurosci.* **20**, 481-493.
- McKerracher L., David S., Jackson D. L., Kottis V., Dunn R. J. and Braun P. E. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* **13**, 805-811.
- McLaughlin S., Collis P., Hermonat P. and Muzyczka N. (1988) Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* **62**, 1963-1973.
- Mey J. and 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.
- Mikkelsen J. D. (1992) Visualization of efferent retinal projections by immunohistochemical identification of cholera toxin subunit B. *Brain Res. Bull.* **28**, 619-623.
- Miller F. D. and Kaplan D. (2003) Signaling mechanisms underlying dendrite formation. *Curr. Op. Neurobiol.* **13**, 391-198.

- Miura T., Tanaka S., Seichi A., Arai M., Goto T., Katagiri H., Asano T., Oda H. and Nakamura K. (2000) Partial functional recovery of paraplegic rat by adenovirus-mediated gene delivery of constitutively active MEK1. *Exp. Neurol.* **166**, 115-126.
- Mody N., Leitch J., Armstrong C., Dixon J. and Cohen P. (2001) Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Lett.* **502**, 21-24.
- Mukhopadhyay G., Doherty P., Walsh F. S., Crocker P. R. and Filbin M. T. (1994) A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* **13**, 757-767.
- Peinado-Ramon P., Salvador M., Villegas-Perez M. P. and 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.
- Pérez M. T. R. and Caminos E. (1995) Expression of brain-derived neurotrophic factor and its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci. Lett.* **183**, 96-99.
- Rickman D. W. and Brecha N. C. (1995) Expression of the proto-oncogene, *trk*, receptors in the developing rat retina. *Vis. Neurosci.* **12**, 215-222.
- 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.
- Sawai H., Clarke D. B., Kittlerova P., Garth G. M. and Aguayo A. J. (1996) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulate growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* **16**, 3887-3894.
- Schwab M. (2004) Nogo and axon regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 118-124.
- Sjogreen B., Wirklund P. and Ekström P. A. R. (2000) Mitogen activated protein kinase inhibition by PD98059 blocks nerve growth factor stimulated axonal outgrowth from adult mouse dorsal root ganglia in vitro. *Neuroscience* **100**, 407-416.
- Wang K. C., Kim J. A., Sivasankaran R., Segal R. and He Z. (2002a) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* **420**, 74-78.
- Wang K. C., Koprivica V., Kim J. A., Sivasankaran R., Guo Y., Neve R. L. and He Z. (2002b) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* **417**, 941-944.

Wiklund P., Ekström P. A. and Edström A. (2002) Mitogen-activated protein kinase inhibition reveals differences in signalling pathways activated by neurotrophin-3 and other growth-stimulating conditions of adult mouse dorsal root ganglia neurons. *J. Neurosci. Res.* **67**, 62-68.

Xiao X., Li J. and Samulski R. J. (1996) Long-term and efficient in vivo gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice with an rAAV vector. *J. Virol.* **70**, 8098-8108.

Xiao X., Li J., McCown T. J. and Samulski R. J. (1997) Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system. *Exp. Neurol.* **144**, 113-124.

Zolotukhin S., Potter M., Hauswirth W. W., Guy J. and Muzyczka N. (1996) A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J. Virol.* **70**, 4646-4654.

Figure 1. Experimental protocol used to test the effect of MEK1 gene transfer on RGC survival and regeneration.

(A) For neuronal survival assays, RGCs were retrogradely labeled with FluoroGold and subsequently axotomized at 4 weeks after intraocular (IO) injection of AAV vectors. The time required for AAV-mediated transgene expression to reach a plateau in the adult rat retina is 3-4 weeks. RGC survival was assessed by quantification of fluorescent neurons in whole-mounted retinas at 1, 2 or 4 weeks after optic nerve lesion. Control groups included animals that received a single injection of AAV.MEK-wt or AAV.GFP. (B) Micro-crush lesion (MC) of the optic nerve was performed 4 weeks after IO injection of AAVs. Thirteen days after injury, RGC axons were anterogradely labeled by IO injection of CT β and 24 hrs later (2 weeks postlesion), animals were sacrificed and the optic nerves were processed for analysis of axon growth. Control groups included animals that received a single intravitreal injection of AAV.MEK-wt or AAV.GFP.

Figure 2. AAV mediates MEK-ca gene product expression in adult RGCs.

Fluorescent microscopy images of retinal sections stained with an HA antibody at 4 weeks following intraocular injection of AAVs. (Panels A, B) AAV-mediated MEK-ca or MEK-wt was visualized in cell bodies in the ganglion cell layer (GCL), dendrites in the inner plexiform layer (IPL) and axons in the fiber layer (FL). Retinas treated with AAV.GFP showed no staining (Panel C). Co-localization of HA immunostaining (Panels D, G) with the retrograde tracer FluoroGold (FG) (Panels E, H) confirmed specific expression of MEK transgenes in RGCs (Panels F, I). FG-stained RGCs were visualized using a GFP filter (exciter: 405-445; emitter: 485-525) providing a green color that facilitates the display of double-labeling with HA antibody (red). Co-localization of HA immunostaining (Panels J, M) with an antibody that recognized phosphorylated Erk1/2 (Panels K, N) demonstrated selective activation of Erk1/2 in RGCs expressing MEK-ca but not in AAV.GFP-infected cells (Panels L, O). Scale bars: A-C= 100 μm ; D-F= 25 μm ; G-O= 10 μm . ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; FL: fiber layer.

Figure 3. AAV.MEK-ca activates Erk1/2 in adult RGCs *in vivo*.

(Panel A) *In vivo* activation of Erk1/2 kinases was detected in retinal homogenates at 4 weeks after injection of AAV.MEK-ca compared to control eyes. In contrast, the levels of phosphorylated Akt (Panel B) or Erk5 (Panel C) were not increased following MEK1 gene transfer. Lower panels in (A), (B) and (C) show the same blot re-probed with antibodies that recognize non-phosphorylated Erk1/2, Akt or Erk5 to verify equal protein loading.

Figure 4. MEK1 transgene products are transported along RGC axons to targets in the brain.

(Panel A) HA-positive RGC axons containing transgenic MEK-ca were observed in the fiber layer within the retina, at the optic nerve head and in the optic nerve. Panel B shows a higher magnification image of HA-positive axons within the optic nerve. Large numbers of HA-labeled RGC terminal arbors were visualized in the superior colliculus contralateral (Contra) to the AAV-injected eye (Panel C). In contrast, HA staining was not detected in the ipsilateral (Ipsi) superior colliculus (Panel D). Panel E shows a higher magnification micrograph of HA-positive RGC terminal arbors in the superficial gray layer (SG) of the contralateral superior colliculus. HA labeling was also observed in the region corresponding to the contralateral dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) (Panel F), a structure that could be readily identified using dark field microscopy (Panel G). Scale bars: A= 250 μm ; B-D and F-G= 100 μm ; E= 50 μm . ON: optic nerve; ONH: optic nerve head; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; Zo: zonal layer; SG: superficial gray layer; Op: optic nerve layer; dLGN: dorso-lateral geniculate nucleus; vLGN: ventro-lateral geniculate nucleus; Po: posterior thalamic nucleus.

Figure 5. AAV.MEK-ca protects RGCs from axotomy-induced death.

A higher density of HA-labeled RGCs was always observed in the superior (dorsal) retinal quadrant (Panel A), the site of AAV injection. Quantitative analysis of RGC survival following injection of AAV.MEK-ca (solid bars), AAV.MEK-wt (gray bars) or AAV.GFP (hatched bars) is shown for whole retina (Panel B) or superior quadrant only (Panel C). The density of RGCs in intact, unoperated retinas is shown as reference (open bar). MEK-ca gene transfer markedly increased the number of RGCs that survived after axotomy (ANOVA: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$). This neuroprotective effect led to higher neuronal densities and better preservation of cellular integrity (Panel D) than with control vectors (Panels E and F). Scale bars: A= 400 μm ; D-F= 100 μm .

Figure 6. RGC survival correlates with AAV-mediated MEK-ca expression in injured RGCs.

(Panels A-C) Fluorescent microscopy images of retinal sections following AAV.MEK-ca administration show co-localization of HA labeling, used to visualize AAV-mediated MEK, and FluoroGold (FG), used to identify surviving RGCs, at 4 weeks after axotomy. (D) Quantification of the number of cells in the ganglion cell layer co-stained with FG and HA indicated that 86% of surviving RGCs expressed MEK-ca at 4 weeks post-lesion. These data strongly support that intracellular Erk1/2 activation mediates RGC survival *in vivo*. Scale bar: A-C= 25 μ m.

Figure 7. MEK-ca gene transfer does not stimulate RGC axon regeneration.

(Panel A) Optic nerve immunostaining with an antibody that recognized phosphorylated Erk1/2 demonstrated robust labeling in many transected RGC axons proximal (P) to the lesion site (shown with asterisks). Panel B shows the same section as in Panel A visualized using dark field microscopy for accurate identification of the injury site (asterisks). Phospho-Erk1/2 staining was not observed in the distal nor proximal nerve segments from eyes treated with control AAV.GFP (Panel C: phospho-Erk1/2, Panel D: dark field). Staining with an antibody against the anterograde axon tracer cholera toxin β -subunit (CT β) demonstrated that in both AAV.MEK-ca (Panel E: CT β ; Panel F: dark field) and AAV.GFP (Panel G: CT β , Panel H: dark field) very few fibers crossed into the distal (D) nerve. In contrast, many CT β -positive axons were visualized in the distal optic nerve following lens injury (Panel I: CT β , Panel J: dark field), shown to stimulate RGC survival and axon growth in the mature optic nerve, thus serving as positive control for RGC axon regeneration. (K) Number of RGC axons (mean \pm S.E.M.) extending past the lesion after a single intravitreal injection of AAV.MEK-ca (solid bars) or AAV.GFP (hatched bars) at 2 weeks after axotomy. The difference in axon growth between AAV.MEK-ca and AAV.GFP at all distances examined from the injury site was not significant ($P > 0.05$). Scale bars: A-J= 200 μ m.

II.7.) TABLES

Table 1. Survival of axotomized RGCs following *in vivo* MEK1 gene transfer.

RGCs/mm² ± S.E.M.
(% of intact contralateral retinas), n

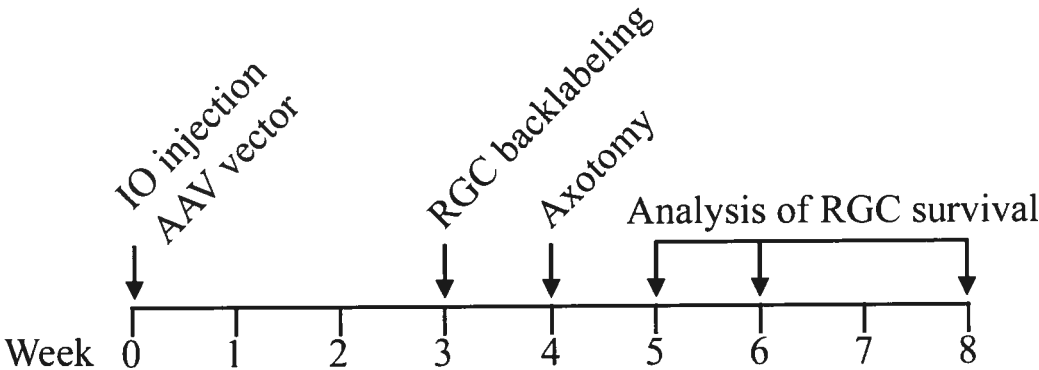
Retinal Quadrant (s)	Viral Vector	Time After Axotomy		
		1 week	2 weeks	4 weeks
Superior	AAV.MEK-ca	1232 ± 56 (62%), n=7	904 ± 160 (45%), n=9	336 ± 92 (17%), n=9
	AAV.MEK-wt	972 ± 56 (49%), n=4	444 ± 68 (22%), n=6	156 ± 32 (8%), n=5
	AAV.GFP	788 ± 120 (40%), n=3	352 ± 128 (18%), n=3	40 ± 8 (2%), n=4
All	AAV.MEK-ca	1382 ± 46 (63%), n=8	675 ± 73 (31%), n=10	220 ± 32 (10%), n=9
	AAV.MEK-wt	1103 ± 32 (51%), n=4	452 ± 42 (21%), n=6	147 ± 18 (7%), n=5
	AAV.GFP	827 ± 100 (38%), n=4	355 ± 31 (16%), n=3	70 ± 10 (3%), n=4

Contralateral intact retinas: Superior = 2000 ± 80 RGCs/mm² (100%), n=15

All = 2180 ± 64 RGCs/mm² (100%), n=15

FIGURE 1

A. RGC survival



B. RGC axon regeneration

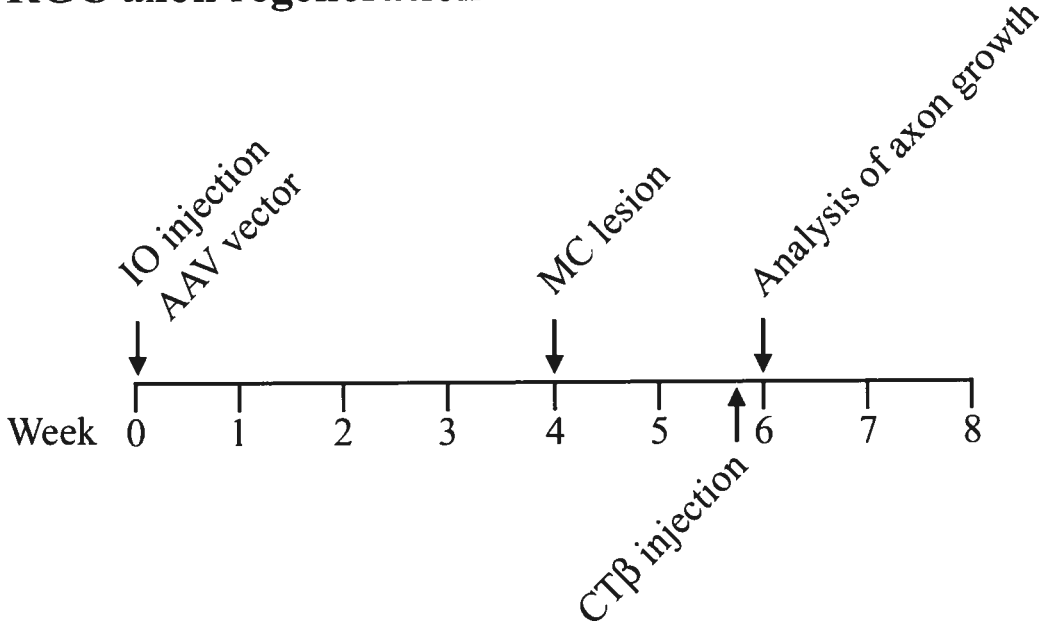


FIGURE 2

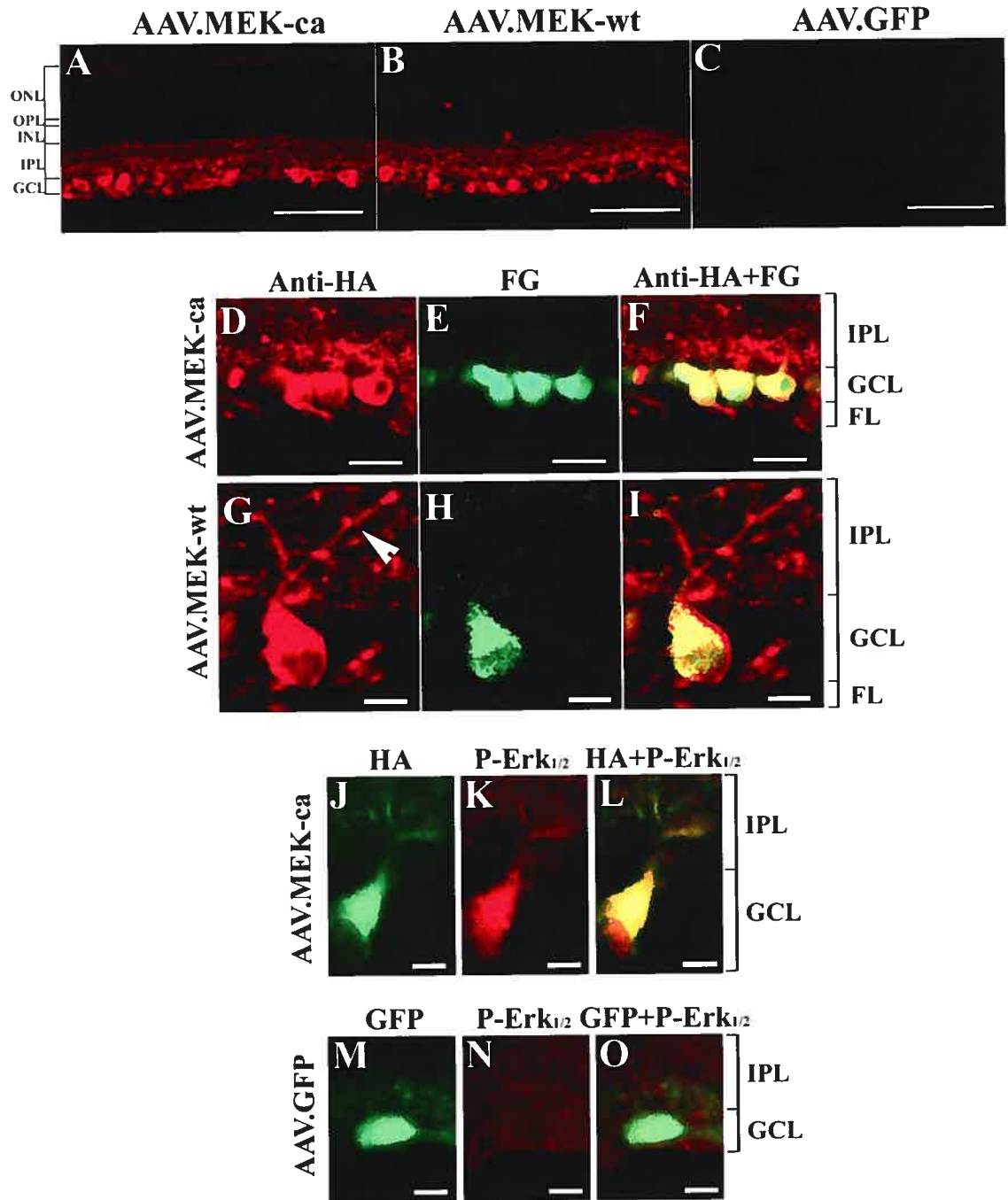


FIGURE 3

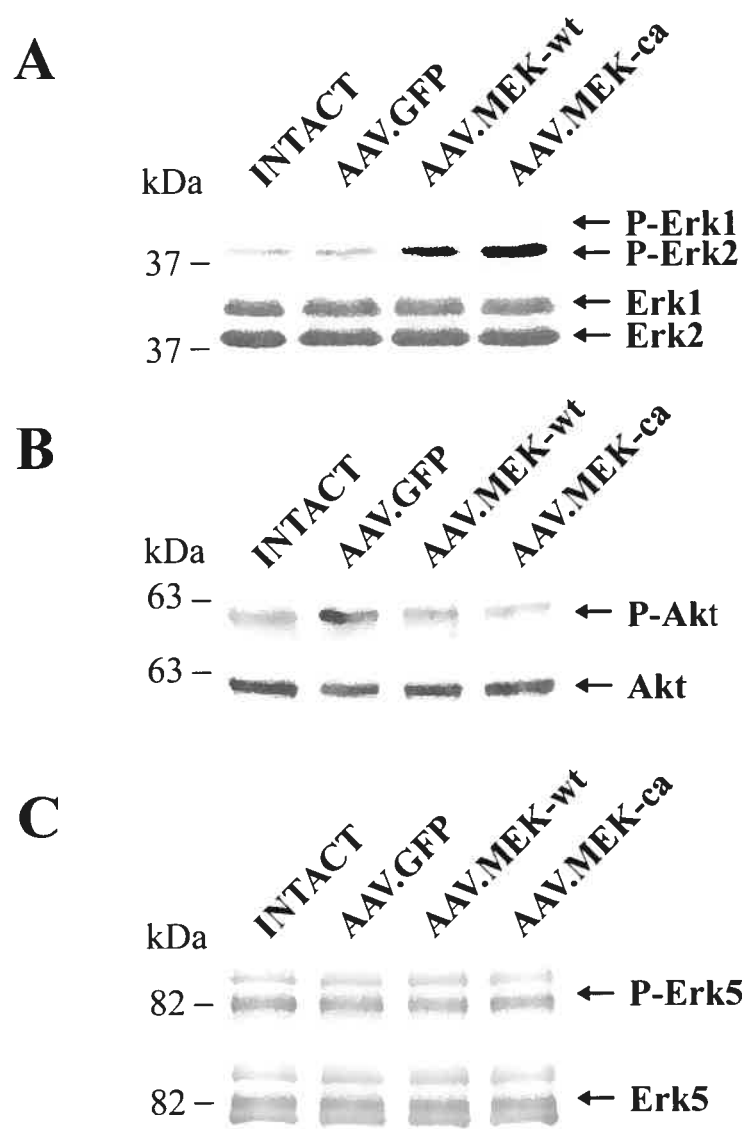


FIGURE 4

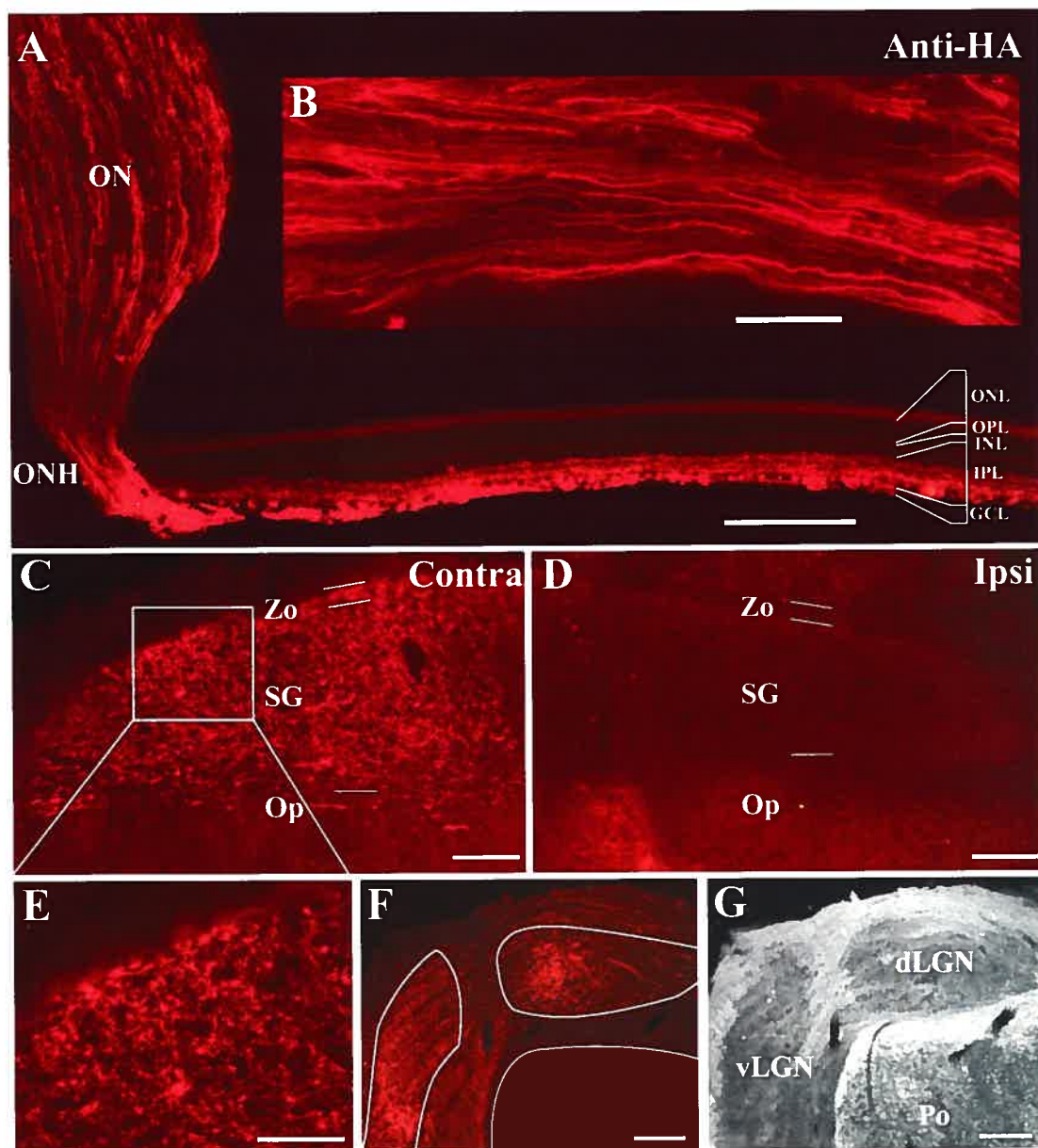


FIGURE 5

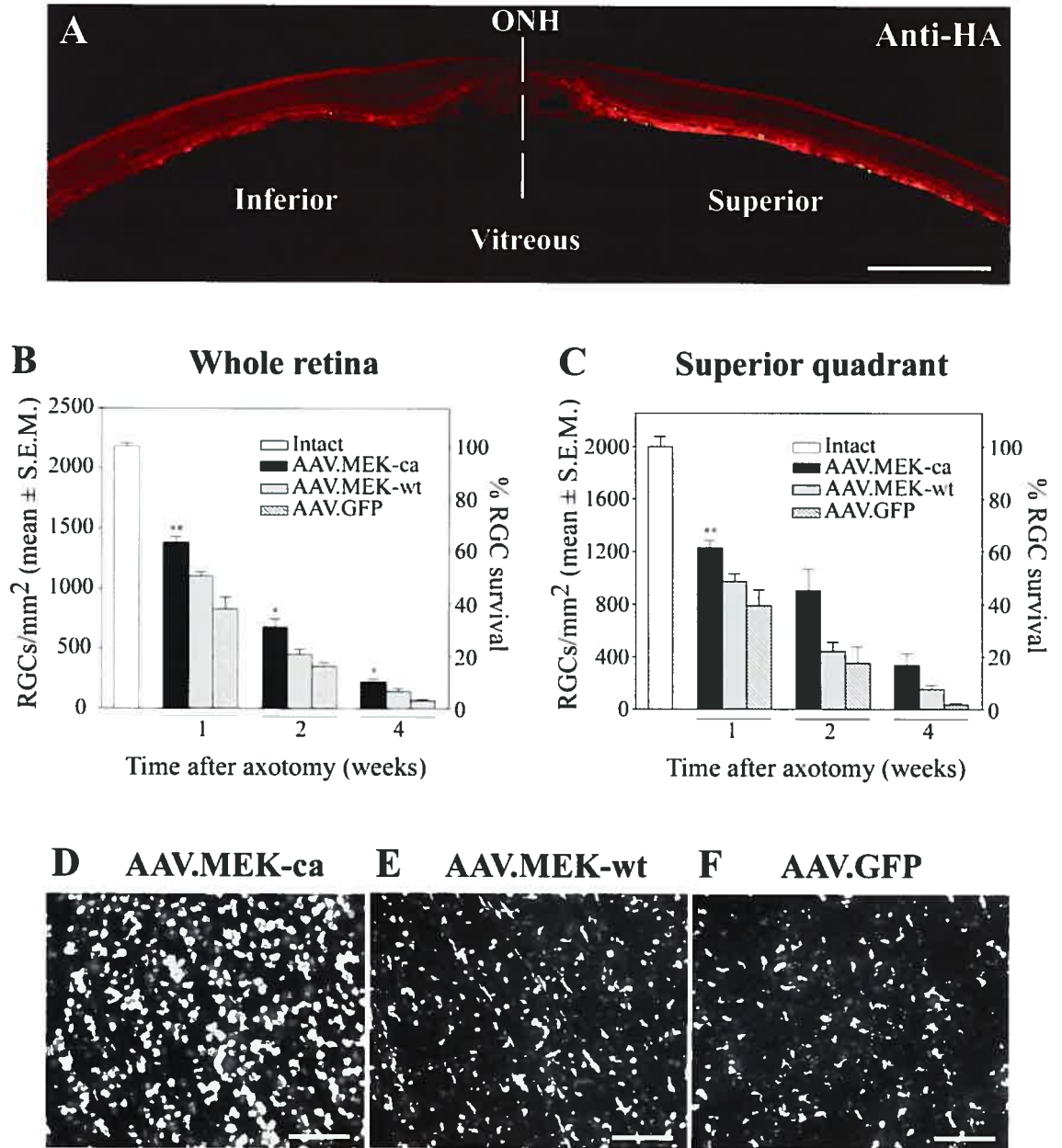


FIGURE 6

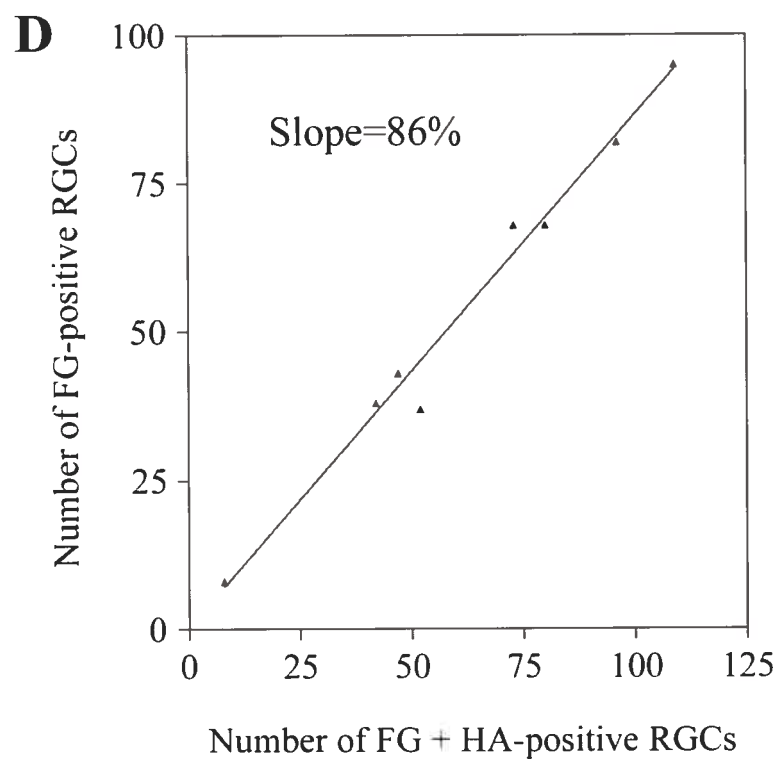
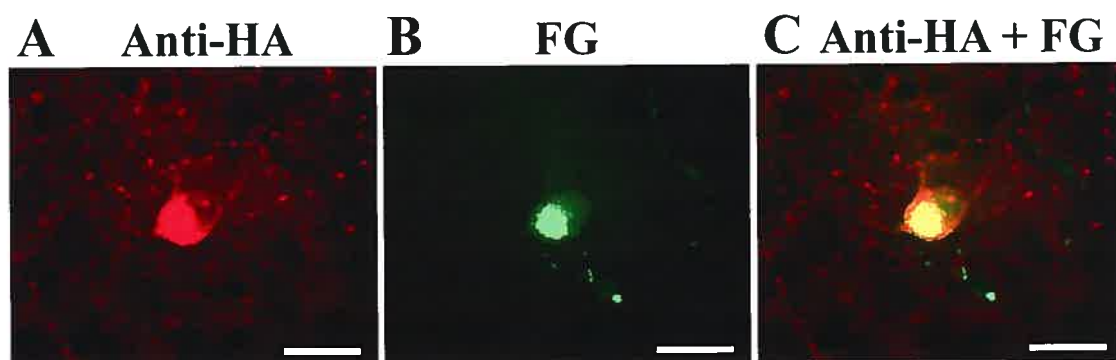
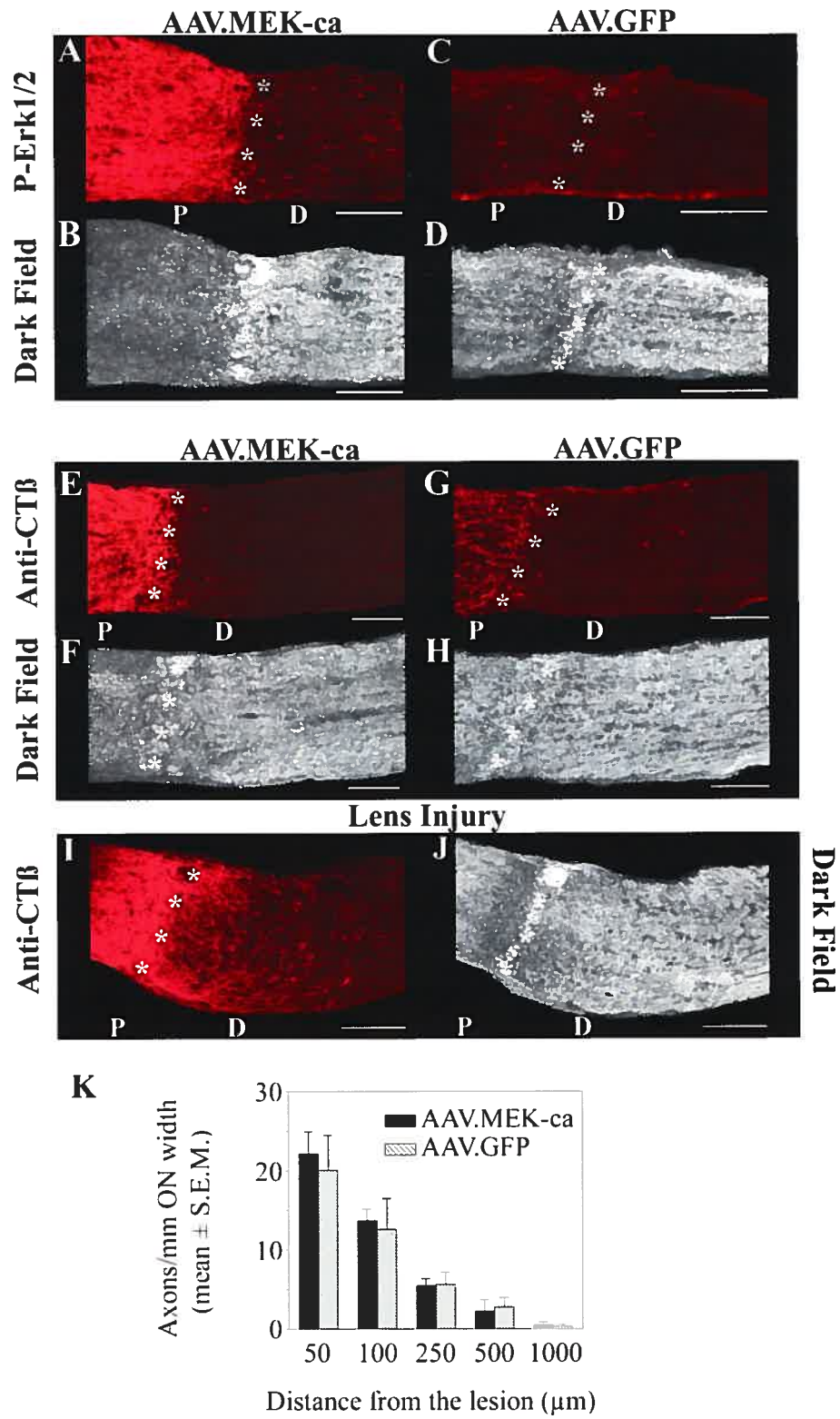


FIGURE 7



CHAPITRE 3

III.) DEUXIÈME ARTICLE: “SYNERGISTIC ACTION OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AND LENS INJURY PROMOTES RETINAL GANGLION CELL SURVIVAL, BUT LEADS TO OPTIC NERVE DYSTROPHY *IN VIVO*”

Brain, 2006, sous presse.

(Disponible en ligne le 17 janvier 2006)

**SYNERGISTIC ACTION OF BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR AND LENS
INJURY PROMOTES RETINAL GANGLION CELL SURVIVAL,
BUT LEADS TO OPTIC NERVE DYSTROPHY IN VIVO**

Vincent Pernet¹ and Adriana Di Polo^{1,2}.

¹Department of Pathology and Cell Biology and ²Department of Ophthalmology, Université de Montréal, 2900 Boulevard Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada.

Abbreviated Title: BDNF and lens injury cause optic nerve degeneration

Number of Figures: 10 (8 + 2 supplementary); Number of Tables: 0

Number of text pages: 31

Corresponding Author: **Adriana Di Polo, Ph.D.**
Department of Pathology and Cell Biology
Université de Montréal
2900, Boul. Edouard-Montpetit
Pavillon Roger-Gaudry, Room N-535
Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada
Phone: (514) 343-6109
Fax: (514) 343-5755
E-mail: [REDACTED]

Key words: brain-derived neurotrophic factor, lens injury, retinal ganglion cells, neuroprotection, axonal regeneration.

Acknowledgements: This work was supported by grants to A.D.P. from the Canadian Institutes of Health Research, the Canadian Institute for the Blind (E.A. Baker Foundation), the Glaucoma Research Foundation and the Glaucoma Foundation. We thank Dr. Timothy Kennedy (McGill University) for comments on the manuscript, Dr. Laurent Descarries and Michel Lauzon (Université de Montréal) for assistance with electron microscopy. A.D.P. is a scholar of Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ).

III.1.) ABSTRACT

Trauma or disease in the central nervous system (CNS) often leads to neuronal death and consequent loss of functional connections. The idea has been put forward that strategies aimed at repairing the injured CNS require stimulation of both neuronal survival and axon regeneration. We tested this hypothesis in the adult rat retinocollicular system by combining two strategies: i) exogenous administration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a potent survival factor for damaged retinal ganglion cells (RGCs), and ii) lens injury, which promotes robust growth of transected RGC axons. Our results demonstrate that BDNF and lens injury interact synergistically to promote neuronal survival: 71% of RGCs were alive at two weeks after optic nerve injury, a time when only ~10% of these neurons remain without treatment. Intravitreal injection of BDNF, however, led to regeneration failure following lens injury. The effect of BDNF could not be generalized to other growth factors, as ciliary neurotrophic factor did not cause a significant reduction of lens injury-induced regeneration. Growth arrest in optic nerves treated with BDNF and lens injury correlated with the formation of hypertrophic axonal swellings in the proximal optic nerve. These swellings were filled with numerous vesicular bodies, disorganized neurofilaments and degenerating organelles. Our results demonstrate that: i) increased neuronal survival does not necessarily lead to enhanced axon regeneration, and ii) activation of survival and growth pathways may produce axonal dystrophy similar to that found in neurodegenerative disorders including glaucoma, Alzheimer's disease and multiple sclerosis. We propose that loss of axonal integrity may limit neuronal recovery in the injured, adult CNS.

III.2.) INTRODUCTION

Injury to the brain or spinal cord of adult mammals leads to neuronal death, loss of cell-cell interactions and persistent functional deficits. Attempts to repair the injured central nervous system (CNS) have identified two fundamental conditions that need to be fulfilled: i) to prevent or delay the loss of neurons following injury; and ii) to overcome the failure of axons to extend towards appropriate targets (Bray et al., 1991; Doster et al., 1991). Therefore, therapies that stimulate both neuronal viability and axon growth may prove beneficial after CNS lesion.

The rat retinocollicular system is ideal to test strategies that promote survival and regeneration of adult retinal ganglion cells (RGCs). RGCs are a well-characterized CNS neuronal population, with cell bodies located in the inner retina and axonal processes along the optic nerve that reach specific targets in the brain. This highly polarized cytoarchitecture allows the use of retrograde and anterograde neurotracers to unequivocally identify RGC soma or axons, respectively (Pernet et al., 2005; Sapielha et al., 2003). Furthermore, the accessibility and anatomy of the eye is suitable for intravitreal injection of survival factors and other reagents that can readily diffuse to reach RGCs.

Neurotrophins play important roles in the survival response of adult RGCs to injury. Among neurotrophins, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is the most potent survival factor for damaged RGCs (Chen and Weber, 2001; Di Polo et al., 1998; Klocker et al., 2000; Mansour-Robaey et al., 1994; Mey and Thanos, 1993; Peinado-Ramon et al., 1996). BDNF, however, lacks the ability to promote RGC axon regeneration into peripheral nerve grafts or within the optic nerve (Isenmann et al., 2003; Yip and So, 2000). In contrast, robust RGC axon regeneration has been achieved by causing a small, wound puncture to the lens of adult rats (Fischer et al., 2000; Leon et al., 2000). In this paradigm, if the lens is damaged at the time of optic nerve crush, many RGCs regenerate their axons into the distal nerve. The effect of lens injury on axon growth has been proposed to be mediated by macrophage-released factors, but the precise mode of action remains unknown (Yin et al., 2003). Importantly, the molecular mechanisms that mediate the regenerative effect of lens injury are independent of BDNF, as neutralizing antibodies against this neurotrophin failed to diminish the number of RGC axons that extended after lens injury both *in vivo* (Leon et al., 2000) and *in vitro* (Lorber et al., 2002).

Here we tested the hypothesis that combination of a potent survival factor (BDNF) with a strategy that promotes axon growth (lens injury) may increase RGC viability and, consequently, enhance long-distance axon regeneration in the injured CNS. Our results demonstrate that combined BDNF and lens injury had a remarkable, synergistic effect on the survival of injured RGCs. However, intravitreal administration of BDNF at the time of lens injury completely blocked the ability of RGC axons to regrow past the lesion site. Moreover, lack of axon regeneration correlated with the formation of hypertrophic axonal swellings in the proximal optic nerve. Together, our data demonstrate an unexpected, adverse effect of combining two potent neuroprotective and regenerative strategies in the injured, mammalian visual system.

III.3.) EXPERIMENTAL PROCEDURES

III.3.1.) Intravitreal injections

Animal procedures were in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals. All surgeries were performed in adult female Sprague-Dawley rats (180-200 g) under general anesthesia (2% Isoflurane, 0.8 liter/min). Five μ l of BDNF recombinant protein (1 μ g/ μ l, Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY), ciliary neurotrophic factor (CNTF) recombinant protein (1 μ g/ μ l, PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ), or phosphate buffered-saline (PBS) were injected into the vitreous chamber of the left eye using a 10- μ l Hamilton syringe adapted with a 32-gauge needle. Contralateral eyes or unoperated eyes served as intact controls. The needle tip was inserted into the superior hemisphere of the eye, at the level of the pars plana, at a 45° angle through the sclera into the vitreous body. This route of administration avoided retinal detachment or injury to eye structures, including the lens and the iris, which release factors that induce RGC regeneration and survival (Leon et al., 2000; Mansour-Robaey et al., 1994). The injection was performed within 1 min and the needle was kept in place for an additional period of ~2 min, after which it was gently removed. Surgical glue (Indermill, Tyco Health Care, Mansfield, MA, USA) was used to seal the site of injection. Intraocular injections were performed immediately after optic nerve lesion as described below.

III.3.2.) Optic nerve axotomy and analysis of neuronal survival

RGCs were backlabeled by application of FluoroGold (2%, Fluorochrome, Englewood, CO) onto both superior colliculi. One week later, the left optic nerve was transected at 0.5-1 mm from the optic nerve head avoiding damage to the ophthalmic artery. At 2 weeks post-lesion, rats were euthanized by intracardial perfusion with 4% paraformaldehyde. Fundus examination was performed to check the integrity of the retinal circulation after surgery, and animals showing signs of compromised blood supply were excluded from the study. The left (injured) retinas and the right (intact control) retinas were removed, fixed for an additional 30 min and flat-mounted vitreal side up on a glass slide for examination of the ganglion cell layer. RGCs backfilled with FluoroGold were counted in 12 standard retinal areas as previously described (Cheng et al., 2002; Sapielha et al., 2003). Microglia and macrophages, that may have incorporated FluoroGold after phagocytosis of dying RGCs, were excluded from our analysis of neuronal survival based on their morphology (Raibon et al., 2002) that can be easily identified in retinal whole mounts. In addition, the identity of these cells has been confirmed by immunostaining with antibodies against the microglia and macrophage markers isolectin-B4 and ED-1 (Cheng et al., 2002). Data analysis and statistics were performed using the GraphPad InStat software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) by a one-way analysis of variance (ANOVA) test.

III.3.3.) Optic nerve micro-crush, lens injury and analysis of axonal regeneration

The optic nerve sheath, comprising meninges and dura, was cut to expose the optic nerve. Then, a complete knot was tied around the nerve using a fine silk suture (10-0), the nerve was constricted for exactly 60 sec, then the suture was carefully released as described (Sapielha et al., 2003). Thirteen days after optic nerve injury, 5 μ l of 1% cholera toxin β subunit (CT β , List Biological Laboratories, Campbell, CA) was injected into the vitreous chamber. Twenty-four hrs later (2 weeks post-micro-crush lesion), animals were sacrificed and the eyes were processed for optic nerve immunostaining as described below. Some animals received a wound puncture to the lens at the time of micro-crush lesion as described (Leon et al., 2000). Briefly, a 30-gauge needle was used to puncture the posterior plane of the lens and the wound was immediately monitored through the cornea. This procedure led to complete opacification of the lens within the first week after injury.

Axonal growth was quantified by counting CT β -positive axons that crossed a virtual line parallel to the lesion site at 250 μ m, 500 μ m and 1 mm past the lesion site in three to four longitudinal sections of optic nerve per animal as described (Sapieha et al., 2003) . Sections were chosen in both central and peripheral regions of the optic nerve to quantify axon growth in the entire nerve. During quantification, the injury site was identified in the same optic nerve section by dark field microscopy. In addition, the location of the lesion site was routinely confirmed in the same section or in an immediately adjacent section using hematoxylin/eosin staining. The thickness of the optic nerve was measured at each point where axons were counted and this value was used to normalize the number of axons per mm of nerve width. Statistics were performed using the GraphPad Instat program by ANOVA.

III.3.4.) Retina and optic nerve immunohistochemistry

Animals were perfused with 4% paraformaldehyde and the eyes and optic nerves were rapidly dissected, the cornea and the lens were removed. Tissue was embedded in optimal cutting temperature (O.C.T.) compound (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN). Optic nerve (14 μ m) or retinal (16 μ m) cryosections were collected onto gelatin-coated slides. Tissue sections were pre-incubated in 5% BSA, 3% normal serum, 0.2% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 30 min at room temperature to block non-specific binding. Primary antibody incubation was performed in 5% BSA, 3% normal serum, 0.3% Triton X-100 in PBS overnight at 4°C. Slices were then incubated with the appropriate secondary antibody for 1 hr at room temperature, and mounted with an anti-fade reagent (SlowFade, Molecular Probes, Eugene, OR). Primary antibodies were: goat CT β antibody (1:4,000 dilution, List Biological Labs), monoclonal anti-rat monocytes/macrophages (2.5 μ g/ml, Clone ED1, Chemicon International), monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, 2 μ g/ml Chemicon International, Temecula, CA), chicken anti-human BDNF (2.5 μ g/ml, Promega, Woods Hollow-Road Madison, WI), monoclonal anti-synaptophysin (1:200 dilution, NCL-SYNAP-299, Novocastra, UK), polyclonal anti-vesicle glutamate transporter 2 (VGlut2, 1:1,000 dilution, Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Germany), monoclonal anti-synaptic vesicle 2 (SV2, 1:4,000 dilution, Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences, University of Iowa, USA), or mouse RT97 antibody (1:200 dilution,

gift from Dr John N. Wood, University College London, London, UK). Fluorescent staining was examined using a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada, Kirkland, QC) and pictures were captured with a CCD video camera (Retiga, Qimaging, Burnaby, British Columbia) and analysed with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON).

III.3.5.) Preparation of recombinant AAV.GFP for visualization of RGC axons

An adeno-associated virus (AAV) serotype 2 containing the green fluorescent protein (GFP) gene (AAV.GFP) was used to trace RGC axons. AAV.GFP was generated by inserting a GFP cDNA downstream of the hybrid cytomegalovirus enhancer/chicken β -actin promoter in the plasmid pXX-UF12, a derivative of pTR-UF5 (Zolotukhin et al., 1996). AAV.GFP vector was packaged, concentrated and titered as previously described (Hauswirth et al., 2000). The number of infectious particles/ml (ip/ml) was determined by infectious center assay as described (McLaughlin et al., 1988) and was 10^{10} ip/ml for AAV.GFP. No helper adenovirus or wild-type AAV contamination was detected in these preparations. AAV-mediated transgene expression reaches a plateau between 3-4 weeks after administration of the vector into the rodent eye (Ali et al., 1998; Bennet et al., 2000; Bennett et al., 1997; Cheng et al., 2002), and persists thereafter (Guy et al., 1999). The reason for delayed onset of AAV-mediated gene expression *in vivo* is unclear, but may arise from the need to convert single-stranded viral DNA to a double-strand prior to active transcription (Ferrari et al., 1996). Therefore, to insure high levels of GFP protein expression in RGC axons at the time of analysis, AAV.GFP ($5 \mu\text{l} = 5 \times 10^7$ i.p.) was injected into the vitreous chamber and subsequent surgical procedures were performed 3 weeks after virus administration (Fig. 2A). GFP labeling was directly examined on retinal flat-mounts or optic nerve sections at 2 weeks after optic nerve injury (5 weeks following virus injection).

III.3.6.) Electron microscopy

Animals were perfused intracardially with 3.5% glutaraldehyde in Sorensen phosphate buffer (0.067M) and optic nerves were collected. Tissue was then incubated in 2% osmium tetroxide, successively dehydrated in graded solutions of ethanol and

embedded in epoxy resin (TAAB 812 resin, Marivac, Montreal, QC, Canada). Semi-thin longitudinal sections (0.5 μm -thick) were cut and stained with 1% toluidine blue mixed with 1% borax. For electron microscopy, 70 nm-thick sections were cut in the central region of the proximal optic nerve, ~ 1 mm before the lesion site. Ultrathin sections were counterstained with 3% uranyl acetate and Reynolds's lead citrate and visualized with a Zeiss CEM902 electron microscope.

III.4.) RESULTS

III.4.1.) BDNF and lens injury interact synergistically to promote robust RGC survival *in vivo*

We compared the independent and combined effects of BDNF and lens injury on the survival of axotomized RGCs. For this purpose, RGCs were retrogradely labeled with FluoroGold one week prior to optic nerve transection. BDNF injection and/or lens injury were performed immediately after axotomy, and the density of surviving neurons was evaluated at two weeks post-lesion as shown in Fig. 1A.

Experimental groups included animals with optic nerve axotomy that received: i) a single intraocular injection of BDNF ($n=4$), ii) a single puncture to the lens ($n=4$), iii) combined BDNF injection and lens injury ($n=5$), or iv) no treatment (uninjected, $n=4$). As expected, a single intraocular injection of BDNF (Fig. 1B) or lens injury (Fig. 1C) had marked, independent effects on RGC survival. Our quantitative analysis showed that a similar number of RGCs survived with BDNF (971 ± 87 RGCs/ mm^2 , mean \pm S.E.M.) or lens injury (958 ± 66 RGCs/ mm^2) at two weeks after axotomy (Fig. 1F). These results are consistent with previous reports on the neuroprotective effect of BDNF (Cheng et al., 2002; Mansour-Robaey et al., 1994) or lens injury (Fischer et al., 2001; Leon et al., 2000).

We then examined if lens injury combined with a single intravitreal injection of BDNF protein at the time of axotomy could potentiate RGC survival. This approach led to a dramatic increase in the density of RGCs after optic nerve injury (Fig. 1D, F). The combination of BDNF with lens injury protected 71% of the total number of RGCs (1542 ± 109 RGCs/ mm^2) compared to independent administration of BDNF or lens injury, which promoted only $\sim 44\%$ neuronal survival (ANOVA, ***: $p < 0.001$). These data indicate that BDNF and lens injury interact synergistically to enhance the survival of axotomized RGCs.

III.4.2.) Intravitreal injection of BDNF leads to regeneration failure following lens injury

To determine if increased neuronal survival correlated with greater axon regeneration, we used the optic nerve micro-crush model. In this paradigm, while all RGC axons are axotomized, there is formation of a focal glial scar that facilitates accurate identification of the injury site and quantification of axon growth (Sapieha et al., 2003). Importantly, we previously demonstrated that axotomy and micro-crush lesion produce an identical time-course of RGC death (Sapieha et al., 2003). The experimental protocol used for these experiments is outlined in Figure 2A.

As expected, lens injury alone stimulated robust RGC axon growth within the distal optic nerve at two weeks after nerve micro-crush (Fig. 2B), consistent with previous reports (Fischer et al., 2004a; Leon et al., 2000). Surprisingly, a single intravitreal injection of BDNF (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) provided at the time of lens injury completely blocked axon regeneration (Fig. 2C). Intraocular injection of BDNF by itself did not stimulate axon extension into the distal nerve (Fig. 2D), in agreement with other studies showing lack of regeneration in the presence of this neurotrophin (Isenmann et al., 2003; Yip and So, 2000). Quantitative analysis of the number of axons that extended past the lesion site confirmed that RGC axon growth was arrested by the combination of BDNF with lens injury (Fig 2D).

To establish if the effect of BDNF could be generalized to other growth factors, we examined the effect of intravitreal injection of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on lens injury-induced regeneration (Fig. 2E). In contrast to BDNF, CNTF did not cause a significant reduction of axon growth following lens injury ($n = 3$, Student's *t*-test, $p = 0.6$). Like BDNF, injection of CNTF alone did not promote axon regeneration within the optic nerve (Fig. 2E), which is consistent with a previous study showing lack of CNTF-induced regeneration within the optic nerve (Leon et al., 2000). We used the same source and concentration of recombinant human CNTF (rhCNTF, PreproTech, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) shown to effectively promote RGC survival in similar models of optic nerve injury (Ji et al., 2004; Mey and Thanos, 1993; Park et al., 2004; van Adel et al., 2005; van Adel et al., 2003; Weise et al., 2000; Zhang et al., 2005). Taken together, our data demonstrate that the effect

of BDNF on lens injury-induced regeneration appears to be specific and may not be generalized to other neurotrophic factors.

III.4.3.) BDNF does not alter the macrophage or Müller cell response induced by lens injury

To investigate the mechanisms by which BDNF may arrest lens injury-induced axon growth, we examined the effect of this neurotrophin on cellular responses associated with damage to the lens. For example, lens injury actively stimulates macrophage infiltration in the inner retina after optic nerve injury (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003). Furthermore, macrophage-derived proteins have been shown to enhance the regenerative effect of axon growth promoting factors (Li et al., 2003). We investigated the effect of BDNF on macrophage infiltration and activation following lens injury by immunohistochemistry using ED1, an antibody that selectively labels activated rat macrophages (Figs. 3A-F). Only a small number of ED1-positive cells were visualized in the ganglion cell layer at 3 and 6 days after optic nerve lesion and lens injury (Figs. 3A, 3B). In contrast, substantial infiltration of active macrophages was seen in the inner retina, including the fiber layer, ganglion cell layer and inner plexiform layer, at two weeks post-injury (Figs. 3C). In contrast, Leon et al. (2000) reported a relatively high number of macrophages at 7 days after injury. This discrepancy may be due to differences between animal strains: we used adult female Sprague-Dawley rats, whereas Leon et al. used adult male Fisher rats. It is also possible that the 1-day difference between our observations (6 days post-axotomy) and those of our colleagues (7 days post-axotomy) contribute to this discrepancy. Importantly, a single intravitreal injection of BDNF at the time of lesion did not affect macrophage infiltration or activation at 3, 6 or 14 days after lens injury (Figs 3D-F). We also examined the optic nerve, including the optic nerve head, for macrophage infiltration after nerve lesion (Fig. 4). At 3 and 14 days after lens injury, there was massive infiltration of activated macrophages, visualized by ED1 immunostaining, which accumulated around the site of nerve injury. At 14 days after lesion, ED-1-positive cells had also infiltrated the distal optic nerve (Fig. 4C, D). The combination of lens injury with a single injection of BDNF did not alter the distribution of macrophages in injured nerves.

Müller cells, the main glial type in the mammalian retina, play critical roles in the maintenance and function of retinal neurons. Lens injury has been shown to stimulate Müller cell activation after optic nerve injury (Leon et al., 2000), suggesting that Müller cells may participate in the regenerative process. To investigate the effect of BDNF on Müller cell activation following lens injury, we performed retinal immunostaining using an antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Fig. 3G-L). At 3 days after optic nerve and lens injuries, GFAP labeling was confined to resident astrocytes and Müller cell end-feet in the fiber layer (Fig. 3G). At 6 and 14 days post-injury, robust GFAP labeling was visualized in a large number of Müller cell radial processes spanning the retina (Figs. 3H, 3I). The Müller cell response to lens injury was not changed by exogenous BDNF (Figs. 3J-L). Taken together, these results indicate that BDNF does not alter macrophage or Müller cell activation elicited by optic nerve and lens injuries.

III.4.4.) Growth arrest correlates with hypertrophic axonal swellings in the optic nerve

To determine if the combination of BDNF with lens injury induced structural changes in RGC axons that may prevent their ability to regenerate, we used adeno-associated virus (AAV) serotype 2 carrying the green fluorescent protein (GFP) gene to visualize fine axon morphology in the optic nerve. We previously demonstrated that ~70% of adult RGCs can be effectively transduced with AAV serotype 2 (Cheng et al., 2002; Pernet et al., 2005). Here we show that AAV-mediated GFP is effectively transported, in anterograde fashion, by RGC axons and can be used to visualize fine axon morphology in retinal flat mounts (Fig. 5A) and in longitudinal sections of optic nerve (Fig. 5B). Using this approach, we examined the structure of RGC axon fibers in micro-crushed optic nerves after lens injury alone or combined with BDNF. Optic nerves from eyes that received only lens injury showed GFP-positive RGC axons that coursed along the dorsal-ventral plane of the nerve and had normal morphology (Fig. 6A), similar to that observed in non-treated, control nerves (Fig. 5B). In contrast, optic nerves from eyes that received combined lens injury and BDNF injection displayed axons with large, hypertrophic swellings (Fig. 6B). These structures, which reached up to 30 μm in diameter, were not confined to the terminal

stump of the transected axons but appeared anywhere along the axon's trajectory between the optic nerve head and the lesion site.

To further characterize axonal swellings within the optic nerve, we performed immunohistochemistry in longitudinal optic nerve sections using an anti-synaptophysin antibody. We chose synaptophysin, a synaptic vesicle protein (Sudhof and Jahn, 1991), as marker because it has been previously used successfully to visualize axon enlargements (Wang et al., 1995). Synaptophysin immunoreactivity was found primarily in axon stumps near the lesion site following lens injury alone (Fig. 6C), BDNF injection alone or in untreated, injured nerves (Supplementary Fig. 1). Combined treatment with lens injury and BDNF, however, led to robust synaptophysin staining in a large number of bulbous structures or swellings scattered throughout the proximal optic nerve (Fig. 6D). These dystrophic structures corresponded to axonal swellings as shown by superimposition of synaptophysin and GFP staining (Fig. 6F). As expected, all synaptophysin-positive structures were not co-labeled with GFP because AAV.GFP infected only a subpopulation of RGCs. Visualization of synaptophysin-positive swellings at higher magnification demonstrated that these structures were integral part of the axon shaft (Figs. 6G-I).

To establish if axonal swellings were also present within the retina, we examined intraretinal axons between the optic nerve head and RGC bodies. The morphology of intraretinal axons was visualized on flat-mounted retinas using two methods: neurotracing with AAV.GFP and immunostaining with an antibody against the 200-kDa-neurofilament subunit (RT-97), which is abundantly present in RGC axons (Mansour-Robaey et al., 1994). Our data demonstrate that the combination of BDNF and lens injury did not cause axonal swelling within the retina (Fig. 7A, B).

Light microscopy analysis of longitudinal sections from nerves treated with lens injury and BDNF showed that axonal swellings were invariably scattered throughout the entire proximal segment of the optic nerve (Fig. 8A, B). Electron microscopy analysis revealed that, in contrast to the normal ultrastructural organization in intact axons, axonal swellings in dystrophic nerves had massive accumulation of vesicular bodies in their axolemma (Fig 8C, D). Dystrophic axons conserved an apparently intact myelin sheath (Fig. 8C) that contained a very high density of vesicles (Fig. 8D). Taken together, our data

indicate that growth arrest with combined BDNF and lens injury correlates with the formation of hypertrophic axonal swellings and nerve dystrophy.

III.5.) DISCUSSION

Strategies aimed at repairing the mature, injured CNS must fulfill the fundamental requirements of promoting neuronal survival and axon regeneration. We used the adult rat retinocollicular system to test the effect of combined stimulation of RGC survival and axon growth by exogenous BDNF and lens injury, respectively. Our data convincingly show that combination of BDNF and lens injury had synergistic effects on cell survival: 71% of RGCs remained alive at two weeks after optic nerve injury, a time when ~90% of these neurons are lost irreversibly in the absence of treatment. The synergistic neuroprotection of BDNF and lens injury shown here confirmed that these two strategies use distinct pathways to stimulate RGC survival. The mechanisms involved in BDNF-induced neuroprotection are relatively well known. For example, BDNF has been shown to activate the extracellular signal-regulated kinases 1/2 (Erk1/2) and the phosphatidylinositol 3 kinase (Cheng et al., 2002; Klocker et al., 2000; Nakazawa et al., 2002). Furthermore, we recently demonstrated that activation of the Erk1/2 pathway by itself was sufficient to mediate robust RGC protection (Pernet et al., 2005). In contrast, the molecular mechanisms underlying lens injury-mediated survival or growth are not well understood. It has been proposed that macrophage-derived (Yin et al., 2003) and lens-derived (Lorber et al., 2002) factors may participate in increased neuronal survival and regeneration after lens injury. A comparison of gene expression profile of RGCs subjected to axotomy alone or axotomy plus lens injury revealed a list of candidate transcription and growth factors that may play a role in neuronal survival or regeneration induced by lens injury (Fischer et al., 2004b). Proteins such as SOCS-3, sphingosine kinase 1, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), which are selectively upregulated following lens injury, are likely to enhance cell viability (Edsall et al., 1997; La Fleur et al., 1996; Raghavendra Rao et al., 2002). Although the precise contribution of these molecules to RGC survival remains to be elucidated, it is possible that they interact synergistically with survival molecules downstream of BDNF, such as Erk1/2 (Pernet et al., 2005), to promote the robust neuronal survival produced by lens injury and exogenous BDNF.

We also report the unexpected finding that combination of BDNF and lens injury failed to enhance RGC axon regeneration. Our results show that BDNF did not alter the macrophage or glial cell response in the retina and in the optic nerve after lens injury, supporting the conclusion that these cells do not play a role in regenerative failure. The effect of BDNF on axon growth arrest appeared to be specific to this neurotrophin, as CNTF did not cause a significant reduction of lens injury-induced regeneration. CNTF has been previously shown to enhance RGC survival and axon regeneration within a peripheral nerve graft (Cui and Harvey, 2000), but uses signaling pathways different from those activated by BDNF (Park et al., 2004; Peterson et al., 2000). For example, while BDNF promotes RGC survival mainly via the Erk1/2 pathway (Cheng et al., 2002; Pernet et al., 2005), CNTF promotes RGC survival and regeneration via protein kinase A and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK/STAT3) (Ji et al., 2004; Park et al., 2004). Thus, it is possible that signaling components downstream of BDNF overcome those activated by lens injury leading to growth arrest. Another possibility is that BDNF sends a stop signal to RGC growth cones in the injured optic nerve. For example, BDNF has been shown to increase nitric oxide (NO) production in RGC axons *in vivo* (Klocker et al., 1999; Zhang et al., 2005). Moreover, combined exposure to NO and BDNF, but not either factor alone, has been shown to stabilize developing RGC growth cones inhibiting axon extension *in vitro* (Ernst et al., 2000; Gallo et al., 2002). Thus, rapid transport of BDNF and NO to RGC axon stumps (Caleo et al., 2000) may overly stabilize growth cones at the lesion site leading to regenerative failure following lens injury.

Importantly, we demonstrate that combination of BDNF and lens injury led to the formation of large, hypertrophic axonal swellings in the proximal injured optic nerve. Given that the structural integrity of the axon is an indispensable requisite for regeneration, it is also possible that axonal swellings caused by combined BDNF and lens injury hinder RGC axon growth. Using AAV vectors containing GFP, we demonstrate that axonal swellings were not exclusively located at the distal ends of the transected RGC axons, but they were found anywhere along the axon's trajectory between the optic nerve head and the lesion site. Swellings in dystrophic RGC axons were immunopositive for synaptophysin but also for other markers of synaptic vesicle proteins, such as vesicle glutamate transporter 2 (VGlut2) and synaptic vesicle 2 (SV2) (Supplementary Fig. 2), indicative of abnormal

accumulation of synaptic vesicles in certain domains along the axon. Interestingly, swellings were not found in intraretinal axons between the optic nerve head and RGC cell bodies, indicating that axonal dystrophy does not occur close to RGC bodies, but only in the myelinated segment of the axon within the optic nerve.

Electron microscopy analysis confirmed that swellings were filled with a large number of vesicular bodies, disorganized neurofilaments and degenerating organelles. Thus, it is likely that regeneration failure in this situation results from disruption of axonal transport. The occlusion of the axolemma by vesicular material hinders the normal transport of cytoskeletal proteins, such as tubulin and neurofilaments, which are required for axon extension. In the optic nerve, interruption of slow axonal transport after lesion is resumed during RGC axon regeneration into peripheral nerve grafts (McKerracher et al., 1990a; McKerracher et al., 1990b). Exogenous BDNF injected into the optic tectum of chick embryos greatly increased the density of vesicles in retinotectal synapses (Liu et al., 2003). This finding suggests that BDNF may contribute to axon occlusion by stimulating vesicle production in RGCs. Of interest, the formation of large axonal swellings in an experimental model of amyotrophic lateral sclerosis is caused by the selective impairment of slow axonal transport, while fast axonal transport is preserved (Griffin et al., 1978).

Axonal swellings are characteristic of axon pathology in many neurodegenerative diseases including multiple sclerosis (Trapp et al., 1998), amyotrophic lateral sclerosis (Delisle and Carpenter, 1984), Alzheimer's disease (Brendza et al., 2003), Parkinson's disease (Galvin et al., 1999), stroke (Dewar et al., 1999) and traumatic brain injury (Cheng and Povlishock, 1988). Importantly, significant swelling of RGC axons, filled with vesicles and mitochondria, has been observed in human glaucomatous optic nerves (Quigley, 1981) and in experimental models of glaucoma (Morrison et al., 1997), a disease caused by the selective death of RGCs. Although the origin of axonal swellings in CNS disease is poorly understood, a recent study suggests that common mechanisms may underlie the development of axonal swellings in seemingly disparate CNS disorders (Mi et al., 2005). Combined BDNF with lens injury may provide a useful model to address questions related to the origin of RGC axonal swellings in degenerative diseases of the optic nerve.

In summary, our data demonstrate that combined BDNF and lens injury promote robust survival of axotomized RGCs, but lead to marked optic nerve dystrophy. A better

understanding of the mechanisms that lead to axonal dystrophy appears to be essential to prevent degeneration and promote nerve repair.

III.6.) REFERENCES

- Ali RR, Reichel MB, De Alwis M, Kanuga N, Kinnon C, Levinsky RJ, et al. Adeno-associated virus gene transfer to mouse retina. *Hum. Gene Ther.* 1998; 9: 81-86.
- Bennet J, Duan D, Engelhardt JF, Maguire AM. Cross-species comparison of in vivo reporter gene expression after recombinant adeno-associated virus-mediated retinal transduction. *Met. Enzymol.* 2000; 316: 777-789.
- Bennett J, Duan D, Engelhardt JF, Maguire AM. Real-time, noninvasive in vivo assessment of adeno-associated virus-mediated retinal transduction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997; 38: 2857-2863.
- Bray GM, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Carter DA, Aguayo AJ. Neuronal and nonneuronal influences on retinal ganglion cell survival, axonal regrowth, and connectivity after axotomy. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 633: 214-28.
- Brendza RP, O'Brien C, Simmons K, McKeel DW, Bales KR, Paul SM, et al. PDAPP; YFP double transgenic mice: a tool to study amyloid-beta associated changes in axonal, dendritic, and synaptic structures. *J Comp Neurol* 2003; 456: 375-83.
- Caleo M, Menna E, Chierzi S, Cenni MC, Maffei L. Brain-derived neurotrophic factor is an anterograde survival factor in the rat visual system. *Curr Biol* 2000; 10: 1155-61.
- Chen H, Weber AJ. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 966-74.
- Cheng CL, Povlishock JT. The effect of traumatic brain injury on the visual system: a morphologic characterization of reactive axonal change. *J Neurotrauma* 1988; 5: 47-60.
- Cheng L, Sapieha P, Kittlerova P, Hauswirth WW, Di Polo A. TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J Neurosci* 2002; 22: 3977-86.
- Cui Q, Harvey AR. CNTF promotes the regrowth of retinal ganglion cell axons into murine peripheral nerve grafts. *Neuroreport* 2000; 11: 3999-4002.

- Delisle MB, Carpenter S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1984; 63: 241-50.
- Dewar D, Yam P, McCulloch J. Drug development for stroke: importance of protecting cerebral white matter. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 41-50.
- Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 3978-3983.
- Doster SK, Lozano AM, Aguayo AJ, Willard MB. Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury. *Neuron* 1991; 6: 635-47.
- Edsall LC, Pirianov GG, Spiegel S. Involvement of sphingosine 1-phosphate in nerve growth factor-mediated neuronal survival and differentiation. *J Neurosci* 1997; 17: 6952-60.
- Ernst AF, Gallo G, Letourneau PC, McLoon SC. Stabilization of growing retinal axons by the combined signaling of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 2000; 20: 1458-69.
- Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol.* 1996; 70: 3227-3234.
- Fischer D, He Z, Benowitz LI. Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci* 2004a; 24: 1646-51.
- Fischer D, Heiduschka P, Thanos S. Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats. *Exp Neurol* 2001; 172: 257-72.
- Fischer D, Pavlidis M, Thanos S. Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 3943-54.
- Fischer D, Petkova V, Thanos S, Benowitz LI. Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *J Neurosci* 2004b; 24: 8726-40.

- Gallo G, Ernst AF, McLoon SC, Letourneau PC. Transient PKA activity is required for initiation but not maintenance of BDNF-mediated protection from nitric oxide-induced growth-cone collapse. *J Neurosci* 2002; 22: 5016-23.
- Galvin JE, Uryu K, Lee VM, Trojanowski JQ. Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains alpha-, beta-, and gamma-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 13450-5.
- Griffin JW, Hoffman PN, Clark AW, Carroll PT, Price DL. Slow axonal transport of neurofilament proteins: impairment of beta,beta'-iminodipropionitrile administration. *Science* 1978; 202: 633-5.
- Guy J, Qi X, Muzyczka N, Hauswirth WW. Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve. *Arch. Ophthalmol.* 1999; 117: 929-937.
- Hauswirth WW, Lewin AS, Zolotukhin S, Muzyczka N. Production and purification of recombinant adeno-associated virus. *Met. Enzymol.* 2000; 316: 743-761.
- Isenmann S, Kretz A, Cellerino A. Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22: 483-543.
- Ji JZ, Elyaman W, Yip HK, Lee VW, Yick LW, Hugon J, et al. CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 265-72.
- Klocker N, Kermer P, Gleichmann M, Weller M, Bahr M. Both the neuronal and inducible isoforms contribute to upregulation of retinal nitric oxide synthase activity by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 1999; 19: 8517-27.
- Klocker N, Kermer P, Weishaupt JH, Labes M, Ankerhold R, Bahr M. Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B signaling. *J Neurosci* 2000; 20: 6962-7.
- La Fleur M, Underwood JL, Rappolee DA, Werb Z. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Exp Med* 1996; 184: 2311-26.

- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 2000; 20: 4615-26.
- Li Y, Irwin N, Yin Y, Lanser M, Benowitz LI. Axon regeneration in goldfish and rat retinal ganglion cells: differential responsiveness to carbohydrates and cAMP. *J Neurosci* 2003; 23: 7830-8.
- Liu L, Cavanaugh JE, Wang Y, Sakagami H, Mao Z, Xia Z. ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8532-7. Epub 2003 Jun 25.
- Lorber B, Berry M, Logan A, Tonge D. Effect of lens lesion on neurite outgrowth of retinal ganglion cells in vitro. *Mol Cell Neurosci* 2002; 21: 301-11.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 1632-1636.
- McKerracher L, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ. Slow transport rates of cytoskeletal proteins change during regeneration of axotomized retinal neurons in adult rats. *J Neurosci* 1990a; 10: 641-8.
- McKerracher L, Vidal-Sanz M, Essagian C, Aguayo AJ. Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J Neurosci* 1990b; 10: 2834-41.
- McLaughlin S, Collis P, Hermonat P, Muzyczka N. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* 1988; 62: 1963-1973.
- Mey J, Thanos S. Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res.* 1993; 602: 304-317.
- Mi W, Beirowski B, Gillingwater TH, Adalbert R, Wagner D, Grumme D, et al. The slow Wallerian degeneration gene, *WldS*, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice. *Brain* 2005; 128: 405-416.
- Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 1997; 64: 85-96.

- Nakazawa T, Tamai M, Mori N. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 3319-26.
- Park K, Luo JM, Hisheh S, Harvey AR, Cui Q. Cellular mechanisms associated with spontaneous and ciliary neurotrophic factor-cAMP-induced survival and axonal regeneration of adult retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2004; 24: 10806-15.
- Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M. 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* 1996; 37: 489-500.
- Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons in vivo. *J Neurochem* 2005; 93: 72-83.
- Peterson WM, Wang Q, Tzekova R, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia. *J Neurosci* 2000; 20: 4081-90.
- Quigley HA, Addicks, E. M., Green, W. R. & Maumenee, A. E. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch. Ophthalmol.* 1981; 99: 635-649.
- Raghavendra Rao VL, Bowen KK, Dhodda VK, Song G, Franklin JL, Gavva NR, et al. Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2002; 83: 1072-86.
- Raibon E, Sauve Y, Carter DA, Gaillard F. Microglial changes accompanying the promotion of retinal ganglion cell axonal regeneration into peripheral nerve grafts. *J Neurocytol* 2002; 31: 57-71.
- Sapieha PS, Peltier M, Rendahl KG, Manning WC, Di Polo A. Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24: 656-72.
- Sudhof TC, Jahn R. Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 1991; 6: 665-77.

- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-85.
- van Adel BA, Arnold JM, Phipps J, Doering LC, Ball AK. Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from axotomy-induced apoptosis via modulation of retinal glia in vivo. *J Neurobiol* 2005; 63: 215-34.
- van Adel BA, Kostic C, Deglon N, Ball AK, Arsenijevic Y. Delivery of ciliary neurotrophic factor via lentiviral-mediated transfer protects axotomized retinal ganglion cells for an extended period of time. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 103-15.
- Wang T, Xie K, Lu B. Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. *J Neurosci* 1995; 15: 4796-805.
- Weise J, Isenmann S, Klocker N, Kugler S, Hirsch S, Gravel C, et al. Adenovirus-mediated expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) rescues axotomized rat retinal ganglion cells but does not support axonal regeneration in vivo. *Neurobiol Dis* 2000; 7: 212-23.
- Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, et al. Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 2003; 23: 2284-93.
- Yip HK, So KF. Axonal regeneration of retinal ganglion cells: effect of trophic factors. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19: 559-75.
- Zhang CW, Lu Q, You SW, Zhi Y, Yip HK, Wu W, et al. 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* 2005; 46: 1497-503.
- Zolotukhin S, Potter M, Hauswirth WW, Guy J, Muzyczka N. A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol*. 1996; 70: 4646-4654.

Figure 1. BDNF and lens injury have synergistic effects on RGC survival.

(A) Outline of the experimental protocol used to test the effect of combined BDNF and lens injury (LI) on RGC survival. RGCs were labeled with FluoroGold one week prior to optic nerve transection. BDNF injection and/or lens injury were performed immediately after axotomy, and the density of surviving neurons was evaluated at two weeks post-lesion as shown. (B-E) Representative images of flat-mounted retinas showing FluoroGold-labeled RGCs following intravitreal administration of BDNF protein (B), LI (C), combined BDNF and LI (D), or no treatment (E) at two weeks after axotomy. Microglia that may have incorporated FluoroGold after phagocytosis of dying RGCs were distinguished by their morphology and excluded from our quantitative analyses. Scale bar: 100 μ m. (F) Quantitative analysis of RGC survival following intravitreal injection of BDNF recombinant protein (hatched bars), LI (gray bars) or combined BDNF and LI (solid bars) at 2 weeks after axotomy (n= 4-15 rats per group). The densities of RGCs in intact, untreated retinas (open bar) and axotomized, untreated retinas (stippled bar) are shown as reference. The synergistic effect of BDNF and LI on RGC survival was significantly larger than independent administration of BDNF or LI (ANOVA, ***: $p < 0.001$).

Figure 2. Intravitreal injection of BDNF, but not CNTF, strongly decreases the number of regenerating axons induced by lens injury.

(A) Outline of the experimental protocol used to examine the effect of combined BDNF and lens injury (LI) on RGC axon regeneration. Micro-crush lesion (MC) of the optic nerve was immediately followed by intraocular (IO) injection of BDNF and/or LI. Thirteen days after injury, RGC axons were anterogradely labeled by IO injection of the anterograde tracer cholera toxin β subunit (CT β) and 24 hrs later (2 weeks post-lesion), animals were sacrificed and the optic nerves processed for analysis of axon growth. Representative optic nerve sections stained with an antibody against CT β demonstrate that lens injury stimulated robust regrowth of injured RGC axons past the lesion site (indicated with asterisks) (B), while very few fibers crossed into the distal nerve with combined LI and intravitreal injection of BDNF (C). (D) Quantitative analysis of RGC axon growth demonstrated that intravitreal injection of BDNF combined with lens injury (LI) (solid bars, $n = 6$) strongly reduced axon regeneration stimulated by LI alone (gray bars, $n = 5$) to a level similar to that seen with BDNF alone (hatched bars, $n = 6$) at 250 μm , 500 μm and 1000 μm past the lesion site (ANOVA, **: $p < 0.01$). (E) In contrast to BDNF, intravitreal injection of CNTF ($n = 3$) did not cause a significant reduction of LI-induced regeneration at 250 μm past the lesion site (Student's *t-test*, $p = 0.6$). Similar to BDNF, administration of CNTF did not promote axon regeneration ($n = 4$). Scale bars: 250 μm .

Figure 3. BDNF does not alter the macrophage or Müller cell response induced by lens injury.

(A-F) The effect of BDNF and/or lens injury (LI) on macrophage infiltration and activation after optic nerve lesion was investigated by ED1 immunohistochemistry on retinal sections. (A) Few active macrophages were found within the retina at 3 days after lens and optic nerve injury. (B and C) Macrophage infiltration in the retina, particularly in the ganglion cell layer (GCL), markedly increased between 6 and 14 days after LI. (D-F) A single intraocular injection of BDNF at the time of LI did not change the number of infiltrating macrophages at 3, 6 or 14 days after optic nerve lesion. (G-L) The response of Müller glial cells to LI was examined using an anti-GFAP antibody. GFAP staining in Müller cells was low at 3 days post-LI (G), but increased dramatically at 6 (H) and 14 (I) days after LI. The pattern of robust GFAP staining in Müller cells at 6 and 14 days after LI did not change with exogenous BDNF administration (J-L). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; FL: fibre layer. Scale bar: A and B= 100 μ m.

Figure 4. BDNF does not alter macrophage activation and infiltration in the optic nerve.

Activated macrophages were visualized using the antibody ED1 in optic nerve sections at 3 days (A, B) and 14 days (C, D) after optic nerve lesion. Following lens and optic nerve injury, ED1-positive cells massively invaded the area around the lesion site (arrows). A single intraocular injection of BDNF did not change activation and infiltration of macrophages at 3 or 14 days after optic nerve lesion. Scale bars: A-D =500 μ m.

Figure 5. Visualization of RGC axon morphology in the retina and optic nerve by green fluorescent protein (GFP) gene transfer.

The time required for AAV-mediated transgene expression to reach a plateau in the adult rat retina is ~3-4 weeks. Thus, AAV.GFP was injected into the vitreous chamber and subsequent surgical procedures were performed 3 weeks after virus administration. GFP labeling was directly examined on retinal flat-mounts or optic nerve sections at 2 weeks after optic nerve injury, the equivalent of 5 weeks following virus injection. GFP-positive RGC axons were clearly seen converging at the optic disk in whole-mounted retinas (A) and along fascicles in optic nerve longitudinal sections (B). Scale bars: A-B=200 μm .

Figure 6. Growth arrest correlates with hypertrophic axonal swellings in the optic nerve.

Optic nerves from eyes that received only lens injury showed GFP-positive RGC axons that coursed along the dorsal-ventral plane of the nerve and had normal morphology (A), while optic nerves from eyes that received combined lens injury and BDNF injection displayed axons with large, hypertrophic swellings (B). Following lens injury alone, synaptophysin immunoreactivity was found primarily in axon stumps near the lesion site (C), while combined lens injury and BDNF led to robust synaptophysin staining in a large number of swellings in the proximal optic nerve (D). The superimposition of synaptophysin and GFP staining (arrows, E and F) confirmed that these structures corresponded to axonal swellings. Lesion site is shown with asterisk. Higher magnification images of synaptophysin-positive swellings clearly show that these structures are an integral part of the axon shaft (G-I). Scale bars: A-F= 100 μ m; G-I= 25 μ m.

Figure 7. Hypertrophic swellings are not present in intraretinal axons.

The morphology of intraretinal axons, near RGC bodies, was visualized on flat-mounted retinas using two methods: neurotracing with AAV.GFP (A) and immunostaining with an antibody against the 200-kDa-neurofilament subunit (RT-97), which is abundantly present in RGC axons (B). Our data show that the combination of BDNF and lens injury did not produce axonal swellings within the retina. Scale bars: A and B= 100 μ m.

Figure 8. Structural analysis of RGC axonal swellings induced by combined BDNF and lens injury.

Light microscopy analysis of longitudinal sections from intact nerves (A) or after treatment with BDNF and lens injury (LI) (B). Axonal swellings caused by BDNF plus LI were found distributed throughout the entire proximal segment of the optic nerve. Electron microscopy analysis revealed that, in contrast to the normal ultrastructural organization in intact axons, swellings in dystrophic optic nerves had massive accumulation of vesicular bodies in their axolemma (C, D). Dystrophic axons conserved an apparently intact myelin sheath (C) that contained a very high density of vesicles (D). Scale bars: A, B = 25 μm ; C = 5 μm ; D = 2.5 μm .

Supplementary Figure 1. Synaptophysin staining in injured, control optic nerves.

Endogenous levels of synaptophysin in untreated (A) or BDNF-injected (B) injured optic nerves are low at two weeks after lesion, and similar to those observed after lens injury (LI) alone (Fig. 7C) Large synaptophysin-positive axonal swellings present in the BDNF plus LI group are not apparent in untreated or BDNF only control groups. Scale bars: 100 μ m.

Supplementary Figure 2. Axonal swellings induced by combined BDNF and lens injury are positive for other synaptic vesicle markers.

Antibodies against the synaptic vesicle markers 2 (SV2) and the vesicle glutamate transporter 2 (VGluT2) were used on optic nerve longitudinal sections from eyes treated with combined BDNF and lens injury (LI). Following lens injury alone, SV2 (A) or VGluT2 (C) immunoreactivity was found primarily in axon stumps near the lesion site. In contrast, SV2 or VGluT2-positive swellings appeared scattered in injured optic nerves following BDNF and lens injury (B and D). Lesion site is shown with arrows. Scale bars: A-D= 200 μ m.

III.7.) FIGURES

FIGURE 1

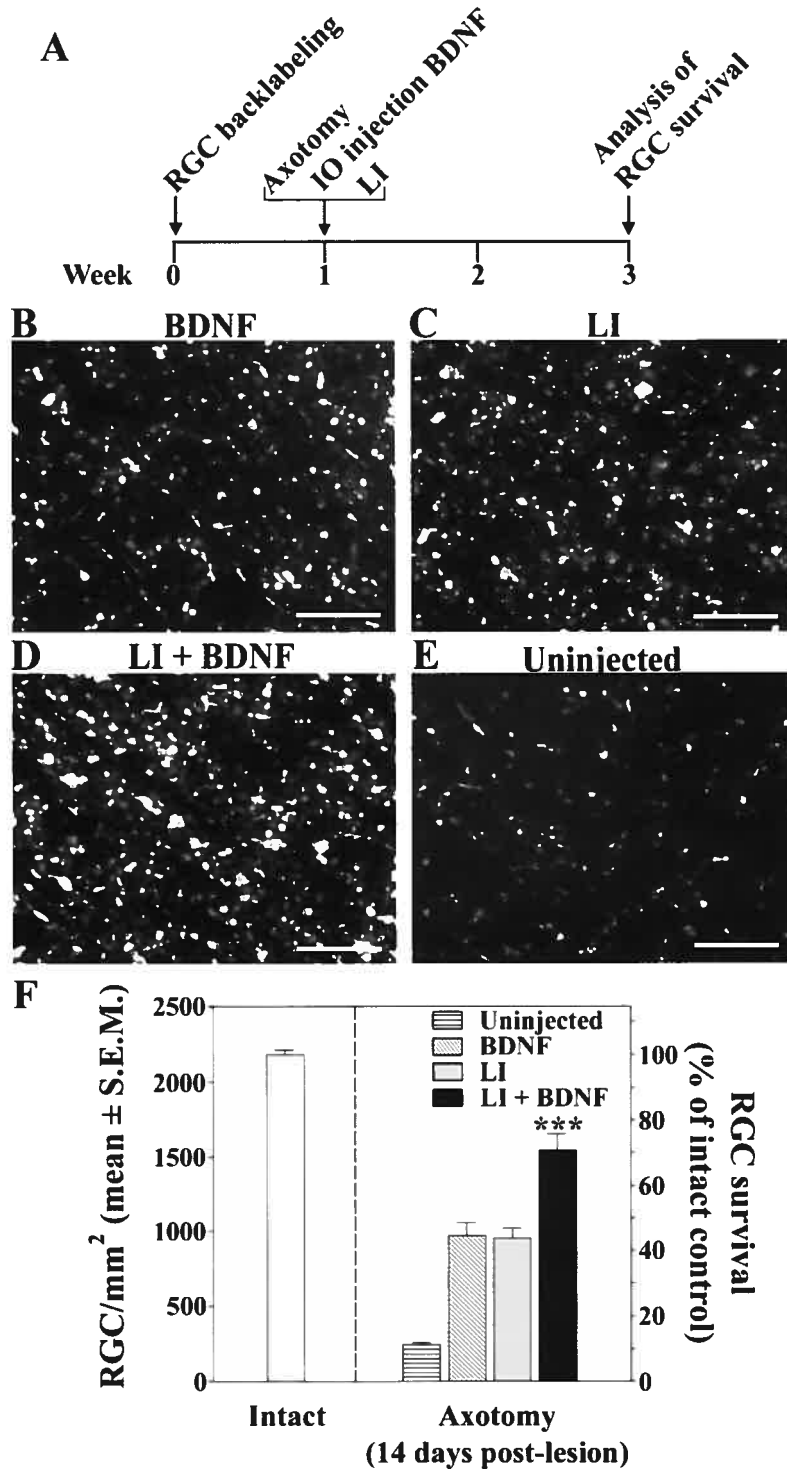


FIGURE 2

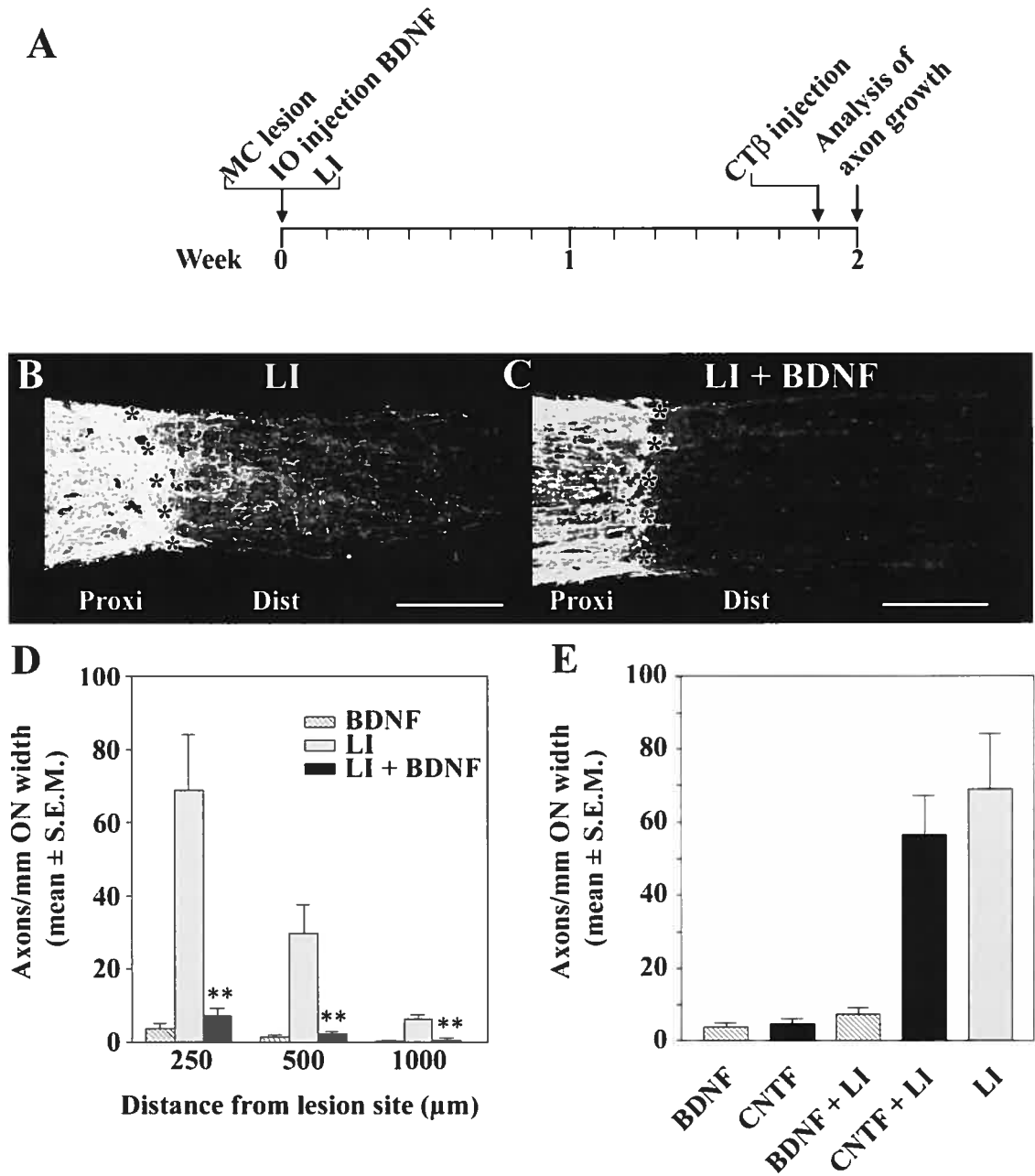


FIGURE 3

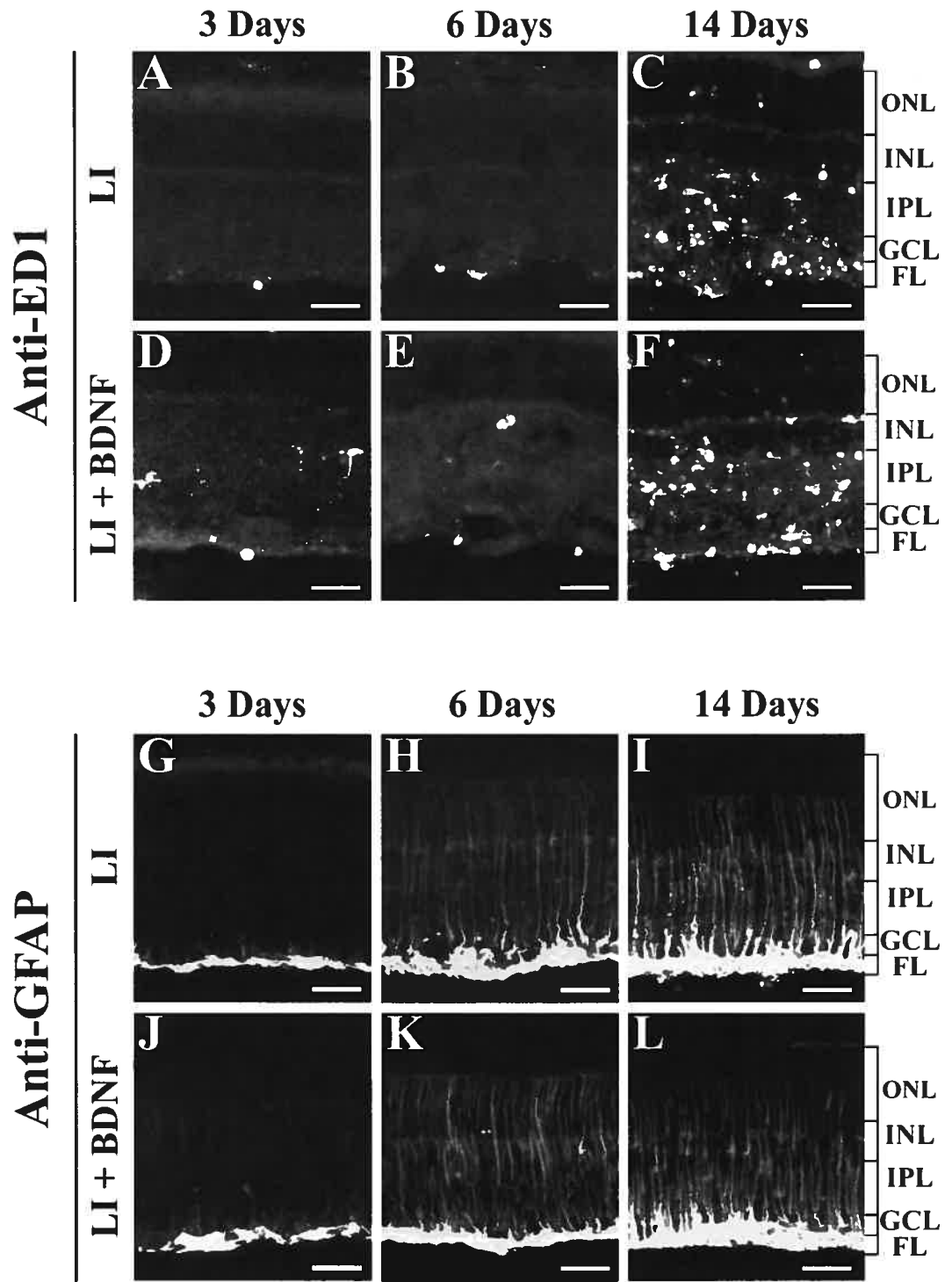


FIGURE 4

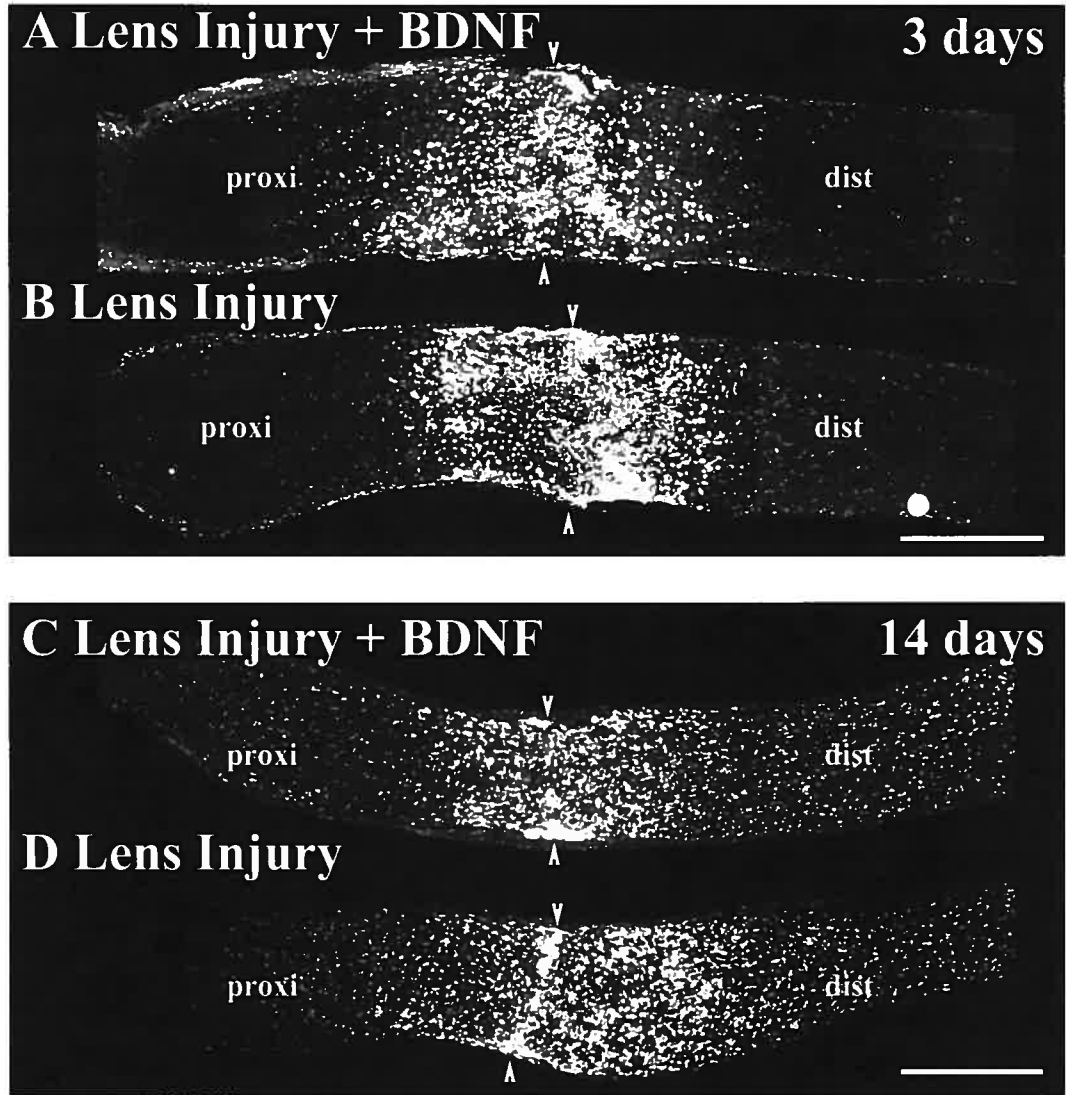
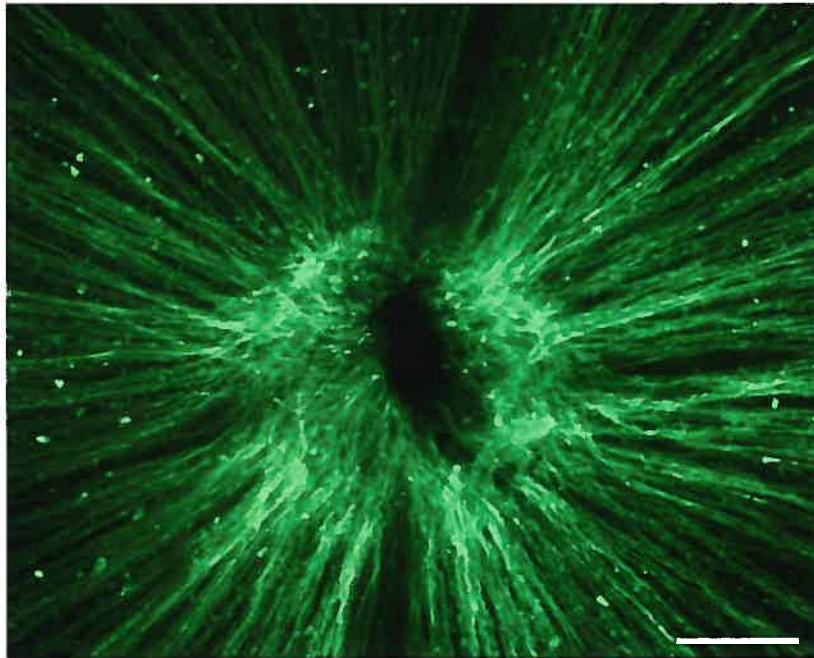


FIGURE 5

A Retinal Flat Mount



B Optic Nerve Section

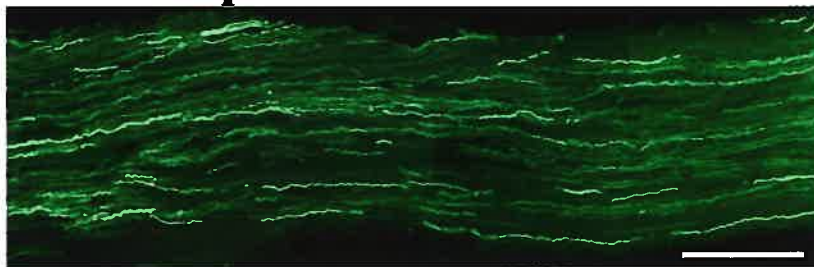


FIGURE 6

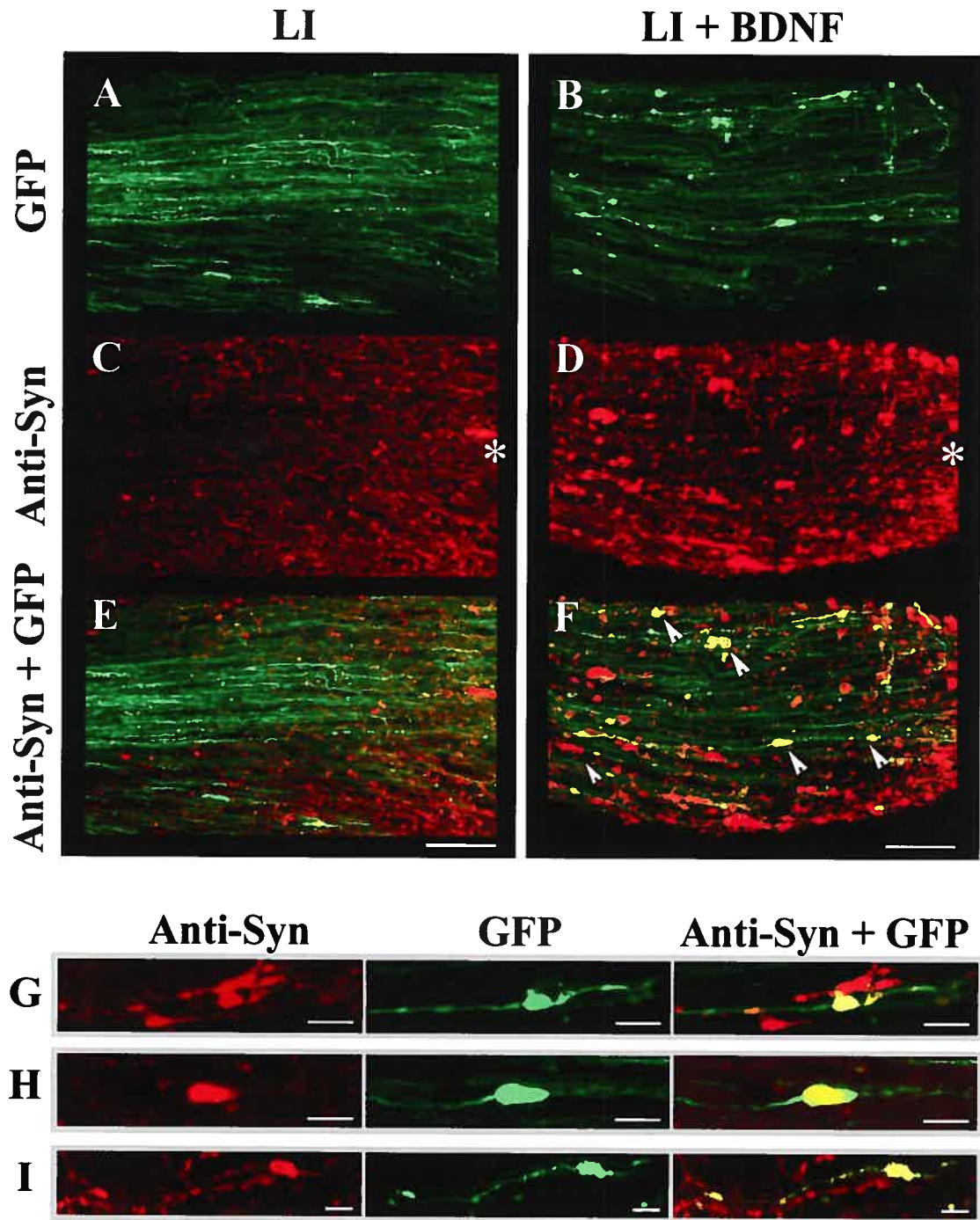


FIGURE 7

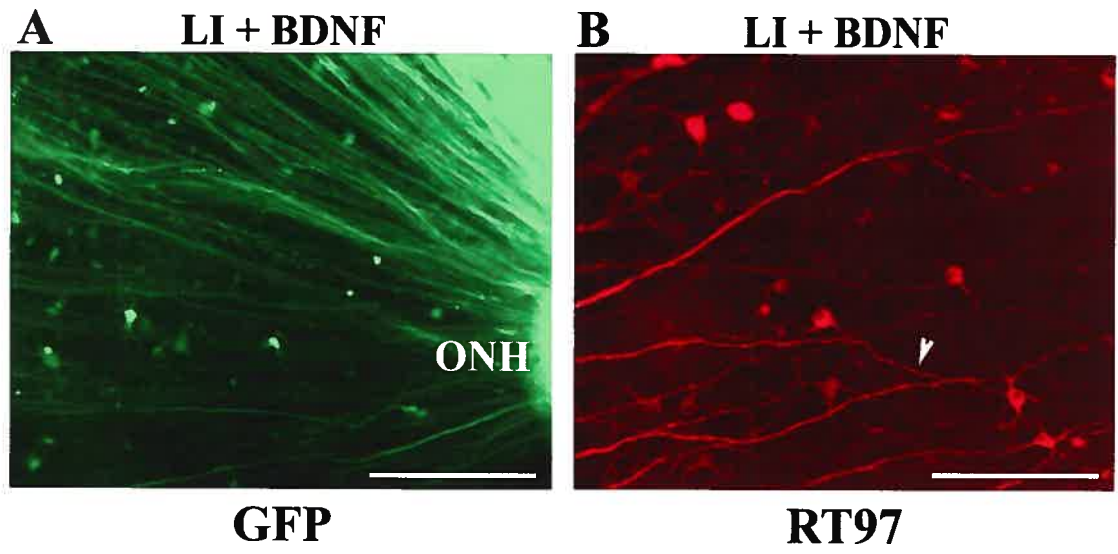
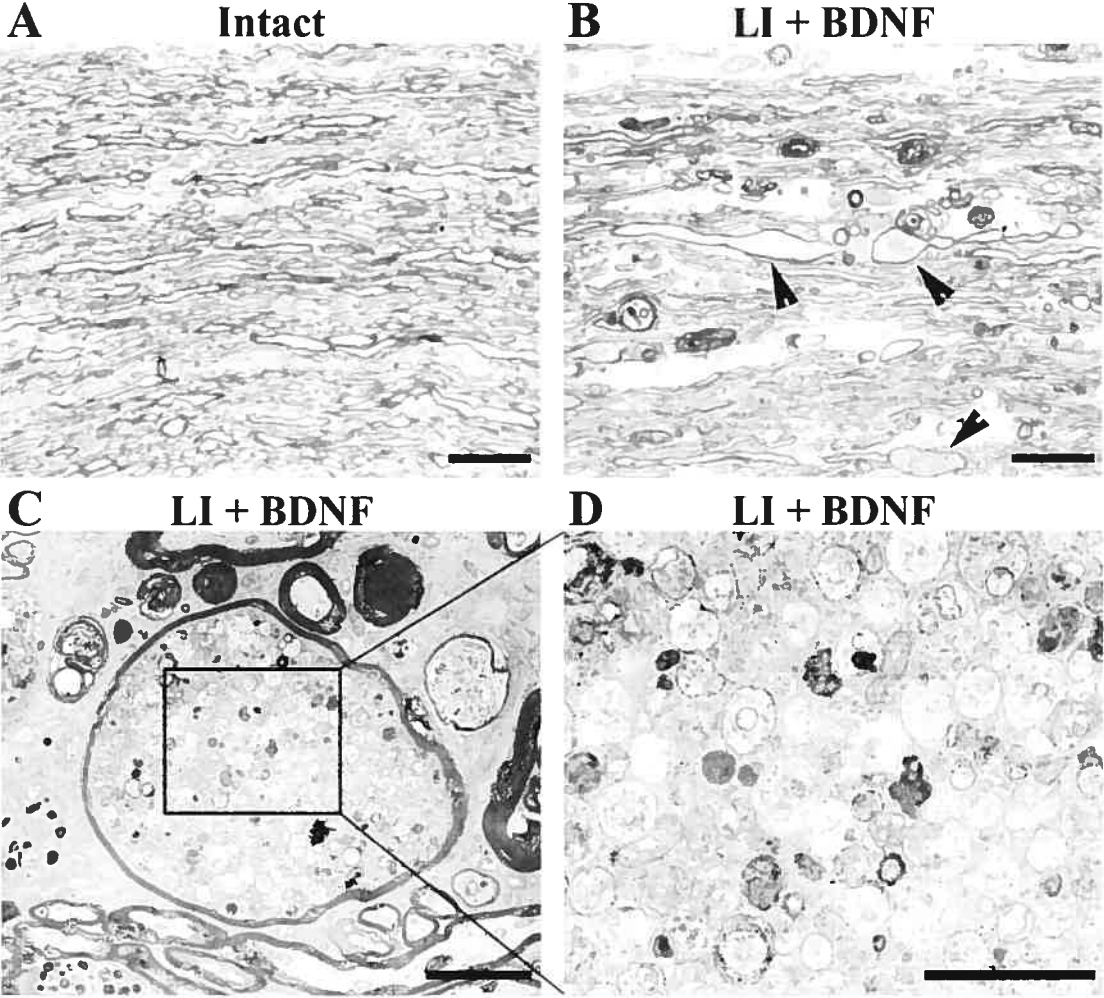
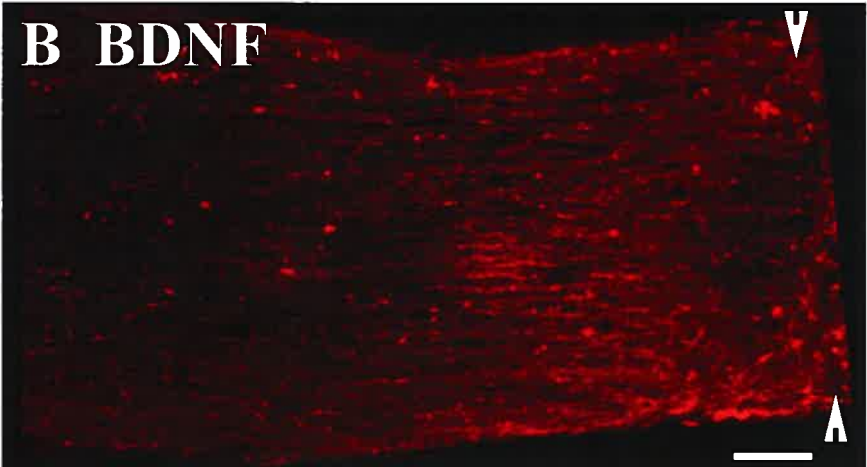
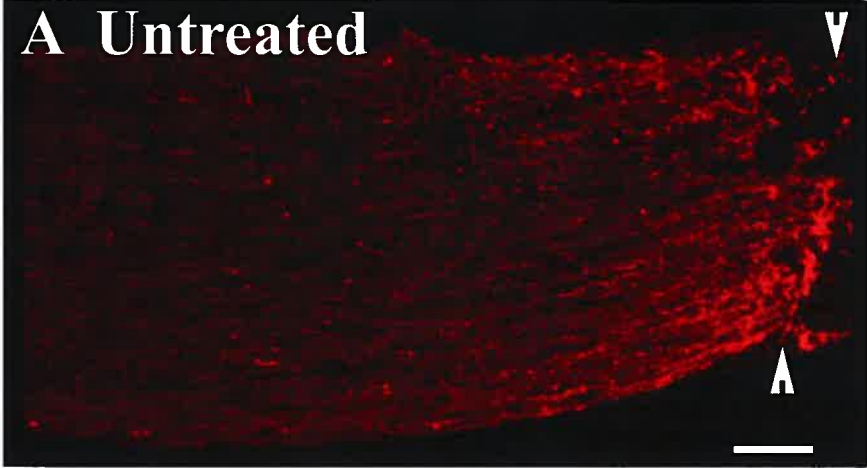


FIGURE 8

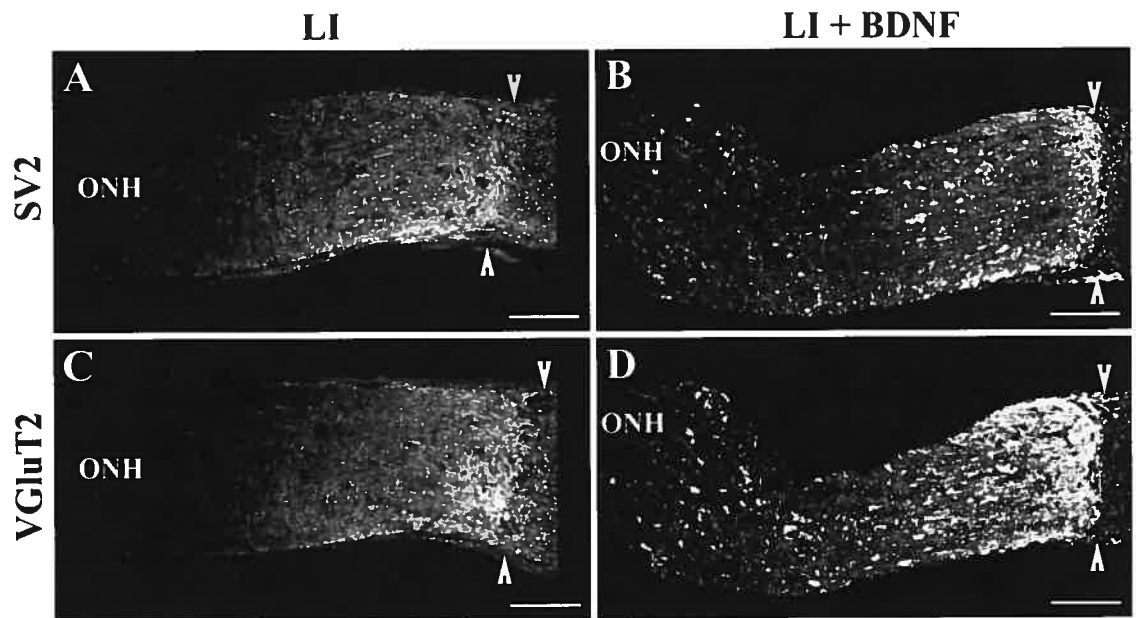


SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Anti-Syn



SUPPLEMENTARY FIGURE 2



CHAPITRE 4

IV. TROISIÈME ARTICLE: “POLYAMINES REGULATE NMDA-INDUCED RETINAL GANGLION CELL DEATH *IN VIVO*.”

En préparation.

**POLYAMINES REGULATE NMDA-INDUCED RETINAL
GANGLION CELL DEATH *IN VIVO*.**

Vincent Pernet, Philippe Bourgeois and Adriana Di Polo.

Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, 2900 Boulevard
Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec, Canada H3T 1J4.

Abbreviated Title: Polyamines regulate excitotoxic death of retinal neurons.

Corresponding Author: **Adriana Di Polo, Ph.D.**
Department of Pathology and Cell Biology
Université de Montréal
2900, Boul. Edouard-Montpetit
Pavillon Principal, Room N-535
Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada
Phone: (514) 343-6109
Fax: (514) 343-5755

E-mail: [REDACTED]

Number of Figures: 7; Number of Tables: 0

Number of text pages: 33.

Key words: polyamines, retina, NMDA, neuroprotection, excitotoxic injury, retinal ganglion cells.

Acknowledgements: This work was supported by grants to A.D.P. from the Canadian Institutes of Health Research.

IV.1.) Abstract

N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor blockers can promote neuroprotection after brain injury or ischemia. Polyamines such as spermine and putrescine appear to be natural co-activators of NMDA receptor (NMDAR) but their role in NMDA-mediated excitotoxic cell death remains ill known in adult neurons. In addition, polyamine synthesis has been recently shown to be regulated by BDNF-mediated arginase I expression in neurons. However, it is not clear whether the BDNF/arginase I/polyamines cascade can regulate excitotoxic neuronal death *in vivo*. In this study, we examined: 1) if polyamines are endogenously expressed in the adult retina and can be modulated by BDNF or NMDA stimulation, and 2) the role of BDNF and polyamines in NMDA-induced neuronal excitotoxicity *in vivo*. Here, we show that arginase I, the rate-limiting enzyme for polyamine synthesis, is abundantly expressed by retinal ganglion cells (RGCs) indicating that polyamines are endogenously produced in the adult, intact retina. We found that BDNF stimulation did not influence arginase I expression in the adult retina contrary to what has been previously reported in immature neurones *in vitro*. In addition, BDNF injection did not change RGC survival after NMDA injection. However, arginase I increased in Müller glial cells after the NMDA injection, suggesting that polyamines may be secreted by glial cells during excitotoxicity and thus exert paracrine effects on RGCs. Importantly, our data demonstrate that spermine or putrescine polyamine co-administration exacerbated NMDA toxicity, while intravitreal injection of di-fluoro-methyl-ornithine (DFMO), a polyamine synthesis blocker, markedly increased RGC survival. The blockade of polyamine binding to NMDAR with the pharmacological antagonist ifenprodil was less protective against NMDA-induced excitotoxicity than inhibition of polyamine synthesis with DFMO. This suggests that polyamines exacerbate excitotoxicity by other molecular mechanisms. In summary, our study suggests that, in contrast to BDNF, DFMO could be used as a neuroprotectant for adult RGCs in degenerative processes involving NMDA excitotoxicity.

IV.2.) Introduction

Glutamate excitotoxicity is thought to mediate neuronal death after brain stroke, cerebral ischemia or nerve lesion (Lipton and Rosenberg, 1994). Among ionotropic channels, the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor plays a particularly important role in the process of glutamate toxicity. Activation of NMDA receptors (NMDAR) via its selective agonist, NMDA, induces marked neuronal cell death in the retina (Lipton, 2003). NMDAR is composed of several regulatory domains that modulate channel opening in the presence of NMDA or glutamate agonists. Excitotoxic damage mediated by NMDAR can be completely blocked by NMDA antagonists such as MK-801 (Kashii et al., 1994; Kikuchi et al., 1995). However, in normal physiological conditions NMDAR plays an important role in the neuronal transmission between healthy neurons. Full blockade of NMDAR with non-competitive antagonists has been proposed to elicit various neurological problems and is therefore not suitable for clinical applications (Krystal et al., 1994; Jentsch and Roth, 1999; Tsukada et al., 2005). Thus, there is a medical need for therapeutic treatments that maintain the normal activity of NMDAR in neurons and, at the same time, prevent NMDAR overstimulation that cause excitotoxic damage. This point of equilibrium may be achieved by using partial or moderate blockers of the NMDAR.

Polyamines are arginine-derived regulators of NMDAR. The amino acid arginine is transformed by the rate-limiting enzyme arginase I into ornithine and urea (Fig. 1). In turn, ornithine decarboxylase changes ornithine into putrescine which is the substrate for the other polyamines spermidine and spermine. Polyamines have been implicated in cerebral damage. For example, after trauma or ischemia, polyamine synthesis is highly upregulated in the brain (Paschen et al., 1988; Shohami et al., 1992). Several studies suggested that polyamine synthesis blocker such as di-fluoro-methyl-ornithine (DFMO) decreased cerebral damage induced by NMDA injection (Markwell et al., 1990; Porcella et al., 1991). At the molecular scale, polyamines possess specific binding sites on NMDAR, conferring them a direct regulatory role on NMDA receptor activation (Williams, 1997). However, previous studies did not exactly evaluate the extent of neuroprotection provided by polyamine blockers in the CNS (Markwell et al., 1990; Kish et al., 1991; Porcella et al., 1991). Moreover, the importance of the polyamine binding site on NMDAR in the mechanisms of NMDA-induced neuronal death is not clear *in vivo*.

It has been previously reported that BDNF controls polyamine synthesis in CNS neurons by upregulating arginase I expression (Cai et al., 1999; Gao et al., 2003). In these studies, BDNF stimulated neurite outgrowth by the cAMP/CREB/Arginase I/polyamine pathway in immature neurons *in vitro*. However, this pathway has not been investigated in adult neurons *in vivo* and its involvement in neuronal survival has not been tested yet. In addition, BDNF is a powerful survival factor for axotomised RGCs (Mansour-Robaey et al., 1994; Cheng et al., 2002) but little is known on its potential to protect neurons against excitotoxic insult.

In the present study, we investigated the role of BDNF and polyamines on NMDA-induced excitotoxicity of adult retinal ganglion cells (RGCs) *in vivo*. RGCs are sensitive to glutamate/NMDA excitotoxicity and can be easily stimulated by intravitreal injection of NMDA (Siliprandi et al., 1992; Kikuchi et al., 2000). This model of excitotoxicity is relevant to investigate cell death mechanisms involving NMDA receptor activation in the CNS. In addition, during development, previous studies suggested that polyamine synthesis blockers may be neuroprotective against NMDA toxicity in the retina (Trout et al., 1993; Ientile et al., 1999). Adult retinal cells also produce polyamine molecules, albeit at lower levels (Withrow et al., 2002).

In this study, we tested the hypothesis that BDNF and polyamines may regulate NMDA-induced neuronal cell death *in vivo*. We found that BDNF did not modify arginase I expression in the adult retina and had no effect on RGC survival after NMDA excitotoxic stimulation. In contrast, co-injection of polyamines, putrescine or spermine, along with NMDA increased cell death by ~29% and ~20% respectively, while decreasing endogenous polyamines with the polyamine synthesis blocker, DFMO, increased RGC survival by ~105%. Our data revealed that polyamines are important modulators of excitotoxic cell death in the retina. Our results indicate that polyamines participate in the pathological events associated with NMDAR activation in the CNS.

IV.3.) Experimental Methods

IV.3.1.) Surgical procedures

Animal procedures were in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals (<http://www.ccac.ca/>). All surgeries

were performed in adult female Sprague-Dawley rats (180-200 g) under general anaesthesia (2% Isoflurane, 0.8 liter/min).

RGCs were labeled by application of the retrograde tracer FluoroGold (2%, Fluorochrome, Englewood, CO) onto both superior colliculi as described by us (Cheng et al., 2002; Sapielha et al., 2003a; Pernet et al., 2005). One week later, the time required to label all RGCs, animals received a single intraocular injection of NMDA, polyamines or inhibitors as described below. Five μ l of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA, 5 mM, Sigma, Oakville, ON, Canada) or phosphate buffered-saline (PBS) were injected into the vitreous chamber of the left eye using a 10- μ l Hamilton syringe adapted with a 32-gauge needle. The needle tip was inserted into the superior hemisphere of the eye at a 45° angle through the sclera into the vitreous body. This route of injection avoided injury to eye structures, such as the lens and the iris, which release factors that induce regeneration and survival of RGCs (Mansour-Robaey et al., 1994; Leon et al., 2000). The injection was performed within 1 min and the needle was kept in place for an additional period of ~2 min, after which it was gently removed. Surgical glue (Indermill, Tyco Health Care, Mansfield, MA, USA) was used to seal the site of injection. Fundus examination was performed to check the integrity of the retinal circulation after surgery and animals showing signs of compromised blood supply were excluded from the study.

The effect of BDNF on RGC survival was tested by injecting intraocularly this neurotrophin (5 μ g) 24 hrs before NMDA injection (n=8). Control animals received saline 24 hrs prior to NMDA administration (n=3). In some animals, the polyamines putrescine (10 mM, Sigma, Oakville, ON, Canada) or spermine (0.1 mM, Calbiochem) were co-injected alone (n=3) or in combination with NMDA (putrescine, n=5; spermine, n=3). At this concentration, putrescine was previously shown to co-activate Ca^{2+} influx in embryonic retinal cell *in vitro* in presence of NMDA and was not toxic by itself (Trout et al., 1993). In addition, spermine was used at a much lower concentration than putrescine because of its higher affinity for extracellular polyamine binding site on NMDAR, and for other ionic channels (Williams, 1997; Sharif et al., 1999). In some experiments, injection of Di-Fluoro-Methyl-Ornithine (DFMO, 10 mM, n=6; 100 mM, n=6; Sigma, Oakville, ON, Canada) was performed 24 hrs before NMDA treatment to inhibit the polyamine synthesis enzyme ornithine decarboxylase. At these doses, DFMO was previously shown to efficiently inhibit

ornithine decarboxylase *in vitro* and was not toxic for neurons (Markwell et al., 1990; Trout et al., 1993; Ientile et al., 1999; Withrow, et al., 2002). Polyamine binding sites on the NMDAR were blocked with ifenprodil (2 mM, n=4; Sigma, Oakville, ON, Canada) or NMDAR was blocked with the non-competitive antagonist MK-801 (1 mM, n=3; Sigma, Oakville, ON, Canada) administered at the same time as NMDA. Contralateral eyes or unoperated eyes served as intact controls (n=15).

IV.3.2.) Quantification of neuronal survival

Three hrs to 7 days after NMDA injection, rats were euthanized and perfused intracardially with 4% paraformaldehyde. The left, injured retinas and the right, intact (control) retinas were removed, fixed for an additional 30 min and flat-mounted vitreal side up on a glass slide for examination of the ganglion cell layer. RGCs backfilled with FluoroGold were counted in 12 standard retinal areas as previously described by us (Cheng et al., 2002; Sapielha et al., 2003b). Data analysis and statistics were performed using the GraphPad InStat software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) by a one-way analysis of variance (ANOVA) test.

IV.3.3.) Retina immunohistochemistry

Animals were perfused with 4% paraformaldehyde and the eyes were rapidly dissected out. The cornea and the lens were removed, and the eye cup was incubated in the same fixative for 2 hrs at 4°C. Tissue was incubated in 30% sucrose overnight, and then frozen in optimal cutting temperature (O.C.T.) compound (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN). Retinal cryosections (16 µm) were collected onto gelatin-coated slides and then pre-incubated in 5% BSA, 3% normal serum, 0.2% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 30 min at room temperature to block nonspecific binding. Primary antibody incubation was performed in 5% BSA, 3% normal serum, 0.3% Triton X-100 in PBS overnight at 4°C. Retinal sections were then incubated with the appropriate secondary antibody for 1 hr at room temperature, and mounted with an anti-fade reagent (SlowFade, Molecular Probes, Eugene, OR). Primary antibodies were: monoclonal anti-arginase I antibody (0.25 µg/ml, BD Biosciences) and anti-cellular retinaldehyde-binding protein (anti-CRALBP, 1/1000, gift from Dr J. C. Saari, University of Washington, Seattle, WA). Fluorescent staining was

examined using a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada, Kirkland, QC) and pictures were captured with a CCD video camera (Retiga, Qimaging, Burnaby, British Columbia) and analysed with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON).

IV.3.4.) Western blot analysis

Retinas were quickly extracted and homogenized with an electric pestle (Kontes, Vineland, NJ) in lysis buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 135 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS and 10% glycerol supplemented with protease inhibitors) at 4 °C. Retinal lysates were incubated for 30 min on ice prior to centrifugation at 18,000 X g for 5 min and the supernatant was collected. The protein concentration of retinal extracts was determined by the Lowry method (Bio-Rad Life Science, Mississauga, Ontario, Canada). Samples (100 µg of protein) were separated by electrophoresis on 10% SDS polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Life Science, Mississauga, Ontario, Canada). Protein samples (1µg) from liver homogenate was used as positive control for detection of arginase I. Non-specific binding was blocked by incubation of blots in 10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20 (TBST), and 5% lyophilized skim milk for 1h at room temperature. Monoclonal arginase I antibody (0.25 µg/ml, BD Biosciences) was added to blots, followed by incubation with anti-mouse peroxidase-linked secondary antibody (0.5 µg/ml, Amersham Pharmacia, Baie d'Urfé, QC). Protein signals were detected using a chemiluminescence reagent (ECL, Amersham Biosciences) followed by exposure of blots to X-OMAT (Kodak) imaging films.

IV.4.) Results

IV.4.1.) NMDA promotes rapid RGC loss *in vivo*.

We first established the time-course of RGC cell death after excitotoxic stimulation with NMDA *in vivo*. For this purpose, RGCs were backlabeled with FluoroGold (FG), and 5 mM of NMDA was injected into the vitreous chamber, quantification of surviving RGCs was performed on whole-mounted retinas. RGC cell death began 6 hrs after NMDA injection and markedly increased at 12 hrs post-injection. Most RGCs were lost by 3 days post-injection and only 22% of RGCs remained alive at this time point (Fig. 2). Cell death

did not increase significantly between 3 days (22% RGCs) and 7 days (19% RGCs) post-injection. The cell death kinetic that we report using 5 mM of NMDA is consistent with previous reports (Manabe and Lipton, 2003). Based on our data, we chose to continue our analysis at 3 days after NMDA injection to test the effect of polyamines on excitotoxic RGC death.

IV.4.2.) RGCs and Müller glia express arginase I in intact and NMDA-treated retinas.

Changes in the expression of arginase I, the rate limiting enzyme for polyamine synthesis, has been well correlated with changing polyamine levels in neurons (Cai et al., 2002). Thus, we examined the endogenous expression of arginase I by immunohistochemistry using intact and NMDA-treated retinas. In intact, saline-injected retinas, arginase I was detected in the inner nuclear layer (INL) and in the ganglion cell layer (GCL) (Fig. 3A-C). In the GCL, FluoroGold-positive cells (Fig. 3D) were found to contain arginase I labeling (Fig. 3E), indicating that RGCs express this enzyme (Fig. 3F). This is consistent with previous immunodetection of polyamines reported in RGCs (Withrow et al., 2002). As early as 6 hrs after NMDA injection, there was visible reduction of the thickness of the inner retina (INL, IPL, GCL) as a result of the toxic effects of NMDA (Fig. 3B). Twenty-four hrs after NMDA injection, arginase I signal was stronger in the INL and appeared in radial processes characteristic of Müller cells (Fig. 3C). To confirm that Müller cells expressed arginase I, we used an antibody against cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP), a Müller specific marker (Fig. 3G). The superimposition of CRALBP and arginase I (Fig. 3H) immunostaining revealed that Müller cell bodies and processes upregulated arginase I 24 hrs after NMDA injection (Fig. 3I). Taken together, these data showed that arginase I expression in RGCs is not regulated by NMDA injection, but is increased in Müller cells in response to NMDA excitotoxicity.

IV.4.3.) BDNF does not regulate arginase I levels in the adult retina.

Recent studies showed that BDNF can increase polyamine concentration in CNS neurons by upregulating arginase I expression (Cai et al., 1999; Gao et al., 2003). BDNF is a potent survival factor for adult, injured RGCs (Mansour-Robaey et al., 1994; Cheng et al., 2002), thus we tested the hypothesis that BDNF may influence RGC survival by

upregulating arginase I. Changes in arginase I protein expression were examined by western blot analysis 6 hrs after NMDA injections, when RGC loss was first detected (Fig. 2). Arginase I slightly decreased 6 hrs after NMDA injection. After BDNF stimulation, the level of arginase I did not seem much affected with or without NMDA administration. These results indicate that BDNF does not affect the retinal level of arginase I under normal or excitotoxic conditions.

We also examined the effect of BDNF on NMDA-induced RGC death (Fig. 4B). BDNF did not increase RGC survival at 3 days after NMDA injection compared with NMDA treatment alone. Our results show that BDNF does not regulate arginase I expression in the retina and does not stimulate RGC survival in NMDA-induced excitotoxicity.

IV.4.4.) Polyamines potentiate NMDA-induced RGC death.

In order to study the role of polyamines on NMDA-induced RGC death, we performed two sets of experiments. A group of animals received a single intraocular injection of ornithine decarboxylase inhibitor, DFMO, 24 hrs before NMDA injection. Another group received a cocktail of NMDA and putrescine or spermine in the vitreous chamber (Fig. 1). RGC survival was examined 3 days after each treatment. RGC density was markedly higher in retinas treated with DFMO, and the overall morphology of these neurons was better preserved in the presence of this inhibitor (Fig. 5B). DFMO injection increased RGC survival by 105% and 75% when added at a concentration of 10 mM and 100 mM, respectively, following NMDA damage (Fig. 6A). On flat-mounted retinas, RGC densities were much reduced when putrescine (Fig. 5C) or spermine (Fig. 5D) were co-administered with NMDA than after NMDA treatment alone (Fig. 5A). In contrast, putrescine or spermine worsened the cytotoxic effect of NMDA, decreasing RGC survival by 29% and 20%, respectively, relative to eyes treated with NMDA only (Fig. 6B). Importantly, intraocular injection of polyamines or DFMO by themselves did not affect RGC survival, suggesting that polyamines are regulators of NMDA excitotoxicity (Fig. 6C). Together, these results demonstrate that polyamines exacerbate NMDA-induced RGC death *in vivo*.

IV.4.5.) Polyamines increase RGC death by binding to NMDAR.

To test the hypothesis that polyamines bind to NMDA receptor (NMDAR) leading to potentiation of excitotoxicity, we selectively blocked specifically the polyamine binding sites on NMDAR by using ifenprodil. The simultaneous administration of ifenprodil and NMDA increased RGC survival by 44% compared to NMDA treatment alone (Fig. 7). To better appreciate the effects of ifenprodil on NMDA receptors, we used the non-competitive inhibitor of NMDAR, MK-801, which is a complete blocker of NMDAR (Sun et al., 2001). Consistent with this previous report, we found that MK-801 exerted a strong neuroprotective effect, enhancing RGC survival by 323% compared to the untreated group. Of interest, the neuroprotective effect of ifenprodil was less than that of DFMO. This finding suggests that in addition to interacting with NMDAR, polyamines may contribute to excitotoxic cell death by alternative mechanisms that are independent of NMDAR binding.

IV.5.) Discussion

In the present study, we tested the hypothesis that polyamines could regulate NMDA-induced excitotoxicity of adult RGCs *in vivo*. Arginase I, the rate limiting enzyme for polyamine synthesis, was present in adult RGCs, suggesting that polyamines are endogenously produced in these neurons. Inhibiting the endogenous polyamines synthesis with DFMO markedly protected RGCs from NMDA toxicity. Inversely, putrescine and spermine polyamine administration exacerbated NMDA-induced cell death. In the absence of NMDA, putrescine or spermine did not affect RGCs survival but worsened RGC cell death when they were co-administered with NMDA. This is consistent with previous studies showing that polyamines are not toxic by themselves for embryonic retinal cells (Ientile et al., 1999). Polyamines appear, therefore, to be modulators of NMDA excitotoxicity rather than inducers of adult RGC death.

DFMO is a potent inhibitor of ornithine decarboxylase catalyzing the transformation of ornithine into putrescine. Consistently, previous studies showed that administration of DFMO prevented the elevation of polyamine concentration and strongly decreased the extent of brain damage after ischemia and contusion (Kish et al., 1991; Shohami et al., 1992; Zoli et al., 1993). However, by immunohistochemistry we were not able to detect

arginase I upregulation in RGC neurons after NMDA injection, suggesting that polyamine production is not enhanced in RGCs during excitotoxicity (Fig. 3). Interestingly, Müller glial cells upregulated arginase I 24 hrs after NMDA injection. The synthesis of polyamine in Müller cells is consistent with previous report showing the presence of spermine and spermidine in Müller cells in culture (Biedermann et al., 1998). Although polyamines are polycationic molecules, they can be secreted and taken up through cellular membrane transporters which are ubiquitously present in cells (Seiler et al., 1996). The release of polyamines by Müller cells may thus influence RGC cell death during excitotoxicity. Polyamine upregulation in Müller cells may represent a mechanism modulating RGC cell death in neuropathological processes such as retinal ischemia or glaucoma.

In order to elucidate the mode of action of polyamines in NMDA damage, we used ifenprodil, a blocker of polyamine binding site on NMDAR. We found that ifenprodil increased survival after NMDA injection. However, the inhibition of polyamine synthesis with DFMO was more neuroprotective than the inhibition of polyamine binding to NMDAR. This finding strongly suggests that, in addition to binding NMDAR, polyamines exacerbate toxicity by other molecular mechanisms. In contrast, previous studies using embryonic retinal cells showed that ifenprodil was equally protective as MK-801 against glutamate/NMDA excitotoxicity, suggesting that excitotoxicity is mostly mediated by polyamine binding to NMDAR (Zhang et al., 2000). It has also been reported that the extent of NMDA damage is more severe in adult than in immature retinas (Izumi et al., 1995). The difference between immature and adult retinas is unlikely due to developmental changes in the expression of NR2B subunit containing the high affinity binding sites for polyamines and ifenprodil. In RGCs, the expression of NR2B was not found to change during postnatal development and ifenprodil similarly blocked NMDA receptor ionic currents in developing and adult RGCs (Guenther et al., 2004). The role of polyamines and of their binding site on NMDAR seems to change during RGC maturation independently of NR2B expression. Importantly, our results suggest that, in the adult RGCs, polyamine binding to NMDAR may be a less important mechanism in the modulation of NMDA toxicity than in immature retina.

How polyamines affect the excitotoxic cascade initiated by NMDA remains to be elucidated. Nitric oxide release is a central mediator for NMDA toxicity in embryonic and

adult retinas. For example, the inhibition of nitric oxide synthetase with L-NAME completely protected inner retina cells from NMDA toxicity (Morizane et al., 1997). Interestingly, the depletion of intracellular polyamines with DFMO prevented nitric oxide synthesis after NMDA administration, and thereby inhibited cell death of retinal neurons (Ientile et al., 1999). Polyamines may somehow regulate the intracellular production of NO in adult RGCs to influence survival.

We found that retinal neurons did not upregulate arginase I expression in response to BDNF stimulation (Fig. 4). This is in contrast with other CNS neurons in which BDNF stimulation upregulated arginase I and thus increased polyamine concentrations (Cai et al., 1999; Gao et al., 2003). This difference may be due to the intrinsic incapacity of adult RGCs to upregulate arginase I in response to BDNF. Indeed, in the adult brain, regional differences in polyamine distribution suggest that polyamine enzymes are differently expressed between neuronal populations (Morrison et al., 1995; Laube et al., 2002). The low ability of retinal neurons to express arginase I in response to BDNF stimulation may be a mechanism to avoid the exacerbation of NMDA excitotoxicity in the adult CNS.

In this study, we showed that endogenously-produced polyamines modulate NMDA-induced RGC death *in vivo*. Polyamine inhibitors such as DFMO and, to a lower extent, ifenprodil protected RGCs in our model of excitotoxicity. Further studies will be necessary to elucidate other mechanisms involved in the pro-excitotoxic effect of polyamines.

IV.6.) References

- Biedermann B, Skatchkov SN, Brunk I, Bringmann A, Pannicke T, Bernstein HG, Faude F, Germer A, Veh R, Reichenbach A (1998) Spermine/spermidine is expressed by retinal glial (Muller) cells and controls distinct K⁺ channels of their membrane. *Glia* 23:209-220.
- 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, Deng K, Mellado W, Lee J, Ratan RR, Filbin MT (2002) Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth MAG and myelin in vitro. *Neuron* 35:711-719.
- Cheng L, Sapienza 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.
- 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.
- Guenther E, Schmid S, Wheeler-Schilling T, Albach G, Grunder T, Fauser S, Kohler K (2004) Developmental plasticity of NMDA receptor function in the retina and the influence of light. *Faseb J* 18:1433-1435. Epub 2004 Jul 1439.
- Ientile R, Pedale S, Ginoprelli T, Cannavo L, Macaione S (1999) Intracellular polyamine levels are involved in NMDA-evoked nitric oxide production in chick retina cells. *J Neurochem* 72:1744-1749.
- Izumi Y, Kirby-Sharkey CO, Benz AM, Labruyere J, Price MT, Wozniak DF, Zorumski CF, Olney JW (1995) Age dependent sensitivity of the rat retina to the excitotoxic action of N-methyl-D-aspartate. *Neurobiol Dis* 2:139-144.
- Jentsch JD, Roth RH (1999) The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20:201-225.

- Kashii S, Takahashi M, Mandai M, Shimizu H, Honda Y, Sasa M, Ujihara H, Tamura Y, Yokota T, Akaike A (1994) Protective action of dopamine against glutamate neurotoxicity in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:685-695.
- Kikuchi M, Tenneti L, Lipton SA (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 20:5037-5044.
- Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Ujihara H, Sasa M, Tamura Y, Akaike A (1995) Protective action of zinc against glutamate neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2048-2053.
- Kish SJ, Wilson JM, Fletcher PJ (1991) The polyamine synthesis inhibitor alpha-difluoromethylornithine is neuroprotective against N-methyl-D-aspartate-induced brain damage in vivo. *Eur J Pharmacol* 209:101-103.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51:199-214.
- Laube G, Bernstein HG, Wolf G, Veh RW (2002) Differential distribution of spermidine/spermine-like immunoreactivity in neurons of the adult rat brain. *J Comp Neurol* 444:369-386.
- 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.
- Lipton SA (2003) Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Surv Ophthalmol* 48:S38-46.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-622.
- Manabe S, Lipton SA (2003) Divergent NMDA signals leading to proapoptotic and antiapoptotic pathways in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:385-392.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, 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 USA* 91:1632-1636.

- Markwell MA, Berger SP, Paul SM (1990) The polyamine synthesis inhibitor alpha-difluoromethylornithine blocks NMDA-induced neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 182:607-609.
- Morizane C, Adachi K, Furutani I, Fujita Y, Akaike A, Kashii S, Honda Y (1997) N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester protects retinal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Pharmacol* 328:45-49.
- Morrison LD, Becker L, Ang LC, Kish SJ (1995) Polyamines in human brain: regional distribution and influence of aging. *J Neurochem* 65:636-642.
- Paschen W, Rohn G, Meese CO, Djuricic B, Schmidt-Kastner R (1988) Polyamine metabolism in reversible cerebral ischemia: effect of alpha-difluoromethylornithine. *Brain Res* 453:9-16.
- Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A (2005) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons in vivo. *J Neurochem* 93:72-83.
- Porcella A, Fage D, Voltz C, Carter C, Scatton B, Bartholini G (1991) Difluoromethyl ornithine protects against the neurotoxic effects of intrastrially administered N-methyl-D-aspartate in vivo. *Eur J Pharmacol* 199:267-269.
- Sapieha PS, Peltier M, Rendahl KG, Manning WC, Di Polo A (2003a) 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.
- Sapieha PS, Peltier M, Rendahl KG, Manning WC, Di Polo A (2003b) 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.
- Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP (1996) Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 28:843-861.
- Sharif NA and Xu SX (1999) Pharmacological characterization of [3H]-Ifenprodil binding to polyamine binding sites on rabbit and rat retinal homogenates: role in neuroprotection? *J Ocul Pharmacol Ther* 15(3):271-81.
- Shohami E, Nates JL, Glantz L, Trembovler V, Shapira Y, Bachrach U (1992) Changes in brain polyamine levels following head injury. *Exp Neurol* 117:189-195.

- Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, Schiavo N, Zanellato A, Zanoni R, Vantini G (1992) N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci* 8:567-573.
- Trout JJ, Koenig H, Goldstone AD, Iqbal Z, Lu CY, Siddiqui F (1993) N-methyl-D-aspartate receptor excitotoxicity involves activation of polyamine synthesis: protection by alpha-difluoromethylornithine. *J Neurochem* 60:352-355.
- Tsukada H, Nishiyama S, Fukumoto D, Sato K, Kakiuchi T, Domino EF (2005) Chronic NMDA antagonism impairs working memory, decreases extracellular dopamine, and increases D1 receptor binding in prefrontal cortex of conscious monkeys. *Neuropsychopharmacology* 30:1861-1869.
- Williams K (1997) Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. *Cell Signal* 9:1-13.
- Withrow C, Ashraf S, O'Leary T, Johnson LR, Fitzgerald ME, Johnson DA (2002) Effect of polyamine depletion on cone photoreceptors of the developing rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3081-3090.
- Zhang S, Kashii S, Yasuyoshi H, Kikuchi M, Honda Y, Kaneda K, Sato S, Akaike A (2000) Protective effects of ifenprodil against glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238:846-852.
- Zoli M, Zini I, Grimaldi R, Biagini G, Agnati LF (1993) Effects of polyamine synthesis blockade on neuronal loss and astroglial reaction after transient forebrain ischemia. *Int J Dev Neurosci* 11:175-187.

Figure 1. Polyamine synthesis cascade. Polyamines are arginine-derived polycationic molecules. Arginine is transformed by arginase I into ornithine and urea. In turn, ornithine is changed into putrescine by ornithine decarboxylase. This enzyme can be blocked by di-fluoro-methyl-ornithine (DFMO) to inhibit polyamine synthesis. Spermidine and spermine produced downstream from putrescine constitute with putrescine the polyamine molecule family.

Figure 2. Time course of NMDA-induced RGC death *in vivo*. RGC cell death was induced by injecting intraocularly 5 mM of NMDA. RGC survival was established by counting FG-stained RGCs on flat-mounted retinas within the first week following NMDA injection. Excitotoxicity was first detected 6 hrs after NMDA injection. Cell death dramatically increased between 6 hrs and 12 hrs following NMDA injection and reached a maximum at 3 days. No significant difference in the RGC number was found between 3 days and 7 days post-injection.

Figure 3. Arginase I is up-regulated in Müller glial cells by NMDA injection. Arginase I was immunodetected after NMDA injection by immunohistochemistry on retinal sections. (A) Arginase I was strongly expressed in the inner retina (INL, IPL, GCL and FL) of intact retina. (B) Arginase I staining did not change early after NMDA injection (6 hrs) but appeared stronger in the INL and in radial processes at 24 hrs post-injection (C). RGCs were identified by FluoroGold (D) backlabelling and appeared immunopositive for arginase I (E) in intact retina as demonstrated by overlaying the two FG and arginase I stainings (F). CRALBP staining allowed to identify specifically Müller glial cells. Superimposition of CRALBP (G) and arginase I stainings (H) confirmed that Müller cells up-regulated arginase I in their somas and processes 24 hrs after NMDA injection (I). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer; FL: fibre layer. Scale bar = 50µm.

Figure 4. BDNF does not stimulate arginase I expression in adult retina. (A) BDNF injection with or without NMDA co-administration did not affect arginase I protein level in the retina as observed by western blot analysis. A liver sample was used as a positive control because of the particular abundance of arginase I in this organ where it takes part to the urea cycle metabolism. (B) Intravitreal injection of BDNF did not change RGC survival 3 days after NMDA administration (t test, $p > 0.5$).

Figure 5. Polyamine synthesis inhibition promotes RGC survival after NMDA injection. The role of endogenous polyamines was investigated by pre-treating animals with the ornithine decarboxylase inhibitor, DFMO, or by co-injecting putrescine or spermine with NMDA. (A-D) Survival was observed 3 days after NMDA injection on whole-mounted retinas. (A) DFMO markedly protected RGCs from NMDA excitotoxicity compared with saline injection. In contrast, putrescine (C) or spermine (D) co-administration exacerbated NMDA cell death. Scale bar = 50 μ m.

Figure 6. Quantitative analysis of RGC survival. (A) Survival quantification revealed that DFMO increased by 105% and by 75% RGC number when it was used at 10 mM (ANOVA, $p < 0.05$) and 100 mM respectively. (B) Putrescine and spermine exerted opposite effects and increased NMDA-induced cell death by 29% and 20% respectively. (C) Injection of polyamines or DFMO, alone, did not change RGC survival in absence of NMDA, suggesting that polyamines are modulators but not inducers of neuronal excitotoxicity.

Figure 7. Polyamine exacerbation of NMDA toxicity is not only mediated by NMDAR facilitation. Injection of the polyamine binding site blocker on NMDAR, ifenprodil, enhanced RGC survival by 44%. However, the neuroprotective effect of Ifenprodil (ANOVA, $p > 0.05$) was lower than that of DFMO (ANOVA, $p < 0.01$), suggesting that polyamines do not only bind to NMDAR to modulate NMDA-triggered RGC death. To better appreciate ifenprodil effect on RGC survival, the complete NMDAR blocker, MK-801, was co-administered with NMDA. As expected, MK-801 protected most of the RGCs from cell death, increasing by ~323% the RGC density compared with the saline reference group (ANOVA, $p < 0.001$).

IV.7.) FIGURES

FIGURE 1

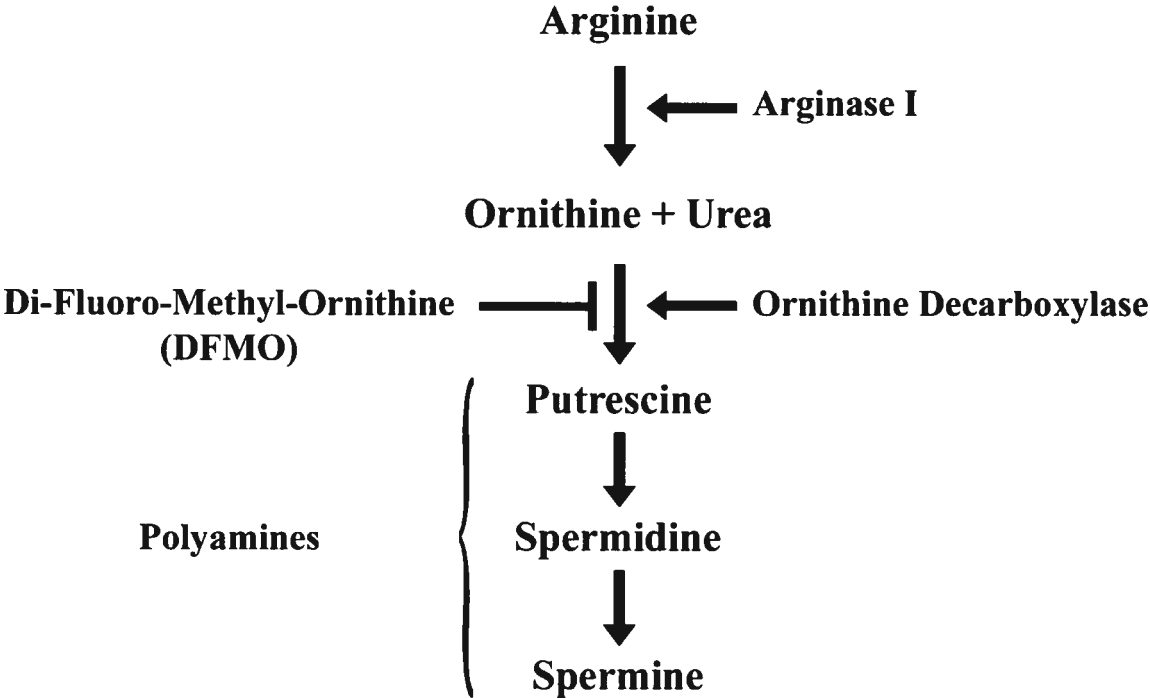


FIGURE 2

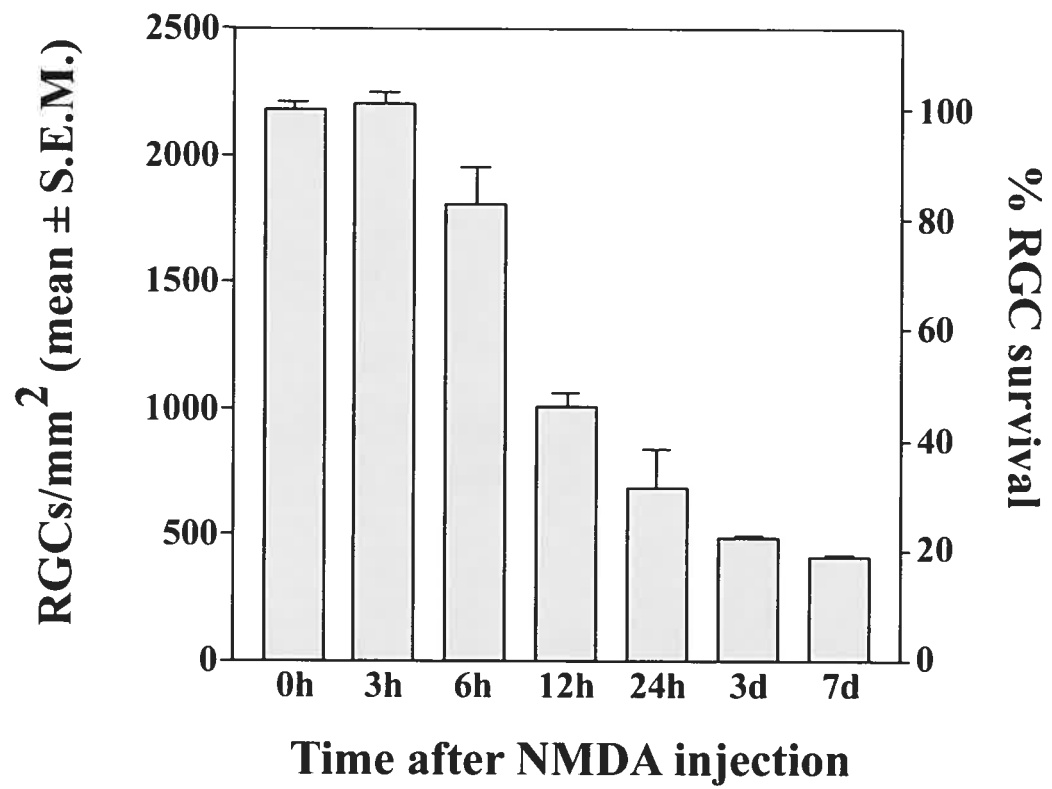


FIGURE 3

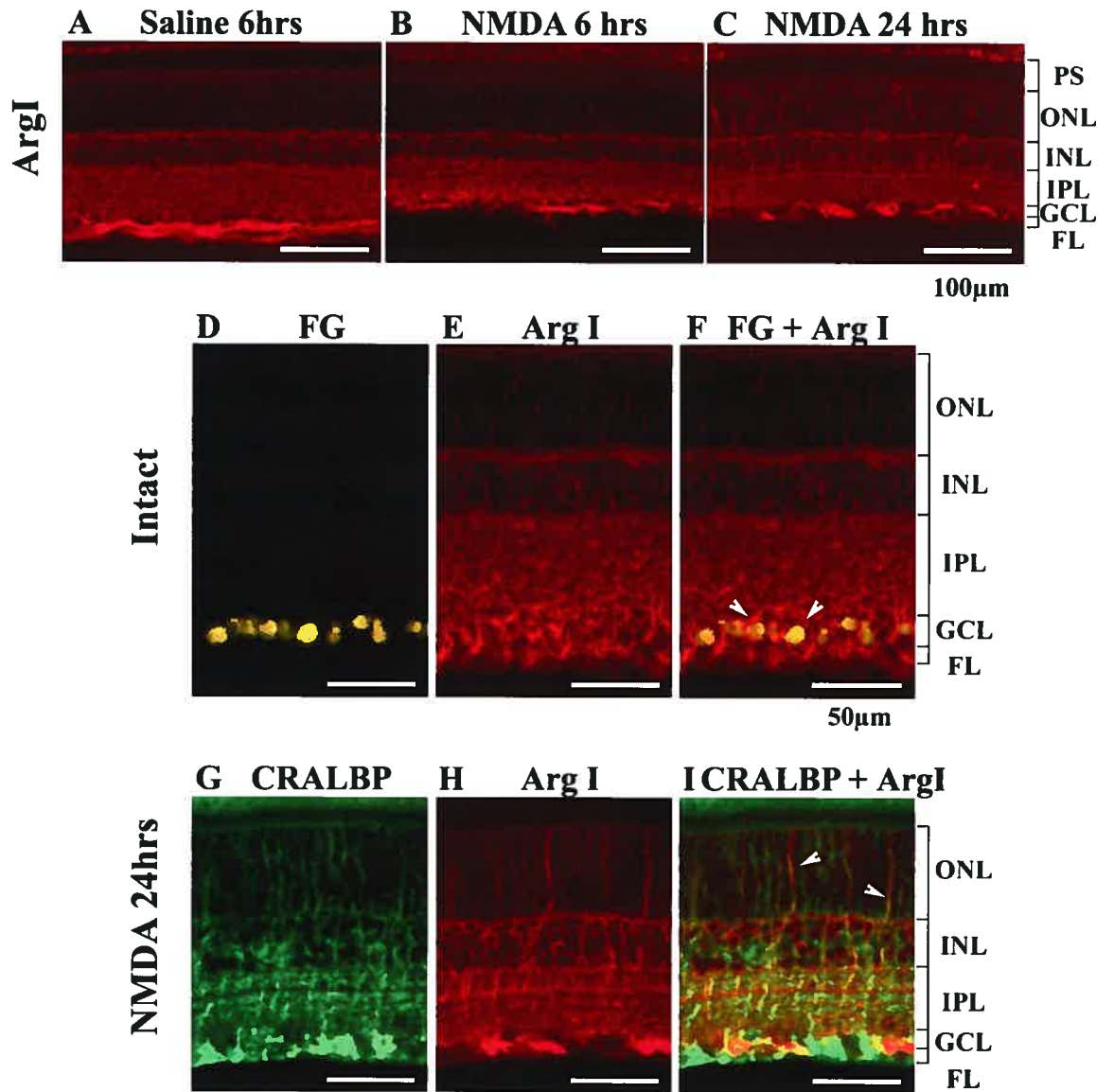


FIGURE 4

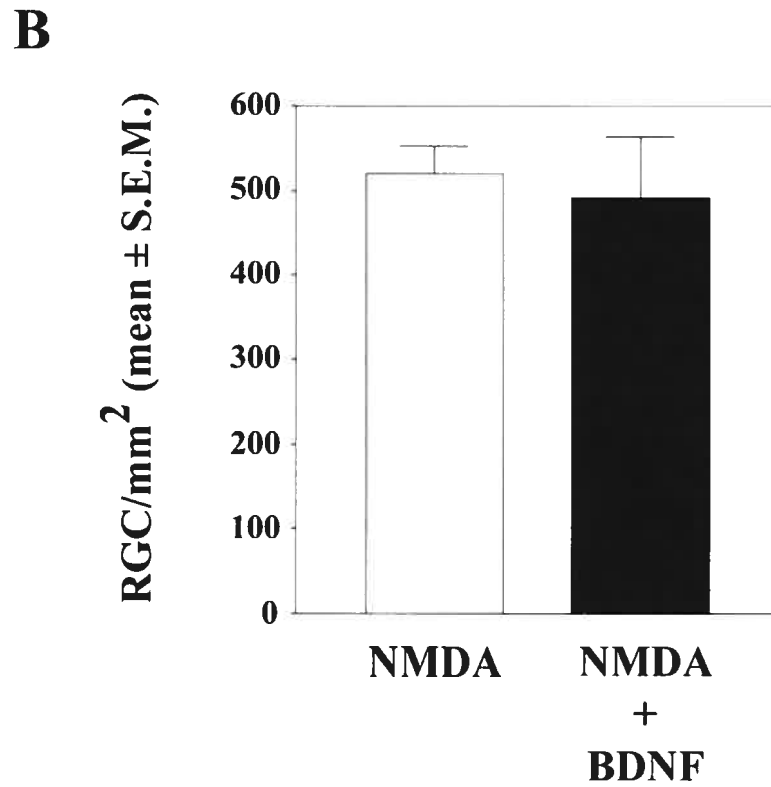
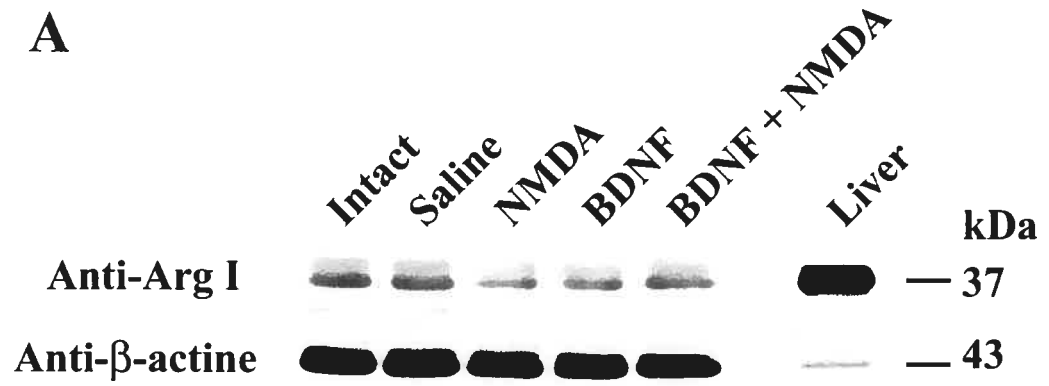


FIGURE 5

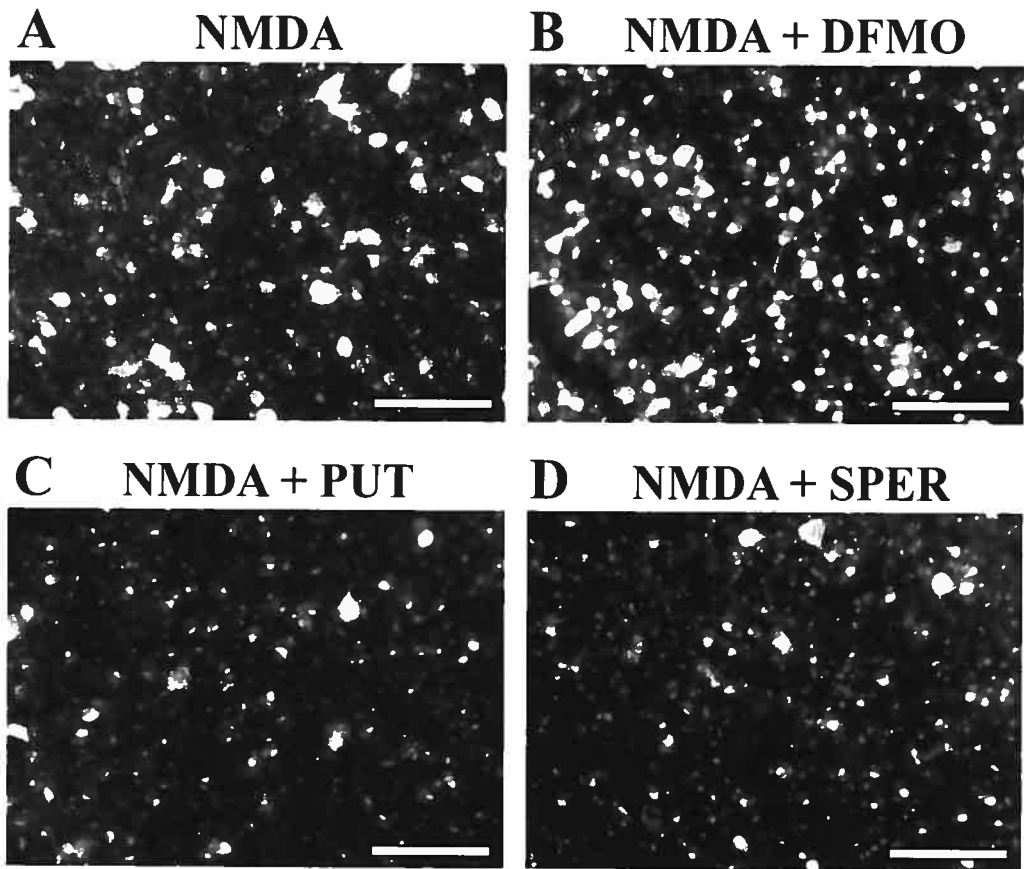


FIGURE 6

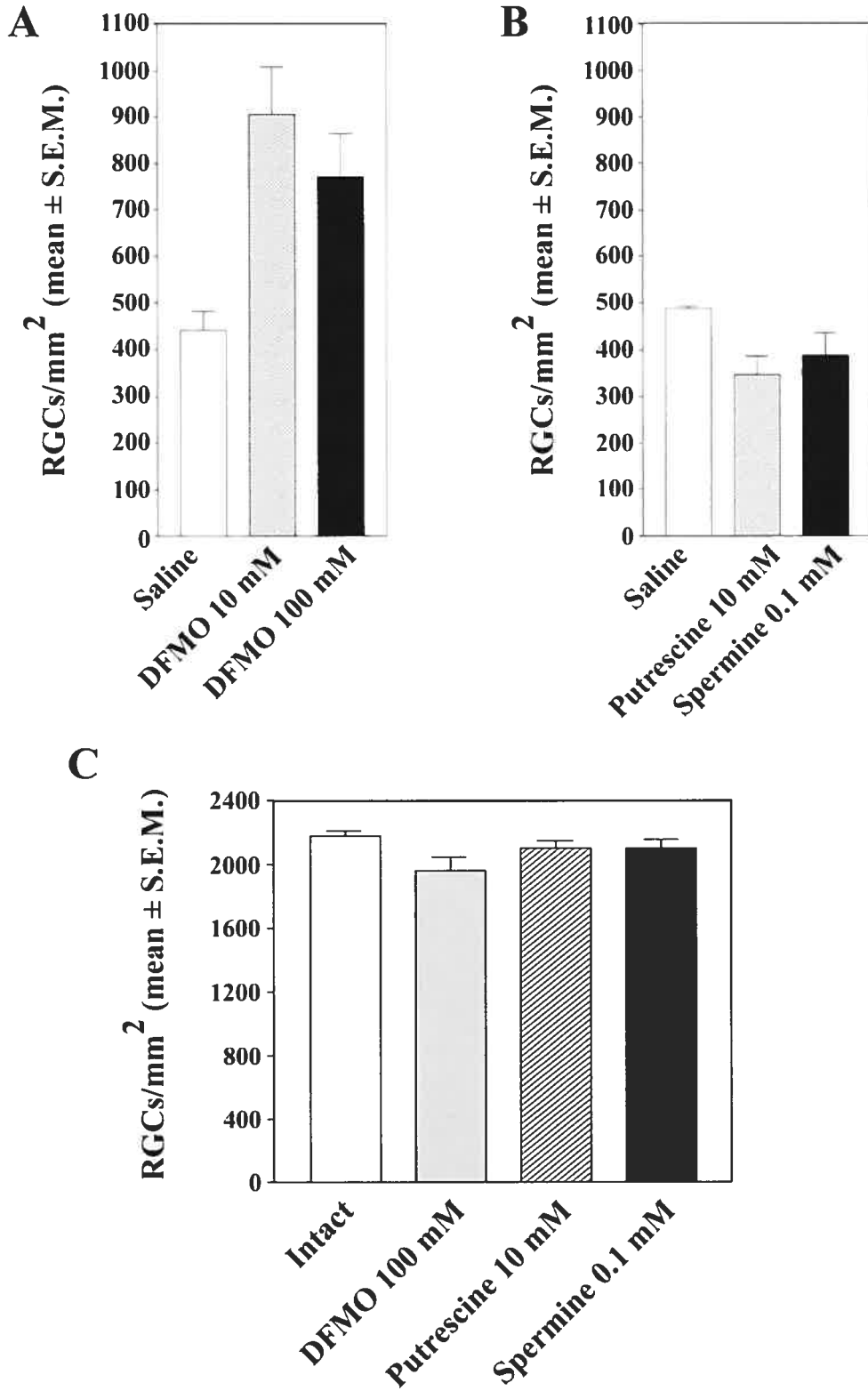
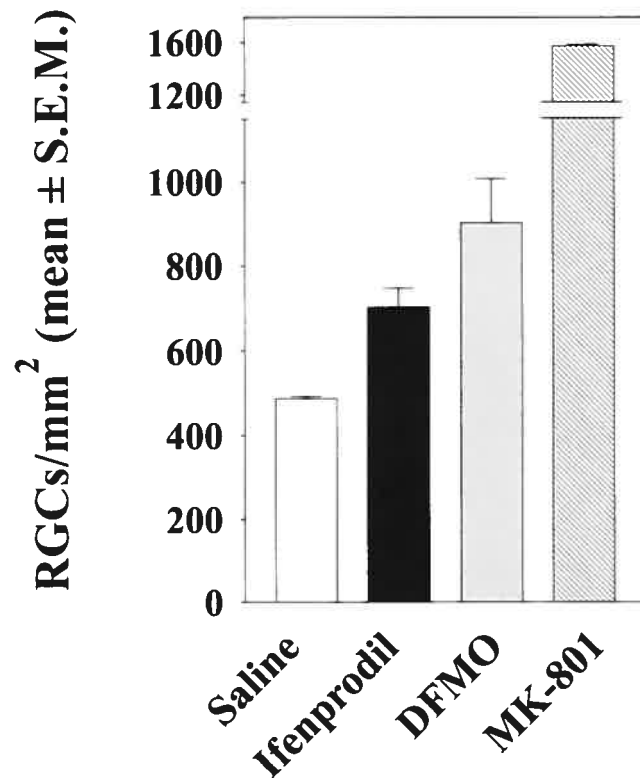


FIGURE 7



CHAPITRE 5

V. DISCUSSION GÉNÉRALE

V.1.) La voie BDNF/TrkB/Erk_{1/2} dans la survie des neurones axotomisés.

V.1.1.) L'activation de Erk_{1/2} stimule la survie neuronale *in vivo*.

Grâce à l'utilisation du virus adéno-associé AAV.MEK-ca, nous avons sélectivement introduit une forme constitutivement active du gène MEK-ca dans les CGRs pour activer la voie Erk_{1/2}. Nous avons ainsi démontré que la voie Erk_{1/2} était capable à elle seule de maintenir les CGRs en vie plusieurs semaines après la transection du nerf optique. Ces résultats confirment l'importance de la voie Erk_{1/2} dans la survie neuronale *in vivo* qui a été suggérée par plusieurs publications *in vitro* (Meyer-Franke et al., 1995; Kaplan and Miller, 2000; Klocker et al., 2000) et *in vivo* (Cheng et al., 2002). Les mécanismes moléculaires de la survie de Erk_{1/2} n'ont pas été abordés dans notre étude. Néanmoins, il est probable que la phosphorylation de Erk_{1/2} inhibe l'apoptose en dégradant Bad via Rsk et en activant la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 via CREB (Bonni et al., 1999). Parallèlement à notre travail, Watt et ses co-équipiers ont montré que la survie des neurones sensoriels olfactifs, une population neuronale constamment renouvelée par des cycles d'apoptose/différenciation, était augmentée par l'activation soutenue de Erk_{1/2} et Bcl-2 (Watt et al., 2004). Dans des souris transgéniques exprimant le gène de Ras dans sa forme constitutivement active, l'élévation du niveau de phospho-Erk_{1/2} est associée à une plus grande survie des motoneurones faciaux axotomisés (Heumann et al., 2000). Notre étude est donc la première à démontrer que l'activation ciblée de P-Erk_{1/2} dans une population stable de neurones du SNC inhibe la mort provoquée par axotomie.

V.1.2.) Le degré et la durée d'activation de P-Erk_{1/2} dans la survie neuronale.

Si, comme nous l'avons montré, la voie Erk_{1/2} est neuroprotectrice pour les neurones axotomisés, alors pourquoi les facteurs neurotrophiques CNTF, FGF2 et BDNF ne sont pas des agents neuroprotecteurs équivalents? Cette question est légitime car la voie Erk_{1/2} est activée par chacune de ces trois molécules qui stimulent des récepteurs à tyrosine kinase. Par exemple, FGF2 active phospho-Erk_{1/2} (Kinkl et al., 2001) dans la rétine mais n'a qu'un effet transitoire sur la survie neuronale (Sapieha et al., 2003). En revanche, la neuroprotection des CGRs par le BDNF persiste plusieurs semaines après la blessure (Mansour-Robaey et al., 1994; Cheng et al., 2002; Pernet and Di Polo, 2006). Une première hypothèse explicative peut être liée au mode de stimulation. Dans le cas où un gène tel que

le FGF2 est introduit avec un AAV dans les CGRs, la stimulation des voies de survie dépend de la machinerie de synthèse protéique cellulaire et est limitée par le taux faible d'infection (les CGRs représentent ~1% des cellules totales de la rétine). De plus, la synthèse protéique pourrait être altérée par la blessure. Par exemple, la transcription du gène de *trkB* chute de 40% dans les CGRs, 3 jours après l'axotomie du nerf optique (Cheng et al., 2002). En revanche, l'injection intravitréenne de neurotrophine comme le BDNF représente un apport direct et massif de neurotrophine, susceptible d'activer immédiatement et à long terme la survie par Erk_{1/2} (Nakazawa et al., 2002).

Un autre élément de réponse se trouve peut être dans la durée et le degré d'activation de Erk_{1/2} induits par les différentes neurotrophines. Nos résultats avec AAV.MEK-ca supportent directement l'hypothèse qu'un seuil élevé de P-Erk_{1/2} doit être atteint pour activer les mécanismes de survie neuronaux. Nous avons trouvé que la transfection des CGRs avec la forme sauvage du gène de MEK1 (AAV.MEK-wt) activait P-Erk_{1/2} à un niveau moins élevé que MEK-ca (AAV.MEK-ca) (Article 1, Figure 3) et s'accompagnait de peu de survie par rapport à MEK-ca (Article 1, Figure 5). Bien que les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) activent tous Erk_{1/2}, le niveau d'activation de Erk_{1/2} est contrôlé par des voies de signalisation distinctes. Des travaux ont démontré que l'activation transitoire de Erk_{1/2} passait par la cascade Shc/Grb2/SOS/Raf1, alors que l'activation soutenue de Erk_{1/2} dépendait d'une autre voie de signalisation, la voie Frs2/Crk/C3G/Rap1/S-raf, plus récemment mise à jour (Figure 9). De manière très intéressante, l'activation de ces deux cascades de signalisation est initiée par l'interaction de Shc ou *Fibroblast growth factor receptor substrate 2* (Frs2) avec la phospho-tyrosine Y490 sur Trk. Mieux encore, il semble que les protéines Shc et Frs2 soient en compétition pour se fixer au site Y490 (Meakin et al., 1999). Donc, la liaison de l'une des protéines adaptatrices active une des voies au détriment de l'autre. Au niveau physiologique, l'activation soutenue de Erk_{1/2} par NGF conduit à la différenciation des cellules PC12 (arrêt du cycle cellulaire et croissance neuritique), alors que la courte activation de Erk_{1/2} par *Epidermal Growth Factor* (EGF) stimule la prolifération cellulaire (Grewal et al., 1999). Dans la survie neuronale induite par les neurotrophines, on ne connaît pas exactement l'importance et les mécanismes régulateurs de la durée d'activation de P-Erk_{1/2}. Cependant, il a été suggéré que les facteurs neurotrophiques de la famille du BDNF possédaient un

mécanisme moléculaire de bascule, inductible par la phosphorylation de la protéine *Ankyrin Rich Membrane-Spanning* (ARMS), vers l'activation soutenue de Erk_{1/2} qui distinguerait les neurotrophines des autres facteurs de croissance (Arevalo et al., 2004; Arevalo et al., 2006) (Figure 10). Cette aptitude particulière des Trk à diriger une stimulation durable de Erk_{1/2} expliquerait, au moins en partie, pourquoi les neurotrophines sont plus neuroprotectrices que les autres activateurs de RTK.

V.1.3.) Les effets peu durables de P-Erk_{1/2} sur la survie neuronale.

En utilisant une forme constitutivement active de MEK1, nous nous attendions à prolonger la survie des CGRs au-delà de ce qui a été précédemment rapporté avec le BDNF (Mansour-Robaey et al., 1994; Cheng et al., 2002). Cependant, l'expression de MEK-ca n'a pas maintenu un niveau constant de survie à long terme après la lésion du nerf optique (Article 1, Figure 5). L'utilisation de virus AAV a pourtant permis d'exprimer MEK-ca de façon durable dans les CGRs intacts (Article 1, Figure 2). De plus, P-Erk_{1/2} a été détecté par immunohistochimie dans les axones du nerf optique deux semaines après la microlésion (Article 1, Figure 7), suggérant que Erk_{1/2} n'est pas désactivé par la blessure. Néanmoins, Shen et al. (1999) ont observé que la translocation de Erk_{1/2} du cytoplasme vers le noyau des CGRs disparaissait après l'axotomie (Shen et al., 1999). D'après ces auteurs, la perte des effets neuroprotecteurs des facteurs neurotrophiques proviendrait de l'exclusion de Erk_{1/2} du noyau cellulaire. Par contre, l'augmentation d'AMPc restaurerait la translocation nucléaire de Erk_{1/2} et exercerait des effets synergiques avec les facteurs neurotrophiques sur la survie des CGRs en culture (Shen et al., 1999). Chez les CGRs, la synthèse intracellulaire d'AMPc chute après la naissance (Cai et al., 2001) et pourrait contribuer à la baisse intrinsèque de croissance axonale constatée après le stade embryonnaire (Goldberg et al., 2002a). Dans notre étude, nous avons observé que P-Erk_{1/2} était localisé dans le cytosol et les noyaux des CGRs intacts (Article 1, Figure 2), mais nous n'avons pas vérifié la répartition cellulaire de P-Erk_{1/2} après l'axotomie. Il est donc possible que les effets de survie de AAV.MEK-ca soient limités dans le temps par le blocage de la translocation nucléaire de Erk_{1/2} après la lésion axonale.

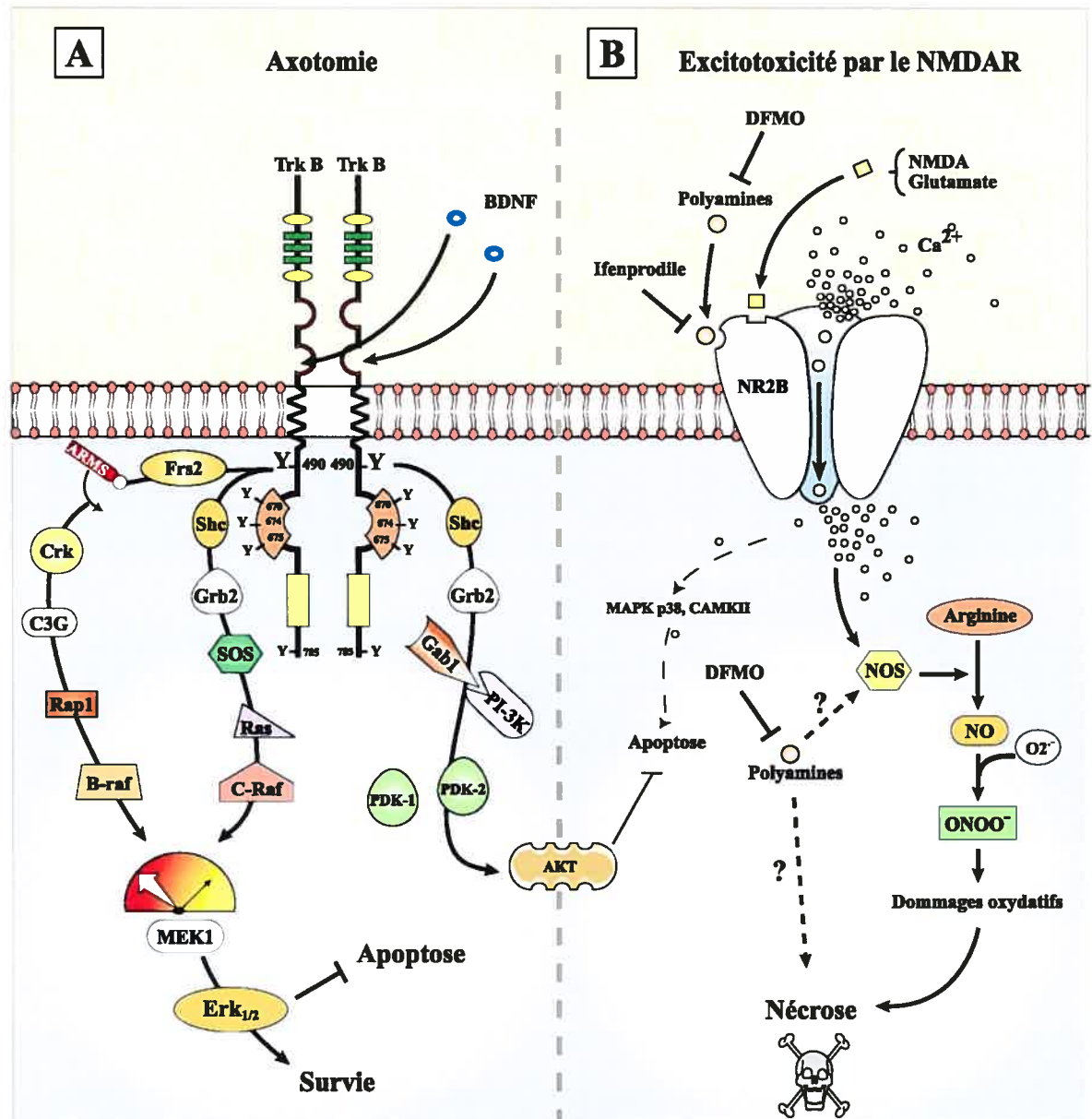


Figure 9. Modèle hypothétique de survie des cellules ganglionnaires de la rétine. (A) Dans le modèle de l'axotomie, l'intensité de la survie neuronale induite par TrkB/BDNF suit le niveau d'activation de P-Erk_{1/2}. La voie Frs2/Crk/C3G/Rap1/B-Raf active de manière soutenue P-Erk_{1/2}, alors que la voie Shc/Grb2/SOS/Ras/C-Raf stimule la voie P-Erk_{1/2} de façon transitoire. Les deux voies sont en compétition pour le site de liaison Y490. Mais les récepteurs Trk possèdent un « interrupteur moléculaire » inductible par phosphorylation, ARMS, qui privilégie l'activation prolongée de P-Erk_{1/2} via Rap-1, et exercerait une meilleure inhibition de l'apoptose. **(B)** Dans le modèle d'excitotoxicité du NMDAR, l'activation massive de NMDAR induit des dommages oxydatifs, via le NO, qui ne seraient pas contrôlables par le BDNF. Les polyamines sont des facilitateurs endogènes de l'ouverture des canaux calciques des NMDAR qui exacerbent la mort excitotoxique. L'inhibition des polyamines réduit l'activation des NMDAR et pourrait inhiber certaines voies de signalisation impliquées dans la mort. © Vincent Pernet.

V.2.) La voie BDNF/TrkB/Erk_{1/2} dans la régénération axonale *in vivo*.

Les études antérieures montraient que l'activation seule de Erk_{1/2} stimulait la croissance des neurones embryonnaires en culture (Dimitropoulou and Bixby, 2000). Dans notre étude avec AAV.MEK-ca, la voie Erk_{1/2} n'était pas capable d'induire la croissance axonale à elle seule. On peut imaginer que 1) Erk_{1/2} ne permet pas aux axones de renverser les signaux inhibiteurs présents au site de blessure (myéline, CSPG) ou bien que 2) l'activation de la voie Erk_{1/2} chez l'adulte n'est pas initiatrice d'un programme de croissance axonale.

V.2.1.) Le rôle de BDNF/Erk_{1/2} dans l'inhibition de la croissance axonale par la myéline.

Des travaux récemment accomplis dans le laboratoire du Dr Filbin ont montré que la cascade de signalisation BDNF/AMPC/CREB/arginase I/polyamines donnait aux neurones la capacité de faire pousser leurs axones sur des substrats inhibiteurs de myéline (Cai et al., 1999; Cai et al., 2002; Gao et al., 2003). Dans le paradigme de Filbin, la stimulation avec différents facteurs neurotrophiques devait être faite avant que les cellules ne soient mises en contact avec les protéines de la myéline (Cai et al., 1999). En injectant du BDNF dans l'oeil 24h avant la microlésion, nous avons stimulé les CGRs avant que les axones blessés ne rencontrent les protéines de la myéline. Cependant, le traitement (Article 2, Figure 2) ou pré-traitement (données non présentées) avec le BDNF n'a pas permis d'observer de régénération axonale dans le nerf optique. De plus, nous n'avons pas remarqué d'augmentation de l'arginase I dans la rétine après l'injection de BDNF (Article 3, Figure 4) et l'activation de Erk_{1/2}, en amont de CREB, n'a pas mené à l'activation de régénération axonale (Article 1, Figure 7). Peut être que la voie BDNF/Erk_{1/2} n'est pas liée à la synthèse des polyamines dans les CGRs adultes et ne permet donc pas de surmonter l'inhibition par les protéines de la myéline contrairement aux autres types de neurones *in vitro*.

V.2.2.) La signalisation cellulaire dans l'initiation de la croissance axonale.

Bien que nos résultats supportent que la voie Erk_{1/2} n'induit pas la croissance axonale, elle semble impliquée dans l'intensité de la régénération axonale. L'activation de

Erk_{1/2} par FGF2 (Kinkl et al., 2001) ou par CNTF (Park et al., 2005) dans la rétine s'accompagne de régénération dans le nerf optique ou dans des greffes de nerfs périphériques (Cui and Harvey, 2000; Sapieha et al., 2003). L'inhibition de la voie Erk_{1/2} réduit drastiquement mais ne provoque pas l'arrêt complet de la régénération axonale induite par FGF2 dans le nerf optique adulte blessé (Sapieha et al., 2006). Dans le même ordre d'idée, Webber et ses collègues ont récemment rapporté que l'inhibition de la voie Erk_{1/2} réduisait considérablement la longueur des projections axonales des CGRs vers le tectum pendant le développement (Webber et al., 2005). Une fois de plus, les auteurs ont remarqué que l'inhibition de Erk_{1/2} ne menait pas à l'absence d'extension axonale. Dans cette même étude, l'inhibition de PLC γ avait un effet encore plus sévère sur les projections axonales que l'inhibition de Erk_{1/2}, alors que l'inhibition de la voie PI-3K/Akt paraissait sans conséquence notable. Pendant le développement, Erk_{1/2} et PLC γ semblent collaborer au processus de croissance axonale. Plutôt que d'être un déclencheur, Erk_{1/2} semble agir comme un modulateur de la croissance axonale qui dépend d'autres signaux moléculaires dont l'identité reste à établir.

V.2.3.) L'activation de la croissance neuritique par la translocation nucléaire de P-Erk_{1/2}.

Comme je l'ai précédemment proposé pour la baisse de survie, la perte de translocation dans le noyau après l'axotomie (Shen et al., 1999) peut empêcher les effets transcriptionnels de Erk_{1/2} impliqués dans la croissance axonale. Markus et ses collègues ont trouvé que la rétention de Erk_{1/2} dans le cytoplasme bloquait la croissance axonale à longue distance des neurones sensoriels (Markus et al., 2002). De façon similaire, la fusion de Erk₂ et MEK1 (Erk2-MEK1) provoque l'activation de Erk_{1/2} localement dans le cytosol et ne stimule pas l'extension neuritique (Robinson et al., 1998). Au contraire, si la protéine P-Erk2 est piégée dans le noyau, la croissance neuritique est activée (Fukuda et al., 1996). L'action de P-Erk_{1/2} dans le noyau est donc déterminante pour l'activation de la croissance neuritique. Pour stimuler la croissance axonale dans le nerf optique, l'activation de P-Erk_{1/2} pourrait ne pas être suffisante et pourrait nécessiter l'activité transcriptionnelle de Erk_{1/2} dans le noyau. Si cette hypothèse est vraie, la translocation de Erk_{1/2} pourrait être rétablie en augmentant l'AMPC après l'axotomie (Shen et al., 1999).

V.2.4.) Les effets secondaires du BDNF et de P-Erk_{1/2} dans les axones blessés.

Des études antérieures avaient suggéré que le BDNF n'était pas capable d'activer la croissance axonale à cause du manque de synthèse des protéines cytosquelettiques requises pour la régénération axonale telles que les tubulines (Fournier et al., 1997; Fournier and McKerracher, 1997). Nos expériences d'activation de la croissance axonale avec la blessure du cristallin ont révélé que le BDNF pouvait inhiber la croissance axonale et causer la dystrophie des axones dans le nerf optique (Article 2, Figures 2 et 6). Ces résultats nous ont incités à nous interroger sur les effets secondaires du BDNF et éventuellement ceux de la sur-activation de P-Erk_{1/2}. Dans la discussion du deuxième article de la thèse, nous avons supposé que le BDNF pourrait bloquer la croissance axonale en stabilisant le cône de croissance ou en altérant le transport axonal. Une autre théorie serait que l'hyperphosphorylation des molécules cytosquelettiques par BDNF/Erk_{1/2} causerait la dystrophie des axones

V.2.4.1) La phosphorylation du cytosquelette dans la dystrophie axonale.

L'interruption du transport axonal antérograde lent des neurofilaments et des tubulines a été directement impliqué dans le manque de régénération axonale du nerf optique blessé (McKerracher et al., 1990b). Lors de la régénération axonale dans les greffes de nerfs périphériques, le transport axonal antérograde lent reprend (McKerracher et al., 1990a). Le ralentissement du transport axonal antérograde lent dans le nerf optique est causé par la phosphorylation de la sous-unité lourde des neurofilaments (NF-H) (Jung and Shea, 1999) et pourrait être à l'origine de l'accumulation de phospho-NF-H dans le compartiment somato-dendritique (Article 2, Figure 7) (Dieterich et al., 2002). L'activation de P-Erk_{1/2} par BDNF ou MEK-ca pourrait exacerber la phosphorylation anormale de NF-H après la blessure. En effet, il a été démontré que l'activation de P-Erk_{1/2}, avec la même forme mutante MEK-ca que celle utilisée dans l'article 1 de la thèse, phosphorylait les sous-unités NF-M (sous-unité moyenne des neurofilaments) et NF-H sur les motifs KSP (Lys-Ser-Pro) du bras C-terminal (Veeranna et al., 1998). Dans notre étude, la régénération axonale induite par la blessure du cristallin dépend probablement de la reprise du transport antérograde lent dans le nerf optique blessé. Donc, il est possible qu'en activant P-Erk_{1/2},

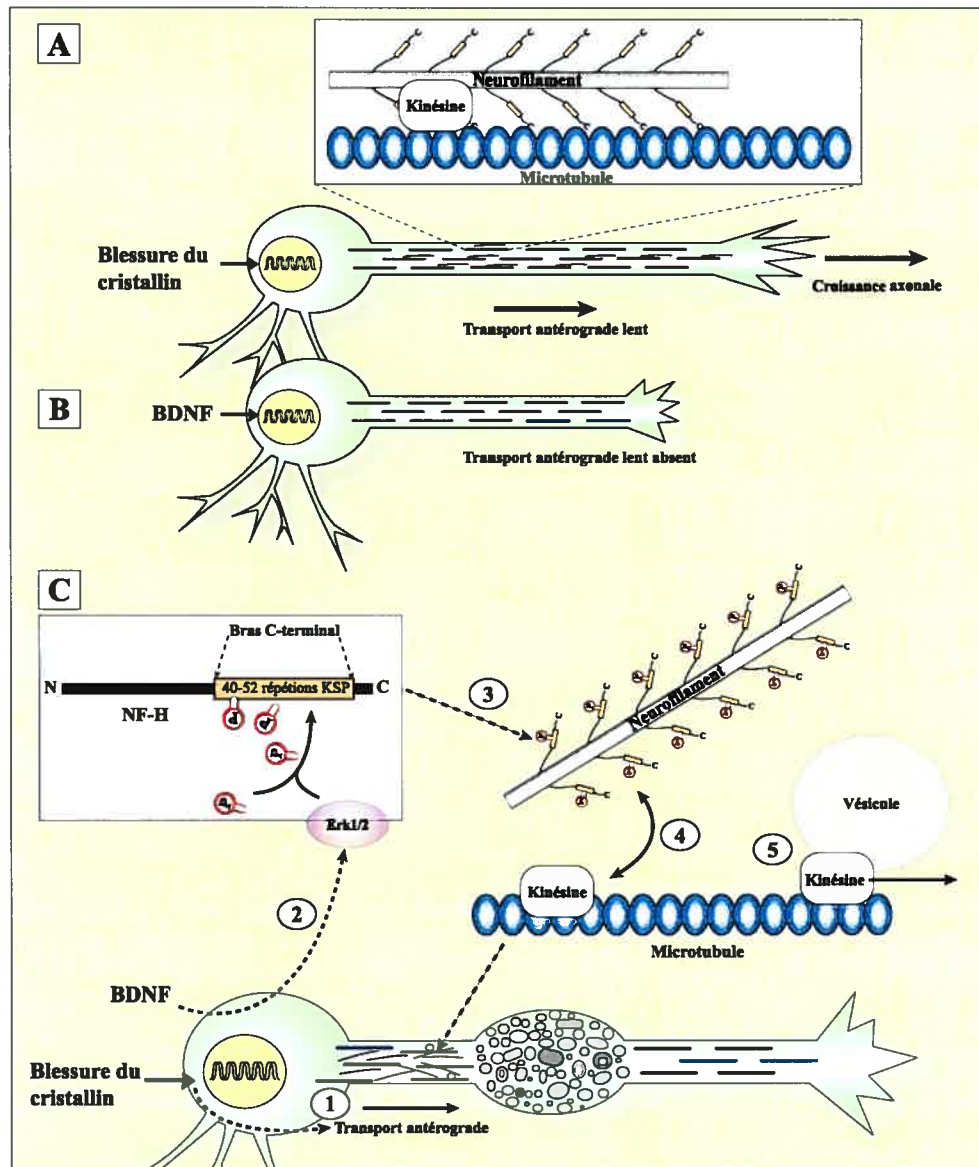


Figure 10. Modèle proposé de régénération et de dystrophie axonale. (A) Le transport axonal lent est requis pour la régénération axonale dans le nerf optique. La blessure du cristallin active un programme de croissance axonale qui relance le transport axonal et stimule l'extension de l'axone après le site de blessure dans le nerf optique. (B) En présence de BDNF, il n'y a pas de transport axonal des protéines cytosquelettiques nécessaires à la progression du cône de croissance. (C) La blessure du cristallin combinée au BDNF a pour effet de provoquer des hypertrophies focales de l'axone dans le nerf optique. Les neurofilaments sont transportés massivement dans l'axone grâce à la blessure du cristallin (1). En activant $Erk_{1/2}$, BDNF stimule l'hyperphosphorylation des nombreux motifs KSP portés par le bras C-terminal de la sous-unité NF-H (2), (3), (4). La phosphorylation des neurofilaments provoque leur séparation des moteurs de transport (kinésine) et leur accumulation anormale dans l'axone. Les vésicules sont véhiculées par le transport antérograde rapide et s'agglomèrent dans les sites de l'axolemente désorganisés par les phospho-neurofilaments (5). © Vincent Pernet.

le BDNF ralentisse le transport axonal antérograde lent des protéines du cytosquelette, et de cette manière, entrave la croissance axonale induite par la blessure du cristallin.

Nous avons récemment observé que P-Erk_{1/2} peut directement provoquer la dystrophie des axones. Deux semaines après la microlésion du nerf optique, nous avons constaté que les axones des CGRs infectées par AAV.MEK-ca présentaient une morphologie dystrophique par rapport à la morphologie axonale normale qui persiste après le traitement avec AAV.GFP dans les nerfs blessés (Annexe B, Micrographies A-B). Dans le nerf optique intact, nous n'avons pas noté que P-Erk_{1/2} causait de changements visibles de la morphologie axonale 2 mois après l'injection intraoculaire d'AAV.MEK-ca (Article 1, Figure 4). Cependant, 4 mois après l'injection virale d'AAV.MEK-ca, des renflements axonaux hypertrophiques se sont spontanément développés dans des nerfs intacts (N=4) (Annexe B, Micrographies C-D). L'ensemble de ces résultats indique que P-Erk_{1/2} affecte la morphologie de l'axone dans le nerf optique lésé ou à plus long terme dans le nerf optique intact.

La présentation par Griffin et ses collaborateurs (1978) de renflements axonaux hypertrophiques suivant l'interruption du transport antérograde lent, alors que le transport antérograde rapide est maintenu, permet de spéculer que les effets dystrophiques que nous avons décelés avec BDNF et Erk_{1/2} pourraient passer par l'altération du transport axonal antérograde lent (Figure 10). Un scénario possible serait que la blessure du cristallin active le transport massif des protéines du cytosquelette (Figure 10, (1)), comme les NF qui sont requis pour la croissance axonale; BDNF/Erk_{1/2} phosphorylent les bras C-terminaux des NF (Figure 10, (2)) et créent ainsi leur détachement des moteurs de transport (kinésine) (Figure 10, (3)) au milieu des axones (Shea and Flanagan, 2001) (Figure 10, (4)); les phospho-NF engorgent l'axolemme et obstruent le passage des vésicules issues du transport antérograde rapide (Figure 10, (5)), provoquant ainsi l'hypertrophie des axones et le manque de croissance axonale. Ce modèle hypothétique expliquerait pourquoi l'administration de BDNF ou la blessure du cristallin, seule, ne sont pas génératrices de dystrophie axonale.

Les renflements axonaux hypertrophiques et l'hyperphosphorylation du cytosquelette sont caractéristiques de plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique. Différentes protéines du cytosquelette anormalement phosphorylées dans les neurones en dégénérescence telles que

Tau (Roder et al., 1993) et les neurofilaments (Veeranna et al., 1998) sont des substrats pour Erk_{1/2}. L'activation de Erk_{1/2} par l'influx calcique semble contrôler la phosphorylation des neurofilaments dans les cellules de l'hippocampe dans la maladie d'Alzheimer (Veeranna et al., 2004). L'apparition de renflements dystrophiques dans le nerf optique, que nous avons vus avec l'administration de BDNF et la blessure du cristallin, pourrait passer par des mécanismes cellulaires identiques à ceux des maladies neurodégénératives.

V.2.5.) La préservation du segment axonal dans la rétine par rapport à l'axone du nerf optique ?

Nous avons remarqué que l'apparition de renflements axonaux survenait spécifiquement dans le nerf optique mais pas dans la rétine après le traitement combiné de BDNF et de la blessure du cristallin (Article 2, Figures 6 et 7). Dans la pathologie du glaucome, on pense que l'augmentation de pression intraoculaire altère le transport axonal et mène aux dystrophies axonales. De façon remarquable, des structures dystrophiques remplies de vésicules et de mitochondries apparaissent dans la région de la lamina cribrosa (dans la tête du nerf optique) des nerfs optiques glaucomateux (Quigley, 1981; Morrison et al., 1997) alors que seuls des chapelets de varicosités sont observés dans la rétine (Zhou et al., 2005). Les axones présentent des changements ultrastructuraux lorsqu'ils passent de la rétine au nerf optique. Dans la rétine, les axones amyélinisés possèdent un diamètre plus faible et une densité de neurofilaments moins importante que les axones myélinisés dans le nerf optique (Sanchez et al., 2000). Par exemple, on pense que ces différences expliquent la plus grande vitesse de transport axonal de neurofilaments dans la rétine par rapport au nerf optique (Jung and Shea, 1999). Les variations structurelles à partir de la lamina cribrosa pourraient expliquer pourquoi l'axone est plus enclin à développer des renflements hypertrophiques dans le nerf optique.

Par ailleurs, Sawai et ses collaborateurs ont démontré que le BDNF stimule l'extension de branches collatérales de l'axone dans la rétine (Sawai et al., 1996). *In vitro*, le BDNF semble aussi capable de stimuler la croissance neuritique (Bonnet et al., 2004). Donc, le BDNF n'est pas un inhibiteur strict de la croissance neuritique. Il est intéressant de souligner que le BDNF a une action stimulatrice de la croissance axonale dans la partie intrarétinienne qui est exempte de dystrophie axonale importante. L'axone blessé ne semble

pas répondre de façon homogène à la blessure et à la stimulation des facteurs neurotrophiques sur toute sa longueur.

V.3.) La voie BDNF/CREB/ArgI/polyamines dans la mort excitotoxique des neurones adultes induite par le NMDA.

V.3.1.) Le manque de neuroprotection du BDNF contre l'excitotoxicité du NMDA.

Nous avons observé que le BDNF n'avait aucun effet neuroprotecteur dans notre modèle d'excitotoxicité induite par l'injection de NMDA (Article 3, Figure 4), alors que dans le modèle d'axotomie du nerf optique (Article 2, Figure 1), le BDNF est un puissant facteur de survie. Le rôle neuroprotecteur du BDNF semble étroitement lié au mode de blessure. Par exemple, l'axotomie déclenche la mort apoptotique des CGRs en activant les caspases (Garcia-Valenzuela and Sharma, 1999), même si une voie excitotoxique existe (Kikuchi et al., 2000). Les facteurs neurotrophiques, comme le BDNF, peuvent inhiber les mécanismes d'apoptose en bloquant la formation de l'apoptosome et en augmentant Bcl-2 dans la cellule (Introduction, Figure 7). Quant à la mort excitotoxique, les mécanismes de mort sont profondément influencés par la dose de NMDA. En effet, Bonfoco et ses collaborateurs ont rapporté qu'une dose faible de NMDA (300 μ M) déclenchait la mort apoptotique des neurones hippocampiques en culture via la cascade des caspases (Bonfoco et al., 1995). En revanche, la même étude a démontré qu'une forte dose de NMDA (2 mM) induisait la mort neuronale surtout par la nécrose qui est caractérisée par le gonflement rapide et la lyse des cellules. Par ailleurs, dans notre modèle d'excitotoxicité, la vitesse de mort induite par l'injection de NMDA dans l'œil est nettement plus rapide que la mort initiée par la transection du nerf optique. À titre de comparaison, plus de 70% de CGRs sont tuées 24h après l'injection de NMDA (5 mM) (Article 3, Figure 2) alors qu'il faut attendre \sim 7 jours après l'axotomie pour voir l'élimination de plus de 50% des CGRs (Article 1, Figure 5). Il est donc possible que la mort déclenchée par l'injection de NMDA passe par des mécanismes de mort rapides et indépendants de l'apoptose sur lesquels le BDNF n'a aucun moyen d'agir (Figure 9).

En outre, la voie PI-3K/Akt a été récemment impliquée dans la mort excitotoxique activée par le NMDA. L'inhibition pharmacologique de la voie PI-3K accentue la toxicité du NMDA sur les CGRs (Manabe and Lipton, 2003; Nakazawa et al., 2005). Dans ces

conditions, on pourrait s'attendre à une action neuroprotectrice de la part du BDNF qui est un activateur puissant de P-Akt dans la rétine (Nakazawa et al., 2002) (Figure 9). Cependant, là encore, il faut souligner que l'inhibition d'Akt n'augmente la mort qu'à des concentrations relativement faibles de NMDA (2 mM), mais qu'à une dose plus forte (40 mM), Akt n'influence plus la survie des CGRs (Manabe and Lipton, 2003). Dans notre étude, peut être qu'une dose plus faible de NMDA aurait mené à des effets neuroprotecteurs du BDNF par l'activation d'Akt.

V.3.2.) L'exacerbation de la toxicité du NMDA par les polyamines.

Dans le troisième article de la thèse, nous avons testé la contribution des polyamines à la mort excitotoxique induite par le NMDA. Des études antérieures ont suggéré que le blocage du site de liaison des polyamines sur les NMDAR était neuroprotecteur dans la rétine (Kapin et al., 1999; Pang et al., 1999). En utilisant un bloqueur de la synthèse des polyamines, le DFMO, nous avons voulu déterminer la contribution globale des polyamines à la mort excitotoxique des CGRs adultes après l'injection intraoculaire de NMDA. Le DFMO augmentait la survie des CGRs de plus de 100% après l'injection de NMDA, alors que l'injection des polyamines spermine et putrescine amplifiait les effets de mort du NMDA. D'après nos résultats, les polyamines endogènes exacerbent la mort déclenchée par le NMDA mais ne sont pas, à elles seules, toxiques sur les CGRs (Article 3, Figure 6).

Les polyamines sont rapidement augmentées après une ischémie ou un traumatisme cérébral (Paschen et al., 1988; Shohami et al., 1992). L'inhibition de la synthèse des polyamines par le DFMO réduit très significativement l'étendue des dommages cérébraux (Kish et al., 1991; Shohami et al., 1992; Zoli et al., 1993). L'injection intraoculaire de NMDA représente un modèle sévère de mort excitotoxique où le DFMO a été capable de protéger les CGRs. Nos résultats nous encouragent donc à penser que l'inhibition des polyamines est une stratégie neuroprotectrice potentielle contre certains dommages ischémiques dans le SNC.

V.3.3.) Mode d'action des polyamines dans la rétine.

Le blocage des sites de liaison des polyamines sur les récepteurs au NMDA n'a eu qu'un effet modeste sur la survie comparativement au DFMO (Article 3, Figure 7). Ceci

suggère que les polyamines influencent la mort excitotoxique en facilitant l'activation des récepteurs NMDAR mais aussi que d'autres mécanismes sont impliqués dans leur action. Après avoir observé la diminution de la production intracellulaire d'oxyde nitrique avec le DFMO, Ientile et collaborateurs (1999) en ont déduit que les polyamines régulaient la synthèse de NO dans les cellules de la rétine. Cependant, on ne sait pas si les polyamines régulent la synthèse de NO en contrôlant le flux calcique à travers les NMDAR ou en agissant intracellulairement sur l'activation de NOS (Figure 9B). De plus, les polyamines sont capables d'interagir avec les voies de signalisation. Notamment, la putrescine pourrait activer les gènes précoces c-jun et c-fos qui sont impliqués dans l'apoptose des CGRs (Hull and Bahr, 1994; Bachrach et al., 2001; Lingor et al., 2005). Par conséquent, nos données indiquent que les polyamines pourraient agir sur les mécanismes de mort via les NMDAR et les voies de signalisation.

V.3.4.) L'expression des polyamines dans la rétine.

Après l'injection de NMDA ou l'administration de BDNF, nous n'avons pas détecté de changement du niveau protéique d'arginase I dans des homogénats de rétine. Donc, contrairement à la cascade de signalisation décrite par le laboratoire du Dr Filbin, le BDNF ne stimule pas la transcription de l'arginase I dans la rétine. Cette observation est cohérente avec le manque d'effets du BDNF sur la mort excitotoxique que nous avons trouvé (Article 3, Figure 4). Selon nos résultats avec les polyamines (Article 3, Figures 5-6), l'augmentation de l'arginase I par le BDNF aurait aggravé la mort causée par le NMDA. Par ailleurs, les neurones utilisés par Filbin étaient prélevés sur de jeunes animaux (P5) (Cai et al., 2002). Il est alors possible que la régulation de la synthèse des polyamines évolue au cours du développement et que chez l'adulte l'expression de l'arginase I devienne indépendante du BDNF.

Par immunohistochimie, nous avons observé une augmentation d'arginase I dans les corps cellulaires et les prolongements des cellules de Müller après l'injection de NMDA (Article 3, Figure 3). Précédemment, la synthèse des polyamines avait été démontrée sur des cultures de cellules de Müller (Biedermann et al., 1998). La stimulation des cellules de Müller par le NMDA pourrait induire la libération de polyamines, contribuant indirectement à la mort des CGRs.

V.4.) Orientations futures.

Nous avons observé que Erk_{1/2} était une voie capable d'activer la survie des CGRs axotomisées. Cependant, nous n'avons pas testé les effets de l'activation d'Akt sur la survie pour relativiser l'importance de la voie Erk_{1/2} dans les mécanismes de survie induits par les neurotrophines comme le BDNF. Pourtant, les deux voies de signalisation peuvent potentiellement inhiber l'apoptose et activer la survie neuronale. De façon similaire à ce qui a été fait pour activer Erk_{1/2} avec MEK-ca dans cette thèse, Akt pourrait être activée par une forme constitutivement active de PI-3K qui a été utilisée précédemment *in vitro* (Markus et al., 2002). Les effets de la voie PI-3K/Akt sur la survie et la régénération axonale des CGRs pourraient être étudiés *in vivo*. Par ailleurs, les gènes encodant les formes constitutivement actives des intermédiaires de la voie Erk₅ (MEK5-ca, MEF2C-ca) pourraient aussi être utilisés dans notre modèle de blessures du système rétinocolliculaire.

Une hypothèse que j'ai avancée pour tenter d'expliquer les effets non durables d'Erk_{1/2} sur la survie des CGRs est la perte de translocation d'Erk_{1/2} dans le noyau. L'abolition de la transcription des gènes de survie (e.g. Bcl2) par Erk_{1/2} dans le noyau favoriserait l'action des molécules pro-apoptotiques et la progression de la mort après la blessure. La localisation d'Erk_{1/2} pourrait être suivie après et avant la blessure du nerf optique dans des rétines infectées avec MEK-ca par microscopie confocale sur des tranches de rétines. Si cette hypothèse s'avère vraie, en activant simultanément Erk_{1/2} et l'AMPC dans les cellules (avec la forskoline ou un analogue non hydrolysable de l'AMPC, le db-AMPC), nous pourrions rétablir la translocation nucléaire d'Erk_{1/2} dans les CGRs blessées et regarder les effets de ce traitement combiné sur la survie neuronale.

Je pense que le rôle des gènes de transcription en aval d'Erk_{1/2} comme CREB pourraient aussi être directement testé sur la survie neuronale. Dans le laboratoire du Dr Filbin, la forme constitutivement active de CREB a été utilisée sur la moelle épinière blessée (Gao et al., 2004). Malheureusement, les auteurs de cette étude ont utilisé un adénovirus qui ne cible pas spécifiquement une population neuronale et qui ne permet pas une expression à long terme du transgène. De plus, la survie n'a pas été étudiée par cette équipe. Notre modèle semble plus adéquat pour tester CREB sur la survie neuronale, de par la sélectivité de l'infection des CGRs par l'AAV et l'expression à long terme du gène recombinant.

Nous avons trouvé que le BDNF induisait la dystrophie des axones du nerf optique après une axotomie. De manière très intéressante, nous avons récemment observé que l'activation seule, et à long terme (>4 mois), d'Erk_{1/2} engendrait la dystrophie des axones dans des nerfs optiques non blessés. Ces premières observations mériteraient d'être approfondies en regardant les protéines du cytosquelette qui sont des substrats de phosphorylation pour Erk_{1/2} et qui sont impliquées dans l'architecture axonale comme les sous-unités des neurofilaments, et particulièrement NF-H. Il serait également très intéressant de savoir si cette dystrophie des axones cause la mort des CGRs à long terme. À ma connaissance, nos observations sont les premières à montrer que P-Erk_{1/2} peut provoquer directement la dystrophie des axones *in vivo*. Notre modèle présente donc un grand intérêt pour l'étude des pathologies neurodégénératives.

Mes données de thèse montrent que les polyamines régulent la mort induite par les NMDAR. La partie d'excitotoxicité qui intervient dans les mécanismes de mort des CGRs après une blessure du nerf optique pourrait être influencée par la production des polyamines endogènes (l'arginase I est retrouvée dans les CGRs des rétines intactes dans le 3^{ème} article de la thèse). Par exemple, nous pourrions regarder si le DFMO diminue la mort des CGRs après l'axotomie. À l'inverse, la synthèse des polyamines pourrait être activée en augmentant l'expression de l'arginase I dans les CGRs grâce à un AAV.

V.5.) Conclusion générale.

Nous avons démontré pour la première fois qu'*in vivo* la voie Erk_{1/2} stimulait directement la survie des cellules ganglionnaires de la rétine adulte, alors que l'activation de P-Erk_{1/2} n'était pas suffisante pour induire la croissance axonale dans le nerf optique. Cette partie de la thèse indique que la voie Erk_{1/2} est une voie de signalisation qui, indépendamment des autres voies comme PI-3K, Erk₅ ou PLC- γ , peut être manipulée pour protéger les neurones après une blessure du SNC.

Des études antérieures suggéraient que le BDNF n'activait pas la régénération dans le nerf optique par manque d'effet sur les mécanismes de croissance axonale. Dans cette thèse, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la combinaison de facteurs stimulant individuellement la survie (BDNF) et la croissance axonale (blessure du cristallin) pourrait améliorer la régénération des neurones blessés *in vivo*. De manière très inattendue, nous

avons observé que le BDNF altérait les mécanismes de régénération axonale et provoquait la dystrophie des axones. Nos résultats remettent complètement en question le rôle du BDNF dans la régénération axonale du SNC. Ces observations sont d'autant plus surprenantes que, dans le même temps, le BDNF combiné à la blessure du cristallin exerce des effets synergiques sur la survie. D'autres études seront nécessaires pour établir les mécanismes responsables de la dystrophie et de l'inhibition de la croissance axonale, afin d'envisager de coordonner les processus de régénération axonale et de survie neuronale dans le SNC adulte blessé.

Les effets neuroprotecteurs du BDNF ont été abondamment documentés dans le modèle de blessure du nerf optique, mais très peu d'études se sont penchées sur les effets du BDNF sur l'excitotoxicité induite par le NMDA. Pour cette raison, nous avons cherché à savoir si le BDNF, seul ou via l'activation des polyamines, influençait la mort induite par l'injection vitréenne de NMDA. Dans le troisième volet de la thèse, nous avons trouvé que le BDNF ne stimulait pas la survie neuronale dans le modèle d'excitotoxicité du NMDA. Nos résultats démontrent que, contrairement à ce qui a été montré *in vitro*, le BDNF n'est pas capable d'activer la synthèse des polyamines en contrôlant l'expression de l'arginase I chez des neurones adultes. En revanche, nous avons découvert que l'inhibition de la synthèse des polyamines par le DFMO protégeait les CGRs de la mort neuronale. Nos données suggèrent donc que l'efficacité des neurotrophines dans la survie neuronale est conditionnée par les modalités de blessure.

Le BDNF a souvent été considéré comme un agent neuroprotecteur omnipotent dans les blessures du SNC. Les données de cette thèse montrent cependant que les effets de survie du BDNF ne sont pas applicables à tous les types de blessures (comme ceux impliquant l'excitotoxicité via le NMDAR) et que le BDNF peut s'avérer inhibiteur sur la croissance axonale. La modulation des voies intracellulaires spécifiquement impliquées dans les mécanismes de mort représente une manière plus ciblée d'activer la survie neuronale dans le SNC blessé.

RÉFÉRENCES.

- Aguayo AJ, Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP, Bray GM (1987) Growth and connectivity of axotomized retinal neurons in adult rats with optic nerves substituted by PNS grafts linking the eye and the midbrain. *Ann N Y Acad Sci* 495:1-9.
- Angelucci A, Clasca F, Sur M (1996) Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J Neurosci Methods* 65:101-112.
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393:805-809.
- Arevalo JC, Yano H, Teng KK, Chao MV (2004) A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *Embo J* 23:2358-2368.
- Arevalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, Chao MV (2006) Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 281:1001-1007.
- Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR (2000) The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 27:265-277.
- Avwenagha O, Campbell G, Bird MM (2003) The outgrowth response of the axons of developing and regenerating rat retinal ganglion cells in vitro to neurotrophin treatment. *J Neurocytol* 32:1055-1075.
- Bachrach U, Wang YC, Tabib A (2001) Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol Sci* 16:106-109.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* 1:549-553.
- Benfey M, Aguayo AJ (1982) Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature* 296:150-152.
- 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.

- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates *trk* and *trkB*. *Neuron* 7:857-866.
- 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.
- 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.
- Biedermann B, Skatchkov SN, Brunk I, Bringmann A, Pannicke T, Bernstein HG, Faude F, Germer A, Veh R, Reichenbach A (1998) Spermine/spermidine is expressed by retinal glial (Muller) cells and controls distinct K⁺ channels of their membrane. *Glia* 23:209-220.
- Birgbauer E, Cowan CA, Sretavan DW, Henkemeyer M (2000) Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development* 127:1231-1241.
- Birgbauer E, Oster SF, Severin CG, Sretavan DW (2001) Retinal axon growth cones respond to EphB extracellular domains as inhibitory axon guidance cues. *Development* 128:3041-3048.
- 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.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7162-7166.
- Bonnet D, Garcia M, Vecino E, Lorentz JG, Sahel J, Hicks D (2004) Brain-derived neurotrophic factor signalling in adult pig retinal ganglion cell neurite regeneration in vitro. *Brain Res* 1007:142-151.

- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362.
- 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.
- Brandstatter JH, Hartveit E, Sassoe-Pognetto M, Wassle H (1994) Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci* 6:1100-1112.
- 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.
- Brittis PA, Silver J (1995) Multiple factors govern intraretinal axon guidance: a time-lapse study. *Mol Cell Neurosci* 6:413-432.
- Brittis PA, Canning DR, Silver J (1992) Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science* 255:733-736.
- Brittis PA, Lemmon V, Rutishauser U, Silver J (1995) Unique changes of ganglion cell growth cone behavior following cell adhesion molecule perturbations: a time-lapse study of the living retina. *Mol Cell Neurosci* 6:433-449.
- Brown J, Bridgman PC (2003) Role of myosin II in axon outgrowth. *J Histochem Cytochem* 51:421-428.
- Brown NL, Patel S, Brzezinski J, Glaser T (2001) Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation. *Development* 128:2497-2508.
- Brown NL, Kanekar S, Vetter ML, Tucker PK, Gemza DL, Glaser T (1998) Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis. *Development* 125:4821-4833.
- Butowt R, von Bartheld CS (2005) Anterograde axonal transport of BDNF and NT-3 by retinal ganglion cells: roles of neurotrophin receptors. *Mol Cell Neurosci* 29:11-25.
- 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.
- Cai D, Deng K, Mellado W, Lee J, Ratan RR, Filbin MT (2002) Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth MAG and myelin in vitro. *Neuron* 35:711-719.
- Campbell DS, Holt CE (2003) Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron* 37:939-952.
- Cao W, Wen R, Li F, Lavail MM, Steinberg RH (1997) Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina. *Exp Eye Res* 65:241-248.
- 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.
- Cavanaugh JE, Ham J, Hetman M, Poser S, Yan C, Xia Z (2001) Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons. *J Neurosci* 21:434-443.
- Cayouette M, Whitmore AV, Jeffery G, Raff M (2001) Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium. *J Neurosci* 21:5643-5651.
- Cellerino A, Kohler K (1997) Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor *trkb* is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina. *J Comp Neurol* 386:149-160.
- Cellerino A, Carroll P, Thoenen H, Barde YA (1997) Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* 9:397-408.
- Cenni MC, Bonfanti L, Martinou JC, Ratto GM, Strettoi E, Maffei L (1996) Long-term survival of retinal ganglion cells following optic nerve section in adult *bcl-2* transgenic mice. *Eur J Neurosci* 8:1735-1745.
- Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:589-595.

- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309.
- Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M (2003) The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113:11-23.
- Chen H, Weber AJ (2001) BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:966-974.
- Chen H, Weber AJ (2002) Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Muller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor. *Glia* 38:115-125.
- Chen TJ, Gehler S, Shaw AE, Bamburg JR, Letourneau PC (2005) Cdc42 participates in the regulation of ADF/cofilin and retinal growth cone filopodia by brain derived neurotrophic factor. *J Neurobiol* 7:7.
- Cheng L, Sapielha 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.
- Cheung ZH, Chan YM, Siu FK, Yip HK, Wu W, Leung MC, So KF (2004) Regulation of caspase activation in axotomized retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 25:383-393.
- 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.
- Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7:357-368.
- Crowder RJ, Freeman RS (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 18:2933-2943.
- Cui Q, Harvey AR (1995) At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats. *J Neurosci* 15:8143-8155.
- Cui Q, Harvey AR (2000) CNTF promotes the regrowth of retinal ganglion cell axons into murine peripheral nerve grafts. *Neuroreport* 11:3999-4002.

- 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.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.
- 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, Bouchard C, Tsatas O, Giftochristos N (1990) Macrophages can modify the nonpermissive nature of the adult mammalian central nervous system. *Neuron* 5:463-469.
- Davies AM, Thoenen H, Barde YA (1986) The response of chick sensory neurons to brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 6:1897-1904.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6368-6371.
- Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 13:2651-2661.
- Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW (1997) Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19:575-589.
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nuñez G (1997) Interleukin-2 induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-689.
- Delisle MB, Carpenter S (1984) Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 63:241-250.
- 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.
- 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 Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3978-3983.
- Di Polo A, Cheng L, Bray GM, Aguayo AJ (2000) Co-localization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green/red-sensitive cone outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41.
- Dieterich DC, Trivedi N, Engelmann R, Gundelfinger ED, Gordon-Weeks PR, Kreutz MR (2002) Partial regeneration and long-term survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush is accompanied by altered expression, phosphorylation and distribution of cytoskeletal proteins. *Eur J Neurosci* 15:1433-1443.
- Dimitropoulou A, Bixby JL (2000) Regulation of retinal neurite growth by alterations in MAPK/ERK kinase (MEK) activity. *Brain Res* 858:205-214.
- Ding J, Hu B, Tang LS, Yip HK (2001) Study of the role of the low-affinity neurotrophin receptor p75 in naturally occurring cell death during development of the rat retina. *Dev Neurosci* 23:390-398.
- Dolcet X, Egea J, Soler RM, Martin-Zanca D, Comella JX (1999) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival. *J Neurochem* 73:521-531.
- 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.
- Drager UC (1985) Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 224:57-77.
- 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. Epub 2003 Jul 2003.
- Dudus L, Anand V, Acland GM, Chen S-J, Wilson JM, Fisher KJ, Maguire AM, Bennett J (1999) Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV. *Vis Res* 39:2545-2553.

- Dzietko M, Felderhoff-Mueser U, Siffringer M, Krutz B, Bittigau P, Thor F, Heumann R, Buhner C, Ikonomidou C, Hansen HH (2004) Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 15:177-187.
- Eimerl S, Schramm M (1991) Acute glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells: agonist potency, effects of pH, Zn²⁺ and the potentiation by serum albumin. *Brain Res* 560:282-290.
- Erkman L, Yates PA, McLaughlin T, McEvelly RJ, Whisenhunt T, O'Connell SM, Krones AI, Kirby MA, Rapaport DH, Bermingham JR, O'Leary DD, Rosenfeld MG (2000) A POU domain transcription factor-dependent program regulates axon pathfinding in the vertebrate visual system. *Neuron* 28:779-792.
- Erskine L, Williams SE, Brose K, Kidd T, Rachel RA, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Mason CA (2000) Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of *robo* and *slits*. *J Neurosci* 20:4975-4982.
- 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, Petkova V, Thanos S, Benowitz LI (2004) Switching Mature Retinal Ganglion Cells to a Robust Growth State In Vivo: Gene Expression and Synergy with RhoA Inactivation. *J Neurosci* 24:8726-8740.
- Fletcher EL, Hack I, Brandstatter JH, Wassle H (2000) Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol* 420:98-112.
- Forcet C, Stein E, Pays L, Corset V, Llambi F, Tessier-Lavigne M, Mehlen P (2002) Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* 417:443-447.
- 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 (2002) Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin. *J Neurosci* 22:8876-8883.
- Fournier AE, Beer J, Arregui CO, Essagian C, Aguayo AJ, McKerracher L (1997) Brain-derived neurotrophic factor modulates GAP-43 but not Ta1 expression in injured retinal ganglion cells of adult rats. *J Neurosci Res* 47:561-572.
- Frade JM, Barde YA (1998) Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 20:35-41.
- Frade JM, Bovolenta P, Rodriguez-Tebar A (1999) Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc Res Tech* 45:243-251.
- Frost DO, Ma YT, Hsieh T, Forbes ME, Johnson JE (2001) Developmental changes in BDNF protein levels in the hamster retina and superior colliculus. *J Neurobiol* 49:173-187.
- Fukuda M, Gotoh I, Gotoh Y, Nishida E (1996) Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem* 271:20024-20028.
- Gallagher MJ, Huang H, Pritchett DB, Lynch DR (1996) Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 271:9603-9611.
- Gallo G, Letourneau PC (2000) Neurotrophins and the dynamic regulation of the neuronal cytoskeleton. *J Neurobiol* 44:159-173.
- Gan L, Wang SW, Huang Z, Klein WH (1999) POU domain factor Brn-3b is essential for retinal ganglion cell differentiation and survival but not for initial cell fate specification. *Dev Biol* 210:469-480.
- 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 (1999) Lamina restriction of retinal macrophagic response to optic nerve axotomy in the rat. *J Neurobiol* 40:55-66.
- Gehler S, Gallo G, Veien E, Letourneau PC (2004a) p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity. *J Neurosci* 24:4363-4372.
- Gehler S, Shaw AE, Sarmiere PD, Bamberg JR, Letourneau PC (2004b) Brain-derived neurotrophic factor regulation of retinal growth cone filopodial dynamics is mediated through actin depolymerizing factor/cofilin. *J Neurosci* 24:10741-10749.
- Goldberg DJ, Burmeister DW (1986) Stages in axon formation: observations of growth of *Aplysia* axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *J Cell Biol* 103:1921-1931.
- Goldberg JL (2004) Intrinsic neuronal regulation of axon and dendrite growth. *Curr Opin Neurobiol* 14:551-557.
- 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.
- 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.
- Grewal S, York R, Stork P (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9:544-553.
- Grunder T, Kohler K, Kaletta A, Guenther E (2000) The distribution and developmental regulation of NMDA receptor subunit proteins in the outer and inner retina of the rat. *J Neurobiol* 44:333-342.
- Guy J, Muzyczka N, Hauswirth W (1999) Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve. *Arch Ophthalmol* 117:929-937.
- Hallbook F, Ibanez CF, Persson H (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6:845-858.

- Hansen HH, Briem T, Dzierko M, Sifringer M, Voss A, Rzeski W, Zdzisinska B, Thor F, Heumann R, Stepulak A, Bittigau P, Ikonomidou C (2004) Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 16:440-453.
- 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.
- 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.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- Herrera E, Brown L, Aruga J, Rachel RA, Dolen G, Mikoshiba K, Brown S, Mason CA (2003) *Zic2* patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell* 114:545-557.
- Herzog K-H, von Bartheld CS (1998) Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. *J Neurosci* 18:2891-2906.
- Hetman M, Gozdz A (2004) Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem* 271:2050-2055.
- Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z (1999) Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 274:22569-22580.
- Heumann R, Goemans C, Bartsch D, Lingenhohl K, Waldmeier PC, Hengerer B, Allegrini PR, Schellander K, Wagner EF, Arendt T, Kamdem RH, Obst-Pernberg K, Narz F, Wahle P, Berns H (2000) Transgenic activation of Ras in neurons promotes hypertrophy and protects from lesion-induced degeneration. *J Cell Biol* 151:1537-1548.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344:339-341.

- Hu B, Yip HK, So K-F (1998) Localization of p75 neurotrophin receptor in the retina of the adult SD rat: an immunocytochemical study at the light and electronmicroscopic levels. *Glia* 24:187-197.
- Hu B, Yip HK, So KF (1999) Expression of p75 neurotrophin receptor in the injured and regenerating retina. *Neuroreport* 10:1293-1297.
- Hu M, Easter SS (1999) Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev Biol* 207:309-321.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- 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.
- Hull M, Bahr M (1994) Regulation of immediate-early gene expression in rat retinal ganglion cells after axotomy and during regeneration through a peripheral nerve graft. *J Neurobiol* 25:92-105.
- Husson I, Rangon CM, Lelievre V, Bemelmans AP, Sachs P, Mallet J, Kosofsky BE, Gressens P (2005) BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cereb Cortex* 15:250-261. Epub 2004 Jul 2021.
- Ientile R, Pedale S, Ginoprelli T, Cannavo L, Macaione S (1999) Intracellular polyamine levels are involved in NMDA-evoked nitric oxide production in chick retina cells. *J Neurochem* 72:1744-1749.
- Ikonomidou C, Stefovskaja V, Turski L (2000) Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12885-12890.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283:70-74.
- Ingolia NA, Sharma SC, Pilchman J, Baranowski K, Sturman JA (1982) Axonal transport and transcellular transfer of nucleosides and polyamines in intact and regenerating optic nerves of goldfish: speculation on the axonal regulation of periaxonal cell metabolism. *J Neurosci* 2:1412-1423.

- 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, Cellierino A (2003) Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog Retin Eye Res* 22:483-543.
- Isenmann S, Cellierino A, Gravel C, Bahr M (1999) Excess target-derived brain-derived neurotrophic factor preserves the transient uncrossed retinal projection to the superior colliculus. *Mol Cell Neurosci* 14:52-65.
- 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.
- Izumi Y, Kirby-Sharkey CO, Benz AM, Labruyere J, Price MT, Wozniak DF, Zorumski CF, Olney JW (1995) Age dependent sensitivity of the rat retina to the excitotoxic action of N-methyl-D-aspartate. *Neurobiol Dis* 2:139-144.
- Jeffery G, Erskine L (2005) Variations in the architecture and development of the vertebrate optic chiasm. *Prog Retin Eye Res* 24:721-753.
- Jelsma TN, Friedman HH, Berkelaar M, Bray GM, Aguayo AJ (1993) Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *J Neurobiol* 24:1207-1214.
- Johnson JE, Barde Y-A, Schwab M, Thoenen H (1986) Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 6:3031-3038.
- Jung C, Shea TB (1999) Regulation of neurofilament axonal transport by phosphorylation in optic axons in situ. *Cell Motil Cytoskeleton* 42:230-240.
- Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E (1999) Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* 274:26563-26571.
- Kapin MA, Doshi R, Scatton B, DeSantis LM, Chandler ML (1999) Neuroprotective effects of eliprodil in retinal excitotoxicity and ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1177-1182.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-391.

- Kashii S, Takahashi M, Mandai M, Shimizu H, Honda Y, Sasa M, Ujihara H, Tamura Y, Yokota T, Akaike A (1994) Protective action of dopamine against glutamate neurotoxicity in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:685-695.
- 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.
- 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.
- Kew JN, Kemp JA (1998) An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurones. *J Physiol* 512:17-28.
- Kido N, Tanihara H, Honjo M, Inatani M, Tatsuno T, Nakayama C, Honda Y (2000) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death. *Brain Res* 884:59-67.
- Kikuchi M, Tenneti L, Lipton SA (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 20:5037-5044.
- Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Ujihara H, Sasa M, Tamura Y, Akaike A (1995) Protective action of zinc against glutamate neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2048-2053.
- Kinkl N, Sahel J, Hicks D (2001) Alternate FGF2-ERK1/2 signaling pathways in retinal photoreceptor and glial cells in vitro. *J Biol Chem* 276:43871-43878. Epub 42001 Sep 43824.
- Kish SJ, Wilson JM, Fletcher PJ (1991) The polyamine synthesis inhibitor alpha-difluoromethylornithine is neuroprotective against N-methyl-D-aspartate-induced brain damage in vivo. *Eur J Pharmacol* 209:101-103.
- Kitaoka Y, Kumai T, Kitaoka Y, Lam TT, Munemasa Y, Isenoumi K, Motoki M, Kuribayashi K, Kogo J, Kobayashi S, Ueno S (2004) Nuclear factor-kappa B p65 in NMDA-induced retinal neurotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res* 131:8-16.
- 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.

- Klocker N, Kermer P, Gleichmann M, Weller M, Bahr M (1999) Both the neuronal and inducible isoforms contribute to upregulation of retinal nitric oxide synthase activity by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19:8517-8527.
- Klocker N, Kermer P, Weishaupt JH, Labes M, Ankerhold R, Bahr M (2000) Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B signaling. *J Neurosci* 20:6962-6967.
- Knoll B, Drescher U (2002) Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* 25:145-149.
- Kolpak A, Zhang J, Bao ZZ (2005) Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J Neurosci* 25:3432-3441.
- 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.
- Kume T, Kouchiyama H, Kaneko S, Maeda T, Kaneko S, Akaike A, Shimohama S, Kihara T, Kimura J, Wada K, Koizumi S (1997) BDNF prevents NO mediated glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res* 756:200-204.
- La Vail MM, Rapaport DH, Rakic P (1991) Cytogenesis in the monkey retina. *J Comp Neurol* 309:86-114.
- Laabich A, Cooper NG (1999) Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the adult rat retina is mediated by ionotropic glutamate receptors. *Exp Eye Res* 68:703-713.
- Laabich A, Cooper NG (2000) Neuroprotective effect of AIP on N-methyl-D-aspartate-induced cell death in retinal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 85:32-40.
- Laabich A, Li G, Cooper NG (2000) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II containing a nuclear localizing signal is altered in retinal neurons exposed to N-methyl-D-aspartate. *Brain Res Mol Brain Res* 76:253-265.
- Laabich A, Li G, Cooper NG (2001) Characterization of apoptosis-genes associated with NMDA mediated cell death in the adult rat retina. *Brain Res Mol Brain Res* 91:34-42.

- Lanier LM, Gates MA, Witke W, Menzies AS, Wehman AM, Macklis JD, Kwiatkowski D, Soriano P, Gertler FB (1999) Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* 22:313-325.
- 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.
- 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.
- Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 69:341-374.
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 37:1154-1162.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 116:321-361.
- Levi-Montalcini R, Cohen S (1956) In vitro and in vivo Effects of a Nerve Growth-Stimulating Agent Isolated from Snake Venom. *Pnas* 42:695-699.
- Levi-Montalcini R, Cohen S (1960) Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Ann N Y Acad Sci* 85:324-341.
- Lewis GP, Fisher SK (2003) Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 230:263-290.
- Li X, Saint-Cyr-Proulx E, Aktories K, Lamarche-Vane N (2002) Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277:15207-15214. Epub 12002 Feb 15213.
- Lin CH, Espreafico EM, Mooseker MS, Forscher P (1996) Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron* 16:769-782.

- Lindsay RM, Thoenen H, Barde YA (1985) Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor. *Dev Biol* 112:319-328.
- Lingor P, Koeberle P, Kugler S, Bahr M (2005) Down-regulation of apoptosis mediators by RNAi inhibits axotomy-induced retinal ganglion cell death in vivo. *Brain* 128:550-558.
- Lipton SA (2003) Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Surv Ophthalmol* 48:S38-46.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613-622.
- 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 L, Cavanaugh JE, Wang Y, Sakagami H, Mao Z, Xia Z (2003) ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8532-8537.
- Liu YZ, Boxer LM, Latchman DS (1999) Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res* 27:2086-2090.
- Livesey FJ, Cepko CL (2001) Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2:109-118.
- 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.
- Lorber B, Hendriks WJ, Van der Zee CE, Berry M, Logan A (2005) Effects of LAR and PTP-BL phosphatase deficiency on adult mouse retinal cells activated by lens injury. *Eur J Neurosci* 21:2375-2383.
- Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58:193-201.
- Ludwin SK (1990) Phagocytosis in the rat optic nerve following Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 80:266-273.

- Ma YT, Hsieh T, Forbes ME, Johnson JE, Frost DO (1998) BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. *J Neurosci* 18:2097-2107.
- Malik AK, Monahan PE, Allen DL, Chen BG, Samulski RJ, Kurachi K (2000) Kinetics of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer. *J Virol* 74:3555-3565.
- Manabe S, Lipton SA (2003) Divergent NMDA signals leading to proapoptotic and antiapoptotic pathways in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:385-392.
- Mandemakers WJ, Barres BA (2005) Axon regeneration: it's getting crowded at the gates of TROY. *Curr Biol* 15:R302-305.
- Mandolesi G, Menna E, Harauzov A, von Bartheld CS, Caleo M, Maffei L (2005) A role for retinal brain-derived neurotrophic factor in ocular dominance plasticity. *Curr Biol* 15:2119-2124.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, 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 USA* 91:1632-1636.
- Markus A, Zhong J, Snider WD (2002) Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* 35:65-76.
- Markwell MA, Berger SP, Paul SM (1990) The polyamine synthesis inhibitor alpha-difluoromethylornithine blocks NMDA-induced neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 182:607-609.
- Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F, Gruss P (2001) Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105:43-55.
- McCabe KL, Gunther EC, Reh TA (1999) The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation. *Development* 126:5713-5724.
- McKerracher L, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ (1990a) Slow transport rates of cytoskeletal proteins change during regeneration of axotomized retinal neurons in adult rats. *J Neurosci* 10:641-648.

- McKerracher L, Vidal-Sanz M, Essagian C, Aguayo AJ (1990b) 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.
- Meakin SO, MacDonald JI, Gryz EA, Kubu CJ, Verdi JM (1999) The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 274:9861-9870.
- Menna E, Cenni MC, Naska S, Maffei L (2003) The anterogradely transported BDNF promotes retinal axon remodeling during eye specific segregation within the LGN. *Mol Cell Neurosci* 24:972-983.
- 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.
- Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15:805-819.
- Meyer-Franke A, Wilkinson A, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Reichardt LF, Barres BA (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21:681-693.
- 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. Epub 2004 Feb 2015.
- Miller FD, Kaplan DR (2001) Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 58:1045-1053.
- 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.

- Ming GL, Wong ST, Henley J, Yuan XB, Song HJ, Spitzer NC, Poo MM (2002) Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* 417:411-418.
- Mody N, Leitch J, Armstrong C, Dixon J, Cohen P (2001) Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Lett* 502:21-24.
- Monnier PP, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, Mann M, Flad M, Hornberger MR, Stahl B, Bonhoeffer F, Mueller BK (2002) RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature* 419:392-395.
- Morizane C, Adachi K, Furutani I, Fujita Y, Akaike A, Kashii S, Honda Y (1997) N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester protects retinal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Pharmacol* 328:45-49.
- Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, Jia L (2005) Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog Retin Eye Res* 24:217-240.
- Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC (1997) A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 64:85-96.
- Mu X, Klein WH (2004) A gene regulatory hierarchy for retinal ganglion cell specification and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 15:115-123.
- Nakazawa T, Tamai M, Mori N (2002) Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3319-3326.
- Nakazawa T, Shimura M, Endo S, Takahashi H, Mori N, Tamai M (2005) N-Methyl-D-Aspartic acid suppresses Akt activity through protein phosphatase in retinal ganglion cells. *Mol Vis* 11:1173-1182.
- Neumann CJ, Nusslein-Volhard C (2000) Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* 289:2137-2139.
- Newman E, Reichenbach A (1996) The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19:307-312.
- Nikulina E, Tidwell JL, Dai HN, Bregman BS, Filbin MT (2004) The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8786-8790. Epub 2004 Jun 8781.

- Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier-Lavigne M, Poo MM, Hong K (2003) Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 423:990-995.
- Ohguro H, Katsushima H, Maruyama I, Maeda T, Yanagihashi S, Metoki T, Nakazawa M (2002) A high dietary intake of sodium glutamate as flavoring (ajinomoto) causes gross changes in retinal morphology and function. *Exp Eye Res* 75:307-315.
- Okada T, Ichikawa M, Tokita Y, Horie H, Saito K, Yoshida J, Watanabe M (2005) Intravitreal macrophage activation enables cat retinal ganglion cells to regenerate injured axons into the mature optic nerve. *Exp Neurol* 196:153-163.
- Oppenheim RW (1989) The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* 12:252-255.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J (2004) Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 23:91-147.
- Oster SF, Deiner M, Birgbauer E, Sretavan DW (2004) Ganglion cell axon pathfinding in the retina and optic nerve. *Semin Cell Dev Biol* 15:125-136.
- Pang IH, Wexler EM, Nawy S, DeSantis L, Kapin MA (1999) Protection by eliprodil against excitotoxicity in cultured rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1170-1176.
- Park CK, Nehls DG, Graham DI, Teasdale GM, McCulloch J (1988) Focal cerebral ischaemia in the cat: treatment with the glutamate antagonist MK-801 after induction of ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:757-762.
- 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.
- Paschen W, Rohn G, Meese CO, Djuricic B, Schmidt-Kastner R (1988) Polyamine metabolism in reversible cerebral ischemia: effect of alpha-difluoromethylornithine. *Brain Res* 453:9-16.
- 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* 17:17.
- Perron JC, Bixby JL (1999) Distinct neurite outgrowth signaling pathways converge on ERK activation. *Mol Cell Neurosci* 13:362-378.
- 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.
- Peterson C, Neal JH, Cotman CW (1989) Development of N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 48:187-195.
- Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, Mason CA, Tessier-Lavigne M (2002) Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33:219-232.
- Pollock GS, Vernon E, Forbes ME, Yan Q, Ma YT, Hsieh T, Robichon R, Frost DO, Johnson JE (2001) Effects of early visual experience and diurnal rhythms on BDNF mRNA and protein levels in the visual system, hippocampus, and cerebellum. *J Neurosci* 21:3923-3931.
- Pollock GS, Robichon R, Boyd KA, Kerkel KA, Kramer M, Lyles J, Ambalavanar R, Khan A, Kaplan DR, Williams RW, Frost DO (2003) TrkB receptor signaling regulates developmental death dynamics, but not final number, of retinal ganglion cells. *J Neurosci* 23:10137-10145.
- Porcella A, Fage D, Voltz C, Carter C, Scatton B, Bartholini G (1991) Difluoromethyl ornithine protects against the neurotoxic effects of intrastrially administered N-methyl-D-aspartate in vivo. *Eur J Pharmacol* 199:267-269.
- Properzi F, Asher RA, Fawcett JW (2003) Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochem Soc Trans* 31:335-336.

- 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.
- Quigley HA, Addicks, E. M., Green, W. R. & Maumenee, A. E. (1981) Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol* 99:635-649.
- 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.
- Ramon y Cajal S (1928) *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. London: Oxford Univ. Press.
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM (2004) Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474:304-324.
- Reynolds IJ, Miller RJ (1989) Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: interaction with polyamines. *Mol Pharmacol* 36:758-765.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286:2358-2361.
- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ (1980) Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 284:264-265.
- Ringstedt T, Braisted JE, Brose K, Kidd T, Goodman C, Tessier-Lavigne M, O'Leary DD (2000) Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon. *J Neurosci* 20:4983-4991.
- Robinson MJ, Stippec SA, Goldsmith E, White MA, Cobb MH (1998) A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr Biol* 8:1141-1150.
- Roder HM, Eden PA, Ingram VM (1993) Brain protein kinase PK40erk converts TAU into a PHF-like form as found in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 193:639-647.
- Rodriguez-Tebar A, Jeffrey PL, Thoenen H, Barde YA (1989) The survival of chick retinal ganglion cells in response to brain-derived neurotrophic factor depends on their embryonic age. *Dev Biol* 136:296-303.

- Rohrer B, LaVail MM, Jones KR, Reichardt LF (2001) Neurotrophin receptor TrkB activation is not required for the postnatal survival of retinal ganglion cells in vivo. *Exp Neurol* 172:81-91.
- Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105-111.
- Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67:203-233.
- Sanchez I, Hassinger L, Sihag RK, Cleveland DW, Mohan P, Nixon RA (2000) Local control of neurofilament accumulation during radial growth of myelinating axons in vivo. Selective role of site-specific phosphorylation. *J Cell Biol* 151:1013-1024.
- Sapieha PS, Hauswirth WW, Di Polo A (2006) Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are required for adult retinal ganglion cell axon regeneration induced by fibroblast growth factor-2. *J Neurosci Res* 21:21.
- 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.
- Sapieha PS, Duplan L, Uetani N, Joly S, Tremblay ML, Kennedy TE, Di Polo A (2005) Receptor protein tyrosine phosphatase sigma inhibits axon regrowth in the adult injured CNS. *Mol Cell Neurosci* 28:625-635.
- Sawai H, Clarke DB, Kittlerova P, Garth GM, Aguayo AJ (1996) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulate growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells. *J Neurosci* 16:3887-3894.
- Schwartz M, Kohsaka S, Agranoff BW (1981) Ornithine decarboxylase activity in retinal explants of goldfish undergoing optic nerve regeneration. *Brain Res* 227:403-413.
- Seiler N, Raul F (2005) Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med* 9:623-642.
- Seki M, Nawa H, Fukuchi T, Abe H, Takei N (2003) BDNF is upregulated by postnatal development and visual experience: quantitative and immunohistochemical analyses of BDNF in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3211-3218.
- 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.

- Shalizi A, Lehtinen M, Gaudilliere B, Donovan N, Han J, Konishi Y, Bonni A (2003) Characterization of a neurotrophin signaling mechanism that mediates neuron survival in a temporally specific pattern. *J Neurosci* 23:7326-7336.
- 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.
- Shea TB, Flanagan LA (2001) Kinesin, dynein and neurofilament transport. *Trends Neurosci* 24:644-648.
- Shekarabi M, Kennedy TE (2002) The netrin-1 receptor DCC promotes filopodia formation and cell spreading by activating Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Neurosci* 19:1-17.
- Shekarabi M, Moore SW, Tritsch NX, Morris SJ, Bouchard JF, Kennedy TE (2005) Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci* 25:3132-3141.
- Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA (1999) Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* 23:285-295.
- Shohami E, Nates JL, Glantz L, Trembovler V, Shapira Y, Bachrach U (1992) Changes in brain polyamine levels following head injury. *Exp Neurol* 117:189-195.
- Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, Schiavo N, Zanellato A, Zanoni R, Vantini G (1992) N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci* 8:567-573.
- Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.
- Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS (1984) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226:850-852.

- Snow DM, Watanabe M, Letourneau PC, Silver J (1991) A chondroitin sulfate proteoglycan may influence the direction of retinal ganglion cell outgrowth. *Development* 113:1473-1485.
- 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.
- Song HJ, Ming GL, Poo MM (1997) cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388:275-279.
- Spalding KL, Rush RA, Harvey AR (2004) Target-derived and locally derived neurotrophins support retinal ganglion cell survival in the neonatal rat retina. *J Neurobiol* 60:319-327.
- Sperry RW (1963) Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50:703-710.
- Stichel CC, Muller HW (1998) Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury. *Prog Neurobiol* 56:119-148.
- Suetsugu S, Miki H, Takenawa T (1998) The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *Embo J* 17:6516-6526.
- Sun Q, Ooi VE, Chan SO (2001) N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in adult rat retina is antagonized by single systemic injection of MK-801. *Exp Brain Res* 138:37-45.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.
- 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.
- Tremblay R, Hewitt K, Lesiuk H, Mealing G, Morley P, Durkin JP (1999) Evidence that brain-derived neurotrophic factor neuroprotection is linked to its ability to reverse the NMDA-induced inactivation of protein kinase C in cortical neurons. *J Neurochem* 72:102-111.
- Trousse F, Marti E, Gruss P, Torres M, Bovolenta P (2001) Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* 128:3927-3936.

- Trout JJ, Koenig H, Goldstone AD, Iqbal Z, Lu CY, Siddiqui F (1993) N-methyl-D-aspartate receptor excitotoxicity involves activation of polyamine synthesis: protection by alpha-difluoromethylornithine. *J Neurochem* 60:352-355.
- Turner DL, Cepko CL (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328:131-136.
- Veeranna, Amin ND, Ahn NG, Jaffe H, Winters CA, Grant P, Pant HC (1998) Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. *J Neurosci* 18:4008-4021.
- Veeranna, Kaji T, Boland B, Odrlic T, Mohan P, Basavarajappa BS, Peterhoff C, Cataldo A, Rudnicki A, Amin N, Li BS, Pant HC, Hungund BL, Arancio O, Nixon RA (2004) Calpain mediates calcium-induced activation of the erk1,2 MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons: relevance to Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 165:795-805.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP, Bray GM, Aguayo AJ (1988) Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. *Exp Neurol* 102:92-101.
- 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 cell 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.
- von Bartheld CS, Butowt R (2000) Expression of neurotrophin-3 (NT-3) and anterograde axonal transport of endogenous NT-3 by retinal ganglion cells in chick embryos. *J Neurosci* 20:736-748.
- Wahl S, Barth H, Ciossek T, Aktories K, Mueller BK (2000) Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol* 149:263-270.

- 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 SW, Gan L, Martin SE, Klein WH (2000) Abnormal polarization and axon outgrowth in retinal ganglion cells lacking the POU-domain transcription factor Brn-3b. *Mol Cell Neurosci* 16:141-156.
- Wang SW, Kim BS, Ding K, Wang H, Sun D, Johnson RL, Klein WH, Gan L (2001) Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells. *Genes Dev* 15:24-29.
- Wang SW, Mu X, Bowers WJ, Kim DS, Plas DJ, Crair MC, Federoff HJ, Gan L, Klein WH (2002c) Brn3b/Brn3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn3c in retinal ganglion cell axon outgrowth. *Development* 129:467-477.
- Wang Y, Dakubo GD, Thurig S, Mazerolle CJ, Wallace VA (2005) Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development* 132:5103-5113.
- Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA (2001) Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci* 4:981-988.
- Watt WC, Sakano H, Lee ZY, Reusch JE, Trinh K, Storm DR (2004) Odorant stimulation enhances survival of olfactory sensory neurons via MAPK and CREB. *Neuron* 41:955-967.
- Webber CA, Chen YY, Hehr CL, Johnston J, McFarlane S (2005) Multiple signaling pathways regulate FGF-2-induced retinal ganglion cell neurite extension and growth cone guidance. *Mol Cell Neurosci* 30:37-47.
- Weishaupt JH, Klocker N, Bahr M (2005) Axotomy-induced early down-regulation of POU-IV class transcription factors Brn-3a and Brn-3b in retinal ganglion cells. *J Mol Neurosci* 26:17-25.
- Williams K (1997) Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. *Cell Signal* 9:1-13.

- Wills Z, Marr L, Zinn K, Goodman CS, Van Vactor D (1999) Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo. *Neuron* 22:291-299.
- Xiao X, Li J, Samulski RJ (1996) Long-term and efficient in vivo gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice with an rAAV vector. *J Virol* 70:8098-8108.
- Xiao X, Li J, McCown TJ, Samulski RJ (1997) Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system. *Exp Neurol* 144:113-124.
- 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, Tucker KL, Barde YA (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24:585-593.
- Yin Y, Henzl M, Thomas T, Langer R, Benowitz LI (2005) Oncomodulin, a novel macrophage-derived growth factor, stimulates axon regeneration in the mature optic nerve. . Abstract Viewer/Itinerary Planner Washington, DC: Society for Neuroscience:No 837.839.
- 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.
- Yip HK, So KF (2000) Axonal regeneration of retinal ganglion cells: effect of trophic factors. *Prog Retin Eye Res* 19:559-575.
- Young RW (1985) Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212:199-205.
- Yu TW, Hao JC, Lim W, Tessier-Lavigne M, Bargmann CI (2002) Shared receptors in axon guidance: SAX-3/Robo signals via UNC-34/Enabled and a Netrin-independent UNC-40/DCC function. *Nat Neurosci* 5:1147-1154.
- 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* 185:643-661.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-(X)L. *Cell* 87:619-628.

- Zhang S, Kashii S, Yasuyoshi H, Kikuchi M, Honda Y, Kaneda K, Sato S, Akaike A (2000) Protective effects of ifenprodil against glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238:846-852.
- Zhang XM, Yang XJ (2001) Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development* 128:943-957.
- Zhou Y, Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A (2005) Activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by AAV gene transfer protects retinal ganglion cells in glaucoma. *Mol Ther* 12:402-412.
- Zhu Q, Julien JP (1999) A key role for GAP-43 in the retinotectal topographic organization. *Exp Neurol* 155:228-242.
- Zoli M, Zini I, Grimaldi R, Biagini G, Agnati LF (1993) Effects of polyamine synthesis blockade on neuronal loss and astroglial reaction after transient forebrain ischemia. *Int J Dev Neurosci* 11:175-187.

ANNEXE A**ACTIVATION OF THE EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE 1/2
PATHWAY BY AAV GENE TRANSFER PROTECTS RETINAL GANGLION
CELLS IN GLAUCOMA**

Molecular Therapy, 2005, 12 (3):402-412.

Yu Zhou¹, Vincent Pernet¹, William W. Hauswirth³ and Adriana Di Polo^{1,2,*}.

¹Department of Pathology and Cell Biology, ²Department of Ophthalmology, Université de Montréal, 2900 Boulevard Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec, Canada H3T 1J4;

³Department of Ophthalmology and Powell Gene Therapy Center, P.O. Box 100284, University of Florida Gainesville, FL 32610-0284.

Abbreviated Title: Erk1/2 activation protects RGCs in glaucoma

*** Corresponding Author: Adriana Di Polo, Ph.D.**
Université de Montréal
2900, Boul. Edouard-Montpetit
Pavillon Principal, Room N-535
Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada
Phone: (514) 343-6109
Fax: (514) 343-5755
E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

Glaucoma is the second leading cause of blindness in the world. Loss of vision in glaucomatous optic neuropathy is caused by the selective degeneration of retinal ganglion cells (RGCs). Ocular hypertension is a major risk factor in glaucoma, but visual field defects continue to progress in some patients despite the use of drugs that lower intraocular pressure (IOP). At present, there are no effective neuroprotective strategies for the treatment of this disease. The extracellular signal-regulated kinase (Erk) 1/2 pathway is an evolutionarily conserved mechanism used by several peptide factors to promote cell survival. Here we tested if selective activation of Erk1/2 protected RGCs in a rat model of experimental glaucoma. We used recombinant adeno-associated virus (AAV) to selectively transduce RGCs with genes encoding constitutively active or wild-type MEK1, the upstream activator of Erk1/2. MEK1 gene transfer into RGCs markedly increased neuronal survival: $1,366 \pm 70$ RGCs/mm² (mean \pm S.E.M.) were alive in the dorsal retina at five weeks after ocular hypertension surgery, a time when only 680 ± 86 RGCs/mm² of these neurons remained in control eyes. We conclude that the Erk1/2 pathway plays a key role in the protection of RGCs from ocular hypertensive damage. This study identifies a novel gene therapy strategy in which selective activation of the Erk1/2 signaling pathway effectively slows cell death in glaucoma.

Keywords: retinal ganglion cell; glaucoma; extracellular signal-regulated kinase; neuroprotection; neurotrophic factors; gene therapy.

INTRODUCTION

Glaucoma is a leading cause of blindness worldwide ¹. The incidence of glaucoma increases dramatically with age and more than 2.2 million people in North America age 40 and older have glaucoma. The characteristic visual field changes in glaucoma are caused by the selective degeneration of retinal ganglion cells (RGCs). Elevated intraocular pressure (IOP) is a key risk factor for RGC loss in glaucoma ², however, this condition worsens in a group of patients despite the use of IOP lowering medication ^{3,4}. Thus, there is great need for the development of alternative strategies that slow RGC death and the progression of glaucomatous optic neuropathy. At present, there are no effective neuroprotective strategies for the treatment of this disease.

The potent effect of neurotrophins on the survival of adult central nervous system (CNS) neurons ⁵ has led to interest in using them to develop therapeutic strategies applicable to glaucoma. Among neurotrophins, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is the most potent survival factor for injured RGCs ^{6,7}. Consistent with this, RGCs express TrkB, the high-affinity receptor for BDNF ^{8,9}. An important limitation of applying exogenous BDNF as neuroprotective therapy for RGCs is that this factor will affect all other retinal cells that express the receptor TrkB, including amacrine cells, Müller glia and cone photoreceptors ^{8,10,11}. In addition, it is known that exogenous neurotrophic factors may produce adverse side effects. For example, BDNF may limit its neuroprotective action on axotomized RGCs by upregulating nitric oxide synthase activity ¹² or by suppressing the expression of the heat shock protein 27 ¹³. Subcutaneous or intraperitoneal implantation of glioma cells engineered to secrete CNTF, or systemic injection of purified recombinant CNTF in adult mice produced rapid weight loss resulting in death ¹⁴. In addition, recent studies demonstrated that CNTF has deleterious effects on visual function as assessed by electroretinography ^{15,16}.

An alternative strategy is to target the intracellular events that lead to RGC survival, bypassing the use of exogenous peptide factors. Upon binding to Trk receptors, BDNF stimulates multiple signaling pathways, including the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2) and the phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase pathways ¹⁷. Although both Erk1/2 and PI-3 kinase are stimulated in RGCs following TrkB activation *in vivo*, we recently demonstrated that Erk1/2 is a key signaling component mediating adult RGC

survival¹⁸. Thus, we tested the hypothesis that selective stimulation of the Erk 1/2 pathway would promote RGC survival in a rat model of ocular hypertension. Recombinant adeno-associated virus (AAV) was used for *in vivo* gene delivery of constitutively active or wild type MEK1 into RGCs. This vector system was selected based on our finding that RGCs are the primary cellular target for AAV serotype 2 transduction upon intravitreal virus administration¹⁸. In addition, AAV evokes minimal immune response in the host¹⁹ and mediates long-term transgene expression that can persist in the retina for at least one year after vector administration²⁰.

In this study, we demonstrate that activation of the Erk1/2 signaling pathway leads to marked RGC neuroprotection in glaucomatous eyes and results in morphological preservation of cell bodies and axons. These data provide proof-of-principle that selective stimulation of key intracellular signaling pathways can be an effective strategy to delay neuronal death in the aging, injured CNS.

RESULTS

AAV.MEK-CA activates the Erk1/2 pathway in adult RGCs

For gene transfer experiments, recombinant AAV vectors containing genes encoding constitutively active (CA) or wild-type (WT) MEK1 were prepared. Viral vectors were injected intraocularly in intact and glaucomatous rat eyes to examine MEK1 gene expression in retinal cells *in vivo*. The time required for AAV-mediated transgene expression to reach a plateau in the adult rat retina is 3-4 weeks, thus subsequent surgical procedures were performed over this period after AAV administration (Fig. 1). To distinguish AAV-mediated MEK1 expression from endogenous MEK1, we used an antibody against the HA tag present only in MEK1 transgenes. Robust HA staining was observed in a large number of cells in the ganglion cell layer (GCL) of retinas treated with AAV.MEK-CA (Fig. 2A) or AAV.MEK-WT (Fig. 2D), but not in control eyes injected with AAV.GFP (not shown). Identical expression of AAV-mediated MEK proteins was observed at 4 and 10 weeks following administration of viral vectors, consistent with previous observations that AAV vectors mediate long-term transgene expression in the adult retina^{18, 20, 21}.

We have previously demonstrated that RGCs are the main cellular targets for infection when AAV is administered into the vitreous chamber^{18, 22}. To confirm this, we performed co-localization studies in retinas from eyes that received a single intravitreal injection of AAV.MEK vectors followed by retrograde labeling of RGCs using FluoroGold applied to the superior colliculus. Double-labeling experiments demonstrated that the vast majority of RGCs, visualized with FluoroGold (Figs. 2B, 2E), also produced virally-mediated MEK1 proteins (Figs. 2C, 2F). In addition, staining was also observed in RGC dendritic processes extending into the inner plexiform layer (IPL) (Figs. 2G-L). Thus, the diffuse HA staining detected in the IPL is likely due to the presence of MEK-CA in RGC dendrites. No signs of inflammation, cytotoxicity, abnormal growth or immune reaction were detected in any of the eyes following administration of AAVs.

To establish the efficacy of AAV.MEK vectors to stimulate the Erk1/2 pathway *in vivo*, we examined the levels of phosphorylated Erk1 and Erk2 in whole retinal homogenates using antibodies that specifically recognize the phosphorylated forms of these kinases. AAV.MEK-CA significantly increased Erk1 and Erk2 activation above the levels found in non-treated retinas or in retinas infected with AAV.GFP or AAV.MEK-WT (Fig. 2M), consistent with an increase in MEK activity of the constitutively active mutant protein. We, and others, have shown that >75% of RGCs can be effectively infected with recombinant AAV^{18, 23-25}. In a previous study, we showed that only a small number of displaced amacrine cells (~8%) in the ganglion cell layer were also infected by AAV, while no glial cells were transduced¹⁸. Based on these findings, it is likely that changes in protein phosphorylation largely reflect changes in AAV-infected RGCs. Densitometric analysis confirmed that a single AAV.MEK-CA injection led to a 2-fold increase in phospho-Erk1 (Student's t-test: $p < 0.05$) and a 1.5-fold increase in phospho-Erk2 (Student's t-test: $p < 0.05$) with respect to control retinas treated with AAV.MEK-WT (Supplemental Fig. 1). Western blot analysis using an antibody against the HA tag, present only in the MEK transgenes, confirmed that both AAV.MEK-CA and AAV.MEK-WT mediate similar transduction of RGCs. Together, these results indicate that AAV.MEK-CA drives selective and sustained stimulation of the Erk1/2 pathway in adult RGCs *in vivo*.

Intraocular pressure elevation (IOP) in experimental and control groups

Unilateral elevation of IOP was induced in aging, male brown Norway rats after a single injection of hypertonic solution into one episcleral vein. This model of ocular hypertension leads to inner retinal atrophy, optic nerve degeneration, and optic nerve head remodeling similar to that seen in human, age-related glaucoma²⁶. Of the 78 animals that underwent ocular hypertension surgery, 68 were used for quantification of neuronal survival following different AAV treatments, 6 were used for quantification of neuronal survival in non-treated, glaucomatous eyes, and 4 were used for immunostaining with an antibody against neurofilament to visualize RGC axons.

Table 1 shows the IOP increase in experimental and control groups throughout the duration of the study. Baseline mean IOP in both eyes prior to ocular hypertension surgery was ~27 mm Hg, which is a typical measurement in awake rats that are housed in a constant light environment to stabilize circadian IOP variations^{27, 28}. Mean sustained pressure elevation among all groups was 17 mm Hg, well within the range of IOP increase observed in this model²⁶, and the retinal vasculature remained perfused in all eyes. Importantly, there was no significant difference in the mean, peak or integral IOP among the three experimental or control groups at 5 weeks or 7 weeks following induction of glaucoma (Table 1, Row: P Value, ANOVA). Given that the rate of RGC death and optic nerve damage is proportional to IOP increase in this model²⁶, the similar increase in IOP among all groups allowed reliable comparison of the neuroprotective effect of each viral vector treatment.

Erk1/2 activation protects RGCs from hypertension-induced death

The widespread expression of AAV-mediated MEK-CA in RGCs and its ability to activate Erk1/2 *in vivo* prompted us to test its effect on neuronal survival in glaucomatous eyes (Fig. 1). Following intraocular injection of viral vectors, RGCs were back labeled with the fluorescent tracer DiI. Unlike other retrograde markers that leak out of the cell bodies after several weeks, DiI has been shown to persist in RGCs *in vivo* for periods of up to 9 months without fading or leakage²⁹. In addition, DiI does not interfere with the function of living neurons³⁰. Episcleral vein injection was performed one week after DiI application to assure that all RGCs were labeled prior to intraocular pressure increase. Retinas were

examined histologically at 5 and 7 weeks following ocular hypertension surgery to determine the density of surviving RGCs in all retinal hemispheres. Macrophages and microglia that may have incorporated DiI after phagocytosis of dying RGCs were excluded from our quantitative analysis based on their morphology and immunolabeling using specific markers as described¹⁸.

Injection of AAV vectors was routinely performed in the superior (dorsal) hemisphere of the eye, consequently, a higher density of RGCs expressing MEK-CA was always observed in this retinal hemisphere. We anticipated that the effect of MEK-CA on RGC survival would be most noticeable in retinal regions with the highest density of infected RGCs. Thus, we compared the effect of AAV.MEK-CA on RGC survival in the entire retina with that in the superior hemisphere (Fig 3). A single intraocular injection of AAV.MEK-CA increased RGC survival in the whole eye (Fig. 3A), but most notably in the superior hemisphere (Fig. 3B) at 5 and 7 weeks after hypertension surgery. For example, at 5 weeks after episcleral vein injection AAV.MEK-CA protected ~77% of the total number of RGCs in the superior retina compared to ~38% with either AAV.MEK-WT or AAV.GFP (Table 2; ANOVA, **: P<0.001). Remarkably, in some retinas up to 89% of RGCs were protected in the superior retinal hemisphere. Neuronal survival in this region following treatment with AAV.MEK-CA was still significant at 7 weeks post-surgery: ~49% of the total number of RGCs remained alive in contrast to only 22% or 18% of neurons that survived with AAV.MEK-WT or AAV.GFP, respectively (Table 2; ANOVA, **: P<0.001). This neuroprotective effect led to higher neuronal densities and better preservation of cellular integrity than with control vectors (Fig. 4). To examine whether the increase in RGC density observed with AAV.MEK-CA was due to cell proliferation, we evaluated the number of DiI-labeled neurons after AAV.MEK-CA injection in normal, intact retinas. Our analysis demonstrated that the total number of RGCs in intact retinas treated with AAV.MEK-CA ($1,826 \pm 47$, n = 4) was virtually identical to that found in intact, non-injected retinas ($1,849 \pm 39$, n = 9; RGCs/mm² \pm S.E.M.). No statistical difference was found between the two groups (Student's t test, p = 0.74). These data strongly suggest that AAV.MEK-CA promotes survival, but not proliferation, of adult RGCs.

AAV.MEK-CA treatment reduces RGC axon damage in glaucoma

Glaucoma is characterized by the degeneration of RGC axons in the optic nerve followed by the progressive loss of cell bodies^{31, 32}. Hence, we investigated the effect of AAV.MEK-CA on RGC axon protection following ocular hypertensive damage. For this purpose, we examined RGC axons within the retina, which are unmyelinated, as well as in the optic nerve where axons are ensheathed in myelin. Figure 5 shows intraretinal axons visualized following staining of whole-mounted retinas with RT-97, an antibody that recognizes the phosphorylated 200-kDa neurofilament H subunit. Immunoreactive axons coursed in organized bundles toward the optic nerve head in normal retinas (Fig. 5A). In retinas treated with the control vector AAV.GFP, intraretinal axon bundles suffered significant fiber loss at 5 weeks after hypertension surgery (Fig. 5C). Many remaining fibers had a beaded appearance confirming the progressive axonal degeneration after glaucomatous injury. In contrast, treatment with AAV.MEK-CA remarkably preserved the overall structure of RGC intraretinal axon bundles (Fig. 5B).

To further investigate the protective effect of AAV.MEK-CA on RGC axons, we analyzed optic nerve segments from intact and glaucomatous eyes collected at 1-2 mm behind the globe, where all axons are myelinated (Fig 6). Optic nerve cross-sections from AAV.MEK-CA-treated eyes displayed a larger number of axonal fibers with normal morphology (Fig. 6B) compared to AAV.MEK-WT-treated control eyes, which showed extensive axon degeneration including disarray of fascicular organization and degradation of myelin sheaths (Fig. 6C). Quantification of RGC axons demonstrated that AAV-mediated MEK-CA protected 54% of the total number of axons in the optic nerve at 5 weeks after ocular hypertension surgery, compared to 35% and 32% of axons found in eyes treated with AAV.MEK-WT or AAV.GFP, respectively (Fig. 5D). Together, these results strongly suggest that activation of the Erk1/2 pathway via MEK-CA gene transfer protects RGC soma and axons in this injury model.

DISCUSSION

There is convincing evidence that the primary form of RGC death in glaucoma occurs by apoptosis^{31, 33}, but the precise molecular mechanisms that lead to RGC loss remain undefined. The elucidation of the intracellular signaling pathways that regulate RGC survival and death is paramount for the design of effective neuroprotective strategies. The Erk1/2 pathway is a central, evolutionarily conserved mechanism used by several peptide factors to elicit a broad spectrum of biological activities including cell survival and axon growth³⁴⁻³⁶. Here, we tested a gene therapy strategy using recombinant AAV to investigate the role of Erk1/2 signaling on the survival of adult rat RGCs in experimental glaucoma. Our results demonstrate that constitutive activation of Erk1/2 confers striking structural protection of RGC soma and axons at 5 and 7 weeks after ocular hypertension surgery. In contrast, AAV vectors carrying genes for either wild-type Erk1/2 or GFP promoted minimal neuroprotection. The endogenous level of active Erk1/2 in RGCs in non-treated, glaucomatous retinas is low, similar to that found in intact, non-treated retinas (Supplemental Figure 2). This finding suggests that AAV.MEK-CA boosts the levels of active Erk1/2 in RGCs leading to neuroprotection in glaucoma. A major advantage of this approach over other strategies is that AAV serotype 2 mediates gene transfer to >70% of RGCs and few displaced amacrine cells¹⁸, but not other retinal cell types, hence Erk1/2 activation is largely restricted to a target neuronal population.

Glaucoma has been defined as an axogenic disease, characterized first by the degeneration of RGC axons in the optic nerve followed by the progressive loss of cell bodies³². We performed complementary, but independent, quantitative analyses of the neuroprotective effect of AAV.MEK-CA on two major RGC compartments: soma and axons. Consistent with the idea that the primary site of degeneration in glaucoma is at the level of the axon, we found that all eyes had more pronounced axon loss than cell body loss. However, a single intraocular injection of AAV.MEK-CA effectively protected a similar proportion of RGC soma and axons within the optic nerve. Of interest, we recently demonstrated that activation of Erk1/2 by itself is not sufficient to promote axon regeneration of axotomized RGCs³⁷. However, in the context of glaucomatous damage, AAV.MEK-CA effectively preserved the overall structure of RGC axons and optic nerve.

The protection of all cellular compartments following hypertension damage is key for the preservation of appropriate neuronal function and vision in glaucoma. Functional studies in macaque monkeys subjected to experimental glaucoma demonstrated that only subtle visual field defects are detected with a loss of $\leq 50\%$ of RGCs, whereas vision loss increased dramatically with more advanced glaucoma³⁸. Thus, structural protection of $>50\%$ of RGC soma and axons, as shown with selective stimulation of the Erk1/2 pathway, is likely to be sufficient for substantial preservation of visual function in glaucoma. Future studies are required to evaluate the functional state of the rescued neurons.

Only two other studies have previously explored neuroprotective AAV-based strategies in rat models of experimental glaucoma: one group investigated the effect of BDNF gene transfer³⁹, while the other used gene transfer of the caspase inhibitor BIRC4⁴⁰. The mean IOP increase reported in these previous studies was lower than in our model; therefore it is difficult to directly compare these data. An advantage of our approach, however, is that direct stimulation of Erk1/2 in RGCs bypasses the use of exogenous neurotrophic factors which affect many different cell types and may have adverse side effects in the retina^{12, 13, 16}. In addition, Erk1/2 is an intermediary signaling component that blocks apoptotic cell death prior to caspase activation. Suppression of apoptosis using caspase inhibitors is an approach that has been explored with only modest success⁴¹. Mitochondrial dysfunction, which marks the point of no return during apoptosis, occurs even in the presence of caspase inhibition leading to impairment in ATP production and increased production of reactive oxygen species⁴². Thus, strategies that halt the commitment to die prior to irreversible mitochondrial dysfunction are likely to contribute to better functional outcome.

The loss of RGCs in human glaucoma often occurs over the course of several decades, thus it is important to test the long-term efficacy of neuroprotective strategies. AAV has been shown to mediate long-term transgene expression that persists in the adult retina for at least one year after vector administration^{20, 21}. We show here that AAV mediates MEK-CA expression in RGCs *in vivo* for at least several weeks after intraocular injection of the viral vector. Future studies are key to determine the long-term neuroprotective effect of AAV.MEK-CA in experimental glaucoma. From a clinical perspective, intravitreal injection of AAV.MEK-CA may confer neuroprotection of RGCs

in patients affected by glaucoma used in combination with IOP reducing drugs. Recombinant AAV efficacy has been demonstrated in numerous gene therapy preclinical studies and this vector is increasingly being applied to human clinical trials including neurological conditions⁴³⁻⁴⁶. These results raise the exciting possibility that AAV.MEK-CA may have potential as a therapeutic agent for the treatment of glaucoma and other optic nerve diseases in humans.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of recombinant AAV serotype 2 vectors

The constitutively active MEK1 mutant used in our study was created by substitution of regulatory phosphorylation sites to acidic residues (S218D, S222D) and deletion of residues 44-55 N-terminal to the consensus catalytic core (MEK-CA; provided by Dr. N. Ahn, University of Colorado). The MEK-CA cDNA was inserted downstream of the hybrid chicken β -actin/CMV enhancer promoter in the plasmid pXX-UF12. AAV vectors were packaged, concentrated and titered as previously described⁴⁷. Control AAVs containing genes that encoded wild-type MEK1 (AAV.MEK-WT) or green fluorescent protein (AAV.GFP) were generated in identical fashion. The number of infectious particles/ml (ip/ml) was determined by infectious center assay as described⁴⁸ and was: 1.7×10^{10} ip/ml for AAV.MEK-CA, 3.7×10^{10} ip/ml for AAV.MEK-WT and 3.0×10^{10} ip/ml for AAV.GFP. No helper adenovirus or wild-type AAV contamination was detected in these preparations.

Experimental animals and surgical procedures

Surgeries were performed in adult male Brown Norway rats, retired breeders, between 10-12 months of age (300-400 g), under general anesthesia by intraperitoneal injection of 1 ml/kg standard rat cocktail consisting of ketamine (100 mg/ml), xylazine (20 mg/ml) and acepromazine (10 mg/ml).

i) Intraocular injection of viral vectors: Viral vectors (5 μ l) were injected into the vitreous chamber of one eye using a 10- μ l Hamilton syringe adapted with a 32-gauge needle. Contralateral, unoperated eyes served as controls. The tip of the needle was inserted in the superior hemisphere of the eye at a 45° angle through the sclera into the vitreous

body. This route of administration avoided injury to eye structures, such as the iris or the lens, reported to promote survival and regeneration of RGCs. Once the tip of the needle reached the intravitreal space, it was held in place for injection of the viral solution over a period of ~2 min after which it was gently removed. The site of injection was then sealed with surgical glue (Indermill, Tyco Health Care, Mansfield, MA, USA).

ii) Retrograde labeling of RGCs: For neuronal survival experiments, RGCs were retrogradely labeled with 3% DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes, Junction City, OR), a fluorescent carbocyanine marker that persists for several months without fading or leakage and does not interfere with the function of labeled cells^{29, 30}. For retrograde labeling, both superior colliculi, the main targets of RGCs in the brain⁴⁹, were exposed and a small piece of gelfoam (Pharmacia and Upjohn Inc., Mississauga, ON) soaked in DiI was applied to their surface. Seven days after DiI application, the time required for labeling the entire RGC population, animals were subjected to ocular hypertension surgery as described below. For co-labeling experiments, RGCs were retrogradely labeled with 2% FluoroGold (Fluorochrome, Englewood, CO).

iii) Ocular hypertension surgery: Unilateral and chronic elevation of IOP was induced as previously described²⁶ using a method that involves injection of a hypertonic saline solution into an episcleral vein. All the animals involved in this study received only a single saline vein injection. The eye previously injected with a viral vector was selected for the procedure and a plastic ring was applied to the ocular equator to confine the injection to the limbal plexus. A microneedle (30-50 μm in diameter) was used to inject 50 μl of sterile 1.85 M NaCl solution through one episcleral vein. The plastic ring temporarily blocked off other episcleral veins forcing the saline solution into the Schlemm's canal to create isolated scarring. Animals were kept in a room with constant low fluorescent light (40-100 lux) to stabilize circadian IOP variation²⁷.

iv) Measurement of intraocular pressure (IOP): IOP from glaucomatous and normal (contralateral) eyes was measured in awake animals using a calibrated tonometer (TonoPen XL, Medtronic Solan, Jacksonville, FL). Ten to fifteen consecutive readings per eye were taken and averaged to obtain an accurate daily IOP measurement. IOP was measured daily for two weeks after ocular hypertension surgery, and then every other day for the entire duration of the experiment. The mean IOP (mm Hg \pm S.E.M.) per eye was the

average of all IOP readings since the onset of pressure elevation. The maximum IOP measured in each individual eye, glaucomatous or normal contralateral eye, was defined as the peak IOP and this value was used to estimate the mean peak IOP for each group. The positive integral IOP was calculated as the area under the IOP curve in the glaucomatous eye minus that of the fellow normal eye from ocular hypertension surgery to euthanasia. Integral IOP represents the total, cumulative IOP exposure throughout the entire experiment.

Quantification of RGC soma and axons

Quantification of RGC bodies or axons was always performed in duplicate and in a masked fashion. For RGC density counts, rats were deeply anesthetized and perfused intracardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer and both eyes were immediately enucleated. Retinas were dissected and flat-mounted on a glass slide with the ganglion cell layer side up. Under fluorescence microscopy, DiI-labeled neurons were counted in 12 standard retinal areas as described⁵⁰. For axonal counts, animals received an intracardiac injection of heparin (1,000 u/kg) containing sodium nitroprusside (10 mg/kg) followed by intracardiac perfusion with 2% PFA and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Optic nerves were dissected, fixed in 2% osmium tetroxide, and embedded in epon resin. Semi-thin sections (0.7- μm -thick) were cut on a microtome (Reichert, Vienna, Austria) and stained with 1% toluidine blue. RGC axons were counted in five non-overlapping areas of each optic nerve section, encompassing a total area of 5,500 μm^2 per nerve. The five optic nerve areas analyzed included one in the center of the nerve, two peripheral dorsal and two peripheral ventral regions. The total surface area per optic nerve cross section was measured using the Northern Eclipse image analysis software, and this value was used to estimate the total number of axons in each optic nerve. We estimated that 2% of the total number of axons in the optic nerve and 1.8% of the total number of RGCs, with respect to the total number of axons and RGCs found in normal retinas, were sampled in our quantitative analysis.

Retinal immunohistochemistry

Radial retinal cryosections (16 μm) were prepared and processed as described²². Monoclonal HA primary antibody (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, clone 12CA5, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA) or polyclonal phospho-Erk1/2 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BioSource Int.) was added and incubated overnight at 4°C. Sections were then incubated with fluorophore-conjugated goat anti-mouse IgG (red, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Alexa 594, Molecular Probes) or anti-rabbit IgG (Cy3, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA) for 1 hr at room temperature, washed in PBS and mounted using an anti-fade reagent (SlowFade, Molecular Probes, Eugene, OR). For whole-retina immunostaining, tissue was permeabilized in PBS containing 2% Triton X-100 and 0.5% DMSO at 4°C for 3 days, then incubated in blocking solution (10% NGS in 2% Triton-X100 and 0.5% DMSO) for 1 hr at room temperature. Retinas were incubated with monoclonal neurofilament (NF) RT-97 antibody, which recognizes phosphorylated NF-H, (1:200; gift from Dr. J. Wood, McGill University) followed by incubation with Alexa 594 red goat anti-mouse IgG secondary antibody (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Fluorescent staining was examined using a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada, Kirkland, QC) or a Leica TCS-SP1 confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

Western blot analysis

Whole retina homogenates and western blots were prepared as previously described¹⁸. Non-specific binding was blocked by incubating blots in 10 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20 (TBST), and 5% lyophilized skim milk for 1h at room temperature. Membranes were incubated with the following primary antibodies: polyclonal phospho-Erk1/2 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), polyclonal Erk1/2 (2.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BioSource Int.), or monoclonal HA (0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Roche Diagnostics). Blots were washed in TBST and then incubated with anti-mouse or anti-rabbit peroxidase-linked secondary antibody (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Amersham Pharmacia, Baie d'Urfé, QC). Protein signals were detected using a chemiluminescence reagent (ECL, Amersham Biosciences) followed by exposure of blots to X-OMAT (Kodak) imaging film.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to A.D.P. from the Canadian Institutes of Health Research, Canadian Institute for the Blind (E.A. Baker Foundation), Glaucoma Research Foundation and Glaucoma Foundation; and to W.W.H. from the National Institutes of Health (RO1-11123) and the Macular Vision Research Foundation. We thank Drs. Timothy Kennedy (McGill University) and John Morrison (Oregon Health and Science University) for comments on the manuscript, Michel Lauzon (University of Montreal) for assistance with confocal microscopy and Vince Chiodo (University of Florida) for assistance with viral vector preparation. A.D.P. is a scholar of Fonds de recherche en santé du Québec.

DISCLOSURE

A.D.P., W.W.H., the Université de Montréal, and the University of Florida could be entitled to patent royalties for inventions related to this work and W.W.H. owns equity in a company that may commercialize some of the technology described in this work.

REFERENCES

1. Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. *Br. J. Ophthalmol.* 1996; 80: 389-393.
2. Goldberg I. Relationship between intraocular pressure and preservation of visual field in glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 2003; 48: S3-S7.
3. Georgopoulos G, Andreanos D, Liokis N, et al. Risk factors in ocular hypertension. *Eur. J. Ophthalmol.* 1997; 7: 357-363.
4. Caprioli J. Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma. *Acta Ophthalmol. Scand.* 1997; 75: 364-367.
5. Dawbarn D, Allen SJ. Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2003; 29: 211-230.
6. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 1632-1636.
7. Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 3978-3983.
8. Pérez MTR, Caminos E. Expression of brain-derived neurotrophic factor and its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci. Lett.* 1995; 183: 96-99.
9. Jelsma TN, Hyman Friedman H, Berkelaar M, Bray GM, Aguayo AJ. Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *J. Neurobiol.* 1993; 24: 1207-1214.
10. Rohrer B, Korenbrot JI, LaVail MM, Reichardt LF, Xu B. Role of Neurotrophin Receptor TrkB in the Maturation of Rod Photoreceptors and Establishment of Synaptic Transmission to the Inner Retina. *J. Neurosci.* 1999; 19: 8919-8930.
11. Di Polo A, Cheng L, Bray GM, Aguayo AJ. Co-localization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green/red-sensitive cone outer segments. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41: 4014-4021.

12. Klocker N, Kermer P, Gleichmann M, Weller M, Bahr M. Both the neuronal and inducible isoforms contribute to upregulation of retinal nitric oxide synthase activity by brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 1999; 19: 8517-8527.
13. Krueger-Naug AM, Emsley JG, Myers TL, Currie RW, Clarke DB. Administration of brain-derived neurotrophic factor suppresses the expression of heat shock protein 27 in rat retinal ganglion cells following axotomy. *Neuroscience* 2003; 116: 49-58.
14. Henderson JT, Seniuk NA, Richardson PM, Gauldie J, Roder JC. Systemic administration of ciliary neurotrophic factor induces cachexia in rodents. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 2632-2638.
15. Bok D, Yasumura D, Matthes MT, et al. Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Exp. Eye Res.* 2002; 74: 719-735.
16. Schlichtenbrede FC, MacNeil A, Bainbridge JW, et al. Intraocular gene delivery of ciliary neurotrophic factor results in significant loss of retinal function in normal mice and in the Prph2Rd2/Rd2 model of retinal degeneration. *Gene Ther.* 2003; 10: 523-527.
17. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000; 10: 381-391.
18. Cheng L, Sapieha P, Kittlerová P, Hauswirth WW, Di Polo A. TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death *in vivo*. *J. Neurosci.* 2002; 22: 3977-3986.
19. Xiao X, Li J, McCown TJ, Samulski RJ. Gene transfer by adeno-associated virus vectors into the central nervous system. *Exp. Neurol.* 1997; 144: 113-124.
20. Guy J, Qi X, Muzyczka N, Hauswirth WW. Reporter expression persists 1 year after adeno-associated virus-mediated gene transfer to the optic nerve. *Arch. Ophthalmol.* 1999; 117: 929-937.
21. Dudus L, Anand V, Acland GM, et al. Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV. *Vis. Res.* 1999; 39: 2545-2553.
22. Sapieha PS, Peltier M, Rendahl KG, Manning WC, Di Polo A. Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury. *Mol. Cell. Neurosci.* 2003; 24: 656-672.

23. Harvey AR, Kamphuis W, Eggers R, et al. Intravitreal injection of adeno-associated viral vectors results in the transduction of different types of retinal neurons in neonatal and adult rats: a comparison with lentiviral vectors. *Mol. Cell Neurosci.* 2002; 21: 141-157.
24. Martin KR, Klein RL, Quigley HA. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* 2002; 28: 267-275.
25. Fischer D, Zhigang H, Benowitz LI. Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J. Neurosci.* 2004; 24: 1646-1651.
26. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LMH, et al. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp. Eye Res.* 1997; 64: 85-96.
27. Moore CG, Johnson EC, Morrison JC. Circadian rhythm of intraocular pressure in the rat. *Curr. Eye Res.* 1996; 15: 185-191.
28. Jia L, Cepurna WO, Johnson EC, Morrison JC. Patterns of intraocular pressure elevation after aqueous humor outflow obstruction in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41: 1380-1385.
29. Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP, Bray GM, Aguayo AJ. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp. Neurol.* 1988; 102: 92-101.
30. Honig MG, Hume RI. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J. Cell. Biol.* 1986; 103: 171-187.
31. Quigley HA. Neuronal death in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 1999; 18: 39-57.
32. Schwartz M, Yoles E, Levin LA. 'Axogenic' and 'somagenic' neurodegenerative diseases: definitions and therapeutic implications. *Mol. Med. Today* 1999; 5: 470-473.
33. Nickells RW. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv. Ophthalmol.* 1999; 43: S151-S161.
34. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; 68: 320-344.

35. Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2004; 14: 311-317.
36. Kyosseva SV. Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int. Rev. Neurobiol.* 2004; 59: 201-220.
37. Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured CNS neurons in vivo. *J. Neurochem.* 2005; 93: 72-83.
38. Harwerth RS, Carter-Dawson L, Shen F, Smith ELr, Crawford ML. Ganglion cell losses underlying visual field defects from experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1999.
39. Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, et al. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44: 4357-4365.
40. McKinnon SJ, Lehman DM, Tahzib NG, et al. Baculoviral IAP Repeat-Containing-4 Protects Optic Nerve Axons in a Rat Glaucoma Model. *Molecular Therapy* 2002; 5: 780-787.
41. Bilsland J, Harper S. Caspases and neuroprotection. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2002; 3: 1745-1752.
42. Chang LK, Putcha GV, Deshmukh M, Johnson J, E. M. Mitochondrial involvement in the point of no return in neuronal apoptosis. *Biochimie* 2002; 84: 223-231.
43. Lawlor PA, Doring MJ. Gene therapy for Parkinsons disease. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2004; 2004: 1-18.
44. Flotte TR, Brantly ML, Spencer LT, et al. Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Hum. Gene Ther.* 2004; 15: 93-128.
45. Moss RB, Rodman D, Spencer LT, et al. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 2004; 125: 509-521.
46. Couto LB, Pierce GF. AAV-mediated gene therapy for hemophilia. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2003; 5: 517-523.

47. Hauswirth WW, Lewin AS, Zolotukhin S, Muzyczka N. Production and purification of recombinant adeno-associated virus. *Met. Enzymol.* 2000; 316: 743-761.
48. McLaughlin S, Collis P, Hermonat P, Muzyczka N. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* 1988; 62: 1963-1973.
49. Linden RM, Perry VH. Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res.* 1983; 272: 145-149.
50. Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.* 1993; 24: 23-36.

Figure 1. Outline of the experimental protocol used to test the effect of AAV.MEK-CA on RGC survival in experimental glaucoma.

Following intraocular injection of viral vectors, RGCs were backlabeled with the fluorescent tracer DiI. Episcleral vein injection was performed one week after DiI application to assure that all RGCs were labeled prior to intraocular pressure increase. Retinas were examined histologically at 5 and 7 weeks following ocular hypertension surgery to determine the density of surviving RGCs

Figure 2. AAV mediates MEK-CA gene product expression in adult RGCs.

AAV-mediated MEK-CA (Panels A-C) or MEK-WT (Panels D-F) were visualized using an antibody against the HA tag present only in MEK1 transgenes. Robust HA staining was observed in a large number of cell bodies in the ganglion cell layer (GCL) and dendrites in the inner plexiform layer (IPL) (Panels A and D). RGCs were visualized using the retrograde tracer FluoroGold (FG) applied to the superior colliculus, the main target for these neurons in the rat brain (Panels B and E). Superimposition of the HA and FG staining demonstrated that the vast majority of RGCs expressed MEK-CA (Panel C) or MEK-WT (Panel F) gene product. HA immunoreactivity was not detected in retinal sections after intraocular injection of AAV.GFP (data not shown). High-power magnification demonstrated HA labeling on RGC soma and dendritic processes after infection with AAV.MEK-CA (Panel G) or AAV.MEK-WT (Panel J). Retrograde labeling with FG (Panels H and K) confirmed that RGCs expressed HA-tagged MEK proteins (Panels I and L). *In vivo* activation of Erk1/2 kinases was detected in retinal homogenates at 4 weeks after injection of AAV.MEK-CA compared to control eyes (Panel M). Western blots of total retinal extracts were probed with an antibody that selectively recognizes both Erk1 and Erk2 phosphorylated on Thr202/Tyr204 residues. The bottom panels show the same blot reprobed with an antibody to visualize total Erk1/2 protein or the HA tag, present only in the MEK transgenes. Scale bars: A-F = 100 μm , G-L = 25 μm . PS: photoreceptors segments, ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer

Figure 3. AAV.MEK-CA protects RGCs from hypertension-induced death.

Increased expression of phospho-Erk1/2 in RGCs was observed in the superior (dorsal) hemisphere (Panel A) compared to the inferior (ventral) hemisphere (Panel B) of AAV.MEK-CA injected eyes. Scale bars: 50 μm . Quantitative analysis of RGC survival following injection of AAV.MEK-CA (solid bars), AAV.MEK-wt (hatched bars) or AAV.GFP (white bars) is shown for whole retina (Panel C) or superior hemisphere only, where AAV vectors were injected (Panel D) ($n = 8-13$ rats per group). The densities of RGCs in intact, untreated retinas (gray bars) or glaucomatous, untreated retinas (striped bars) are shown as reference. MEK-CA gene transfer markedly increased the number of RGCs that survived at 5 or 7 weeks ocular hypertension surgery (ANOVA: *: $P < 0.001$; **: $P < 0.0001$). AAV.MEK-CA injection into normal, intact eyes did not increase the number of RGCs (cross-hatched bars) strongly suggests that AAV.MEK-CA promotes survival, but not proliferation, of adult RGCs. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer.

Figure 4. AAV.MEK-CA protects RGC soma from hypertension-damage

Fluorescence photomicrographs of flat-mounted retinas showing DiI-labeled RGCs in intact (Panel A) and glaucomatous retinas treated with AAV.MEK-CA (Panel B), AAV.MEK-GFP (Panel C), or untreated (Panel D) at 5 weeks after ocular hypertension surgery. Images were taken from the superior, central retina. AAV.MEK-CA treatment led to higher neuronal densities and better preservation of cellular integrity. Scale bar: 100 μ m.

Figure 5. Erk1/2 activation protects intraretinal RGC axons in glaucoma

Confocal microscopy images of intraretinal RGC axons visualized on flat-mounted retinas stained with RT-97, an antibody that recognizes the phosphorylated 200-kDa neurofilament H subunit. Immunoreactive axons coursed in organized bundles toward the optic nerve head in normal retinas (Panel A). Treatment with AAV.MEK-CA remarkably preserved the overall structure of RGC axon bundles (Panel B), while retinas treated with the control vector AAV.GFP suffered significant fiber loss at 5 weeks after hypertension surgery (Panel C). Many remaining fibers had a beaded appearance confirming the progressive axonal degeneration after glaucomatous injury. Scale bars: 20 μm .

Figure 6. AAV.MEK-CA treatment reduces optic nerve damage in glaucoma.

Cross-sections of optic nerve segments from intact (Panel A) and glaucomatous eyes treated with AAV.MEK-CA (Panel B) or AAV.MEK-WT (Panel C) at 5 weeks after ocular hypertension surgery. AAV.MEK-CA-treated eyes displayed a larger number of axonal fibers with normal morphology compared to AAV.MEK-WT-treated control eyes, which showed extensive axon degeneration including disarray of fascicular organization and degradation of myelin sheaths. Panel D shows the quantitative analysis of RGC axons in the optic nerve following injection of AAV.MEK-CA (solid bar), AAV.MEK-WT (hatched bar) or AAV.GFP (white bar) ($n = 4-7$ rats per group). The number of axons in the intact, uninjured optic nerve is shown as reference (gray bar). MEK-CA gene transfer markedly protected RGC axons at 5 weeks ocular hypertension surgery (ANOVA: *: $P < 0.05$). Data are expressed as the mean \pm S.E.M.

Supplementary Figure 1. Densitometric analysis on scanned autoradiographic films obtained from a series of 3 independent western blots each carried out using retinal samples from distinct experimental groups. The densitometric values obtained for the phosphorylated (active) Erk1/2 proteins were normalized with respect to their loading controls (total Erk1/2) in the same blot to obtain the final phosphorylated/total protein ratios. Our data indicate that a single AAV.MEK-CA injection led to a 2-fold increase in p-Erk1 (Student's t-test, $p < 0.05$) and a 1.5-fold increase in p-Erk2 (Student's t-test, $p < 0.05$) with respect to control AAV.MEK-WT retinas.

Supplementary Figure 2. Phospho-Erk1/2 immunoreactivity was examined in retinal sections from intact, untreated eyes (Panel A) and glaucomatous, untreated eyes at 5 weeks after ocular hypertension surgery (Panel B). Retinal sections were mounted on the same slide, processed simultaneously for immunohistochemistry and images were captured using identical conditions. In each case, retrograde labeling allowed visualization of RGCs. Our data show that RGCs in non-treated retinas exposed to ocular hypertension display a low, basal level of p-Erk1/2 similar to that found in normal, non-treated retinas. Scale bar: 50 μ m. ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cell layer

FIGURE 1

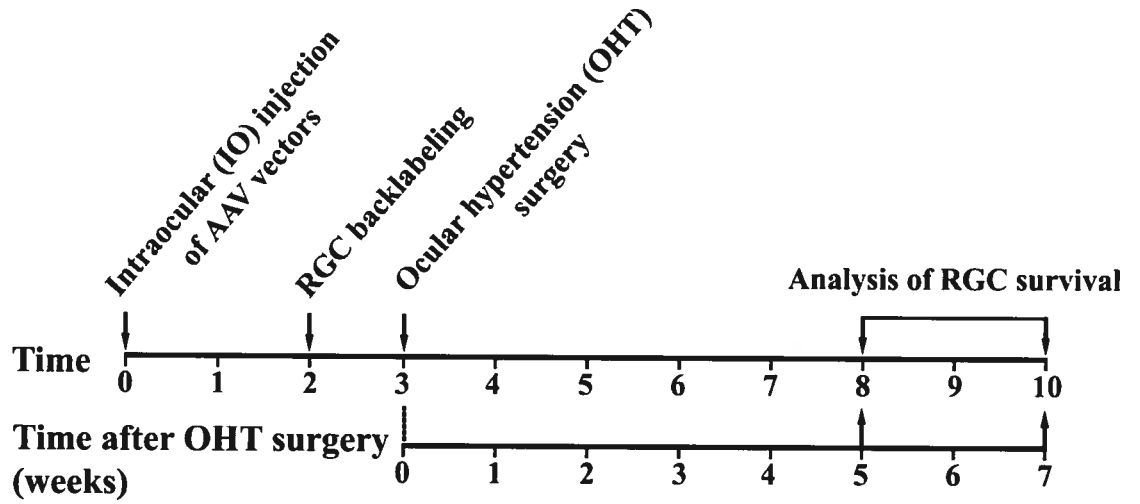


FIGURE 2

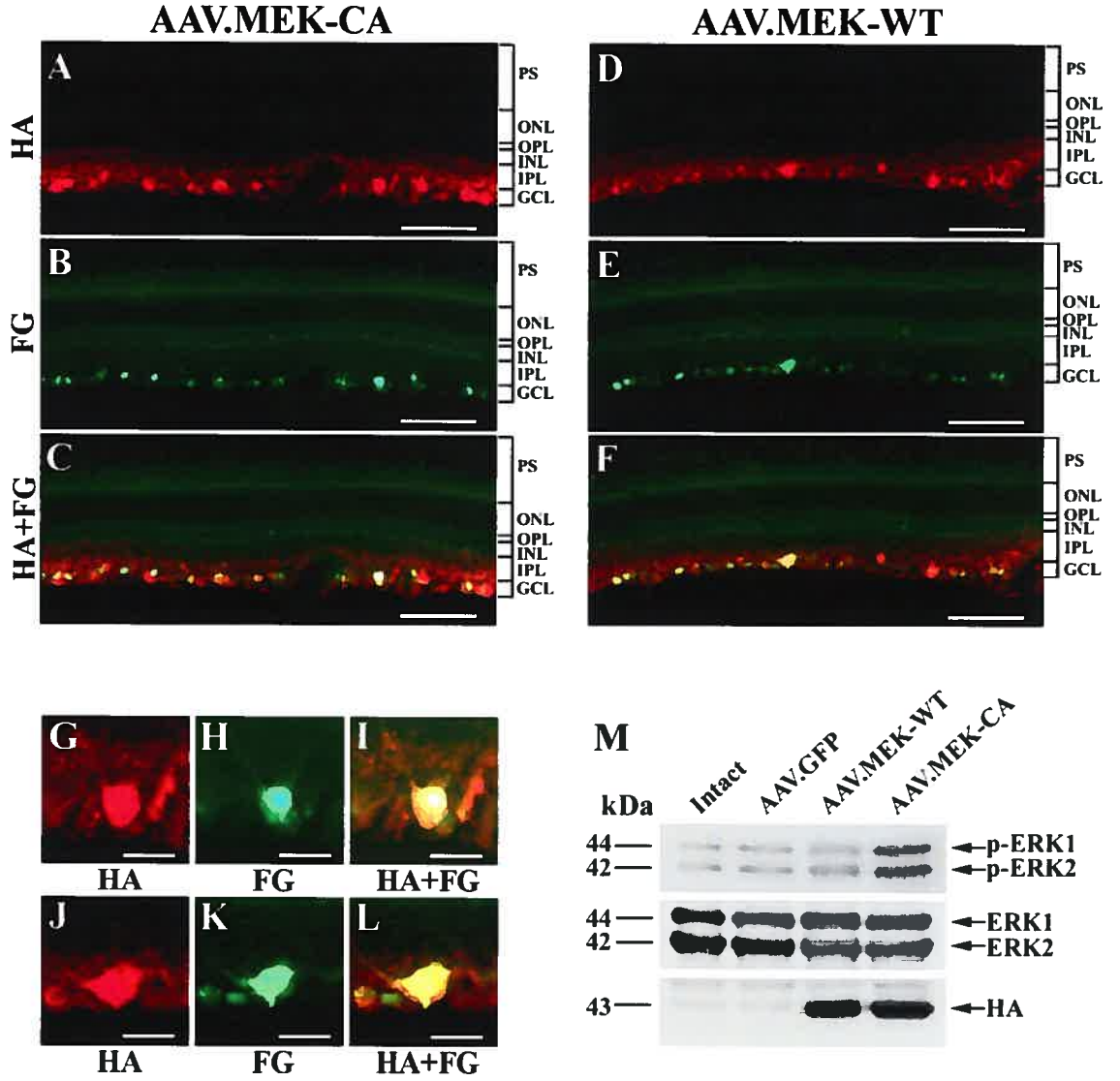


FIGURE 3

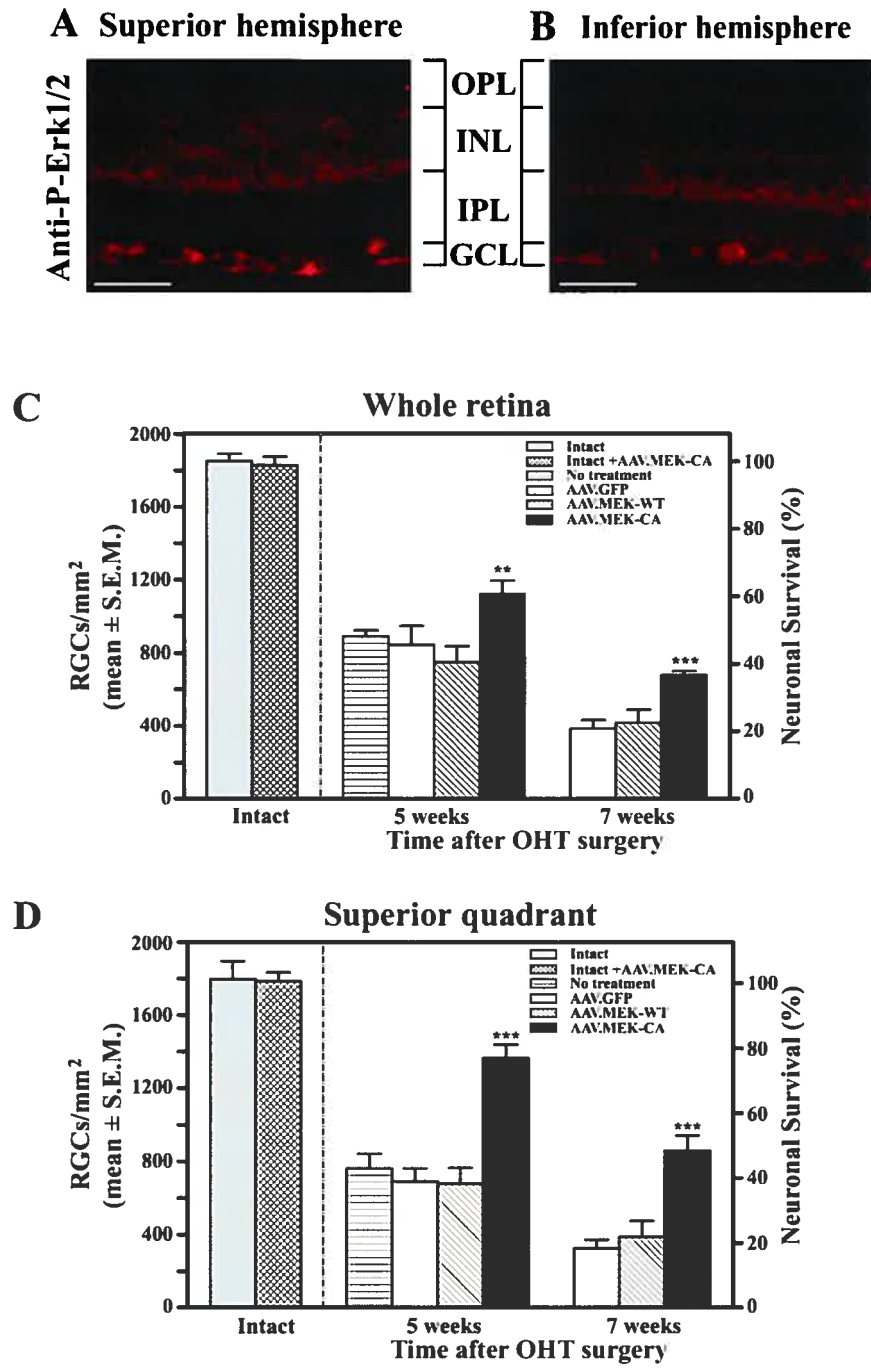


FIGURE 4

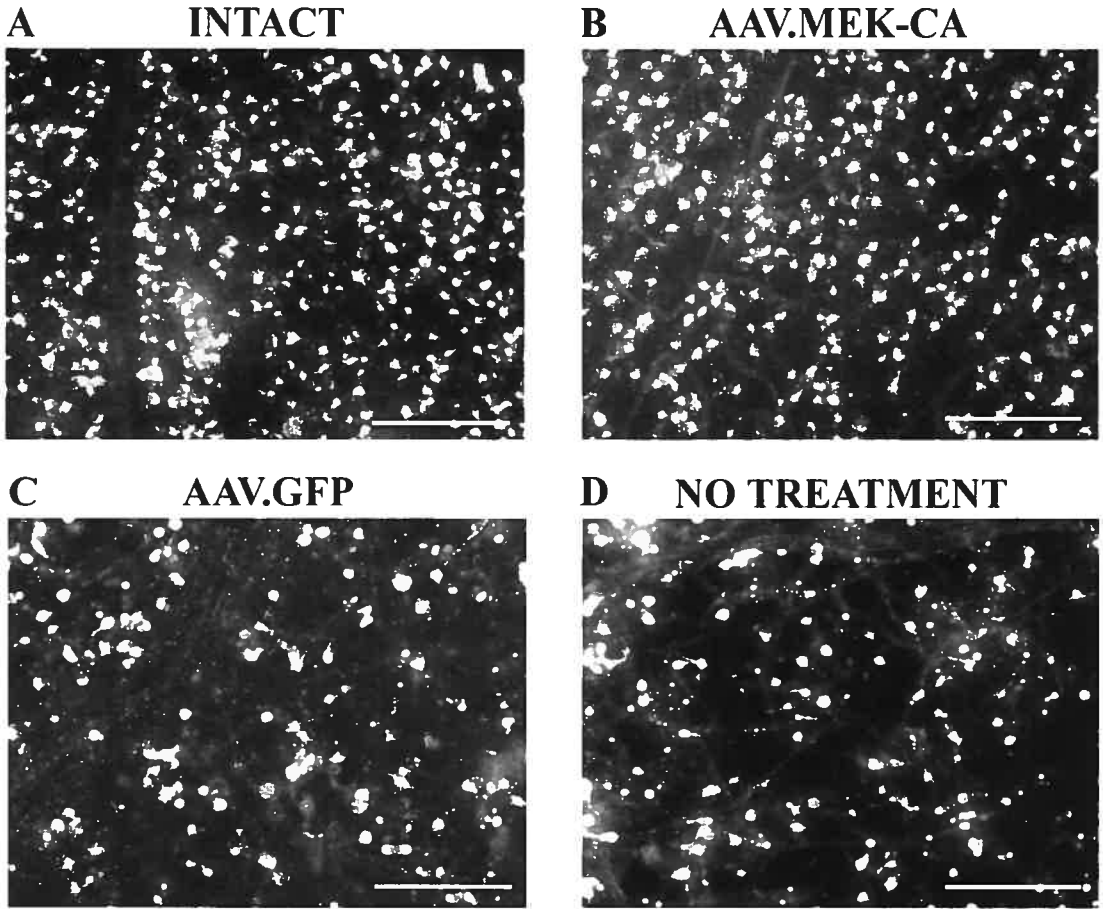


FIGURE 5

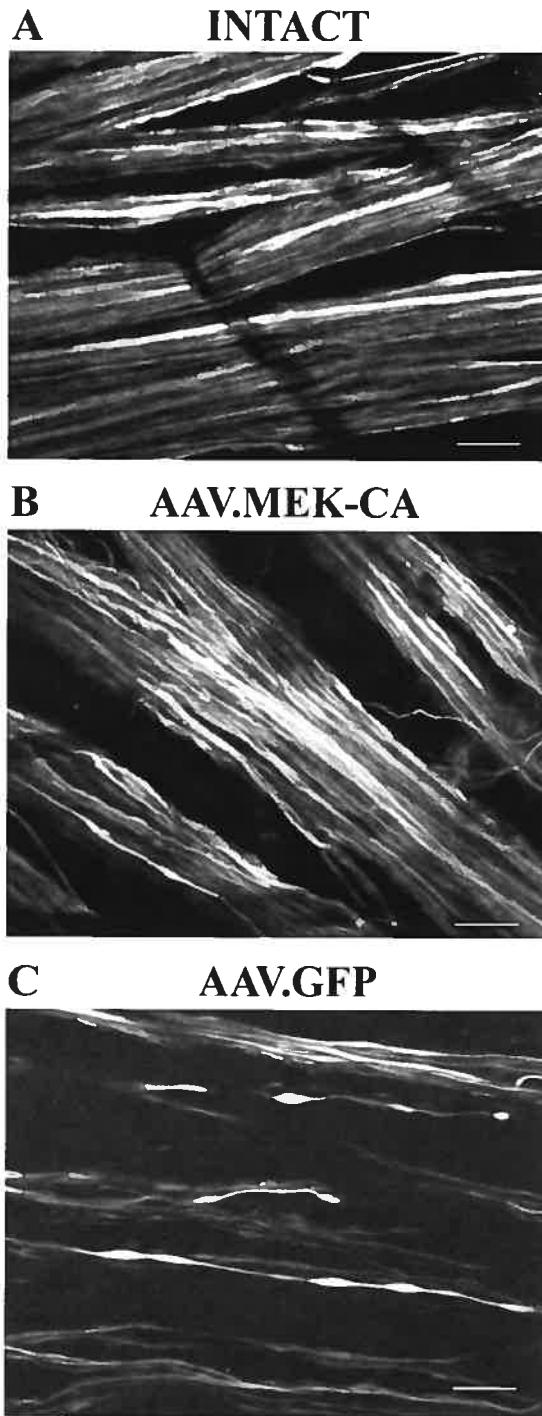
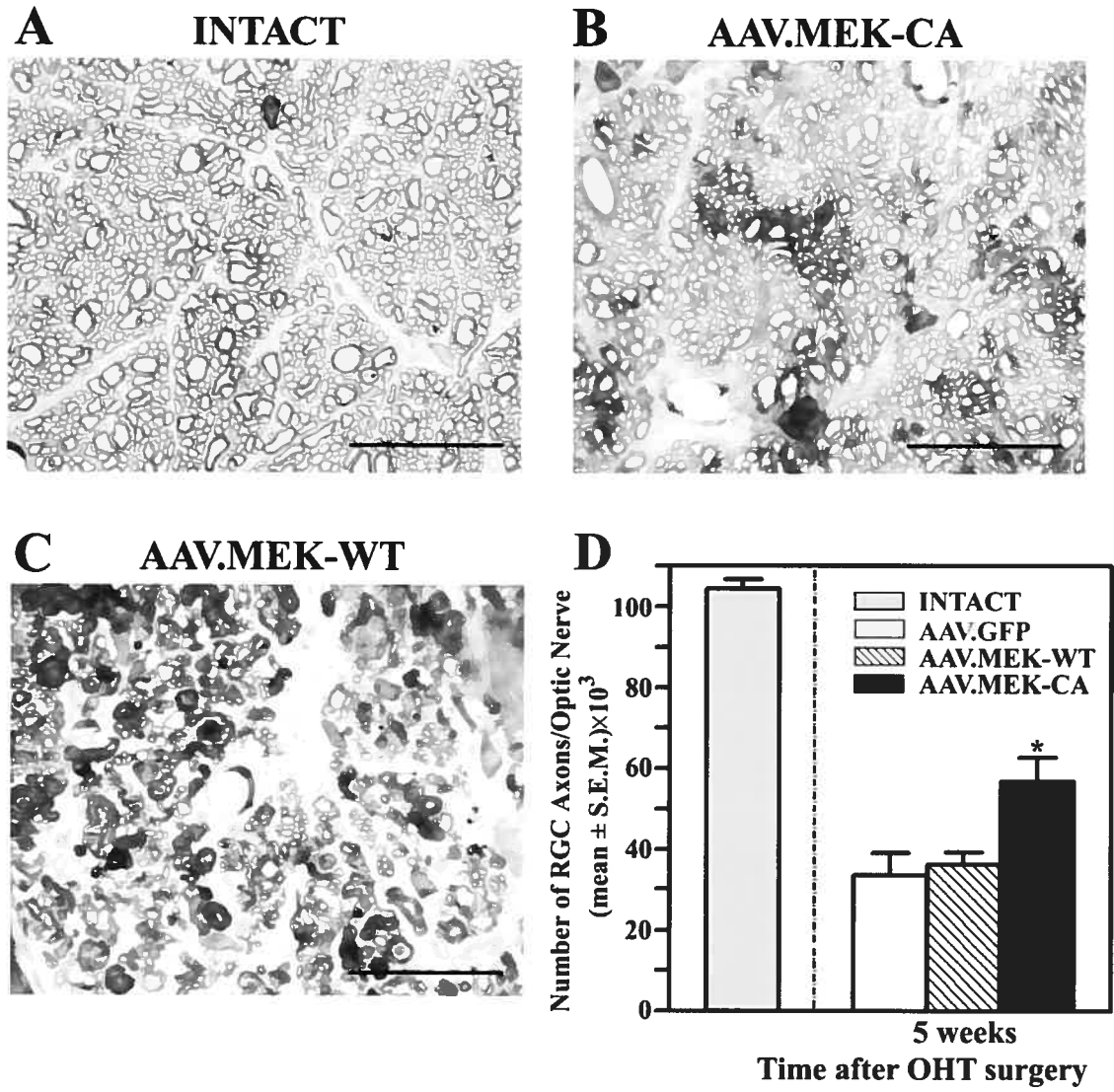
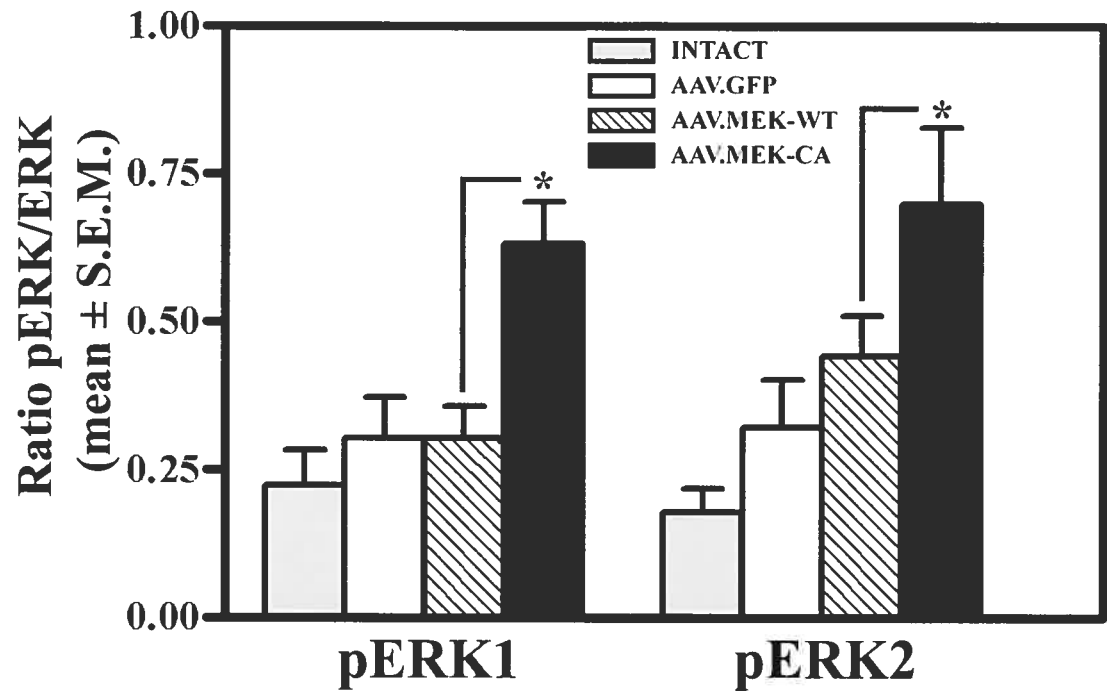


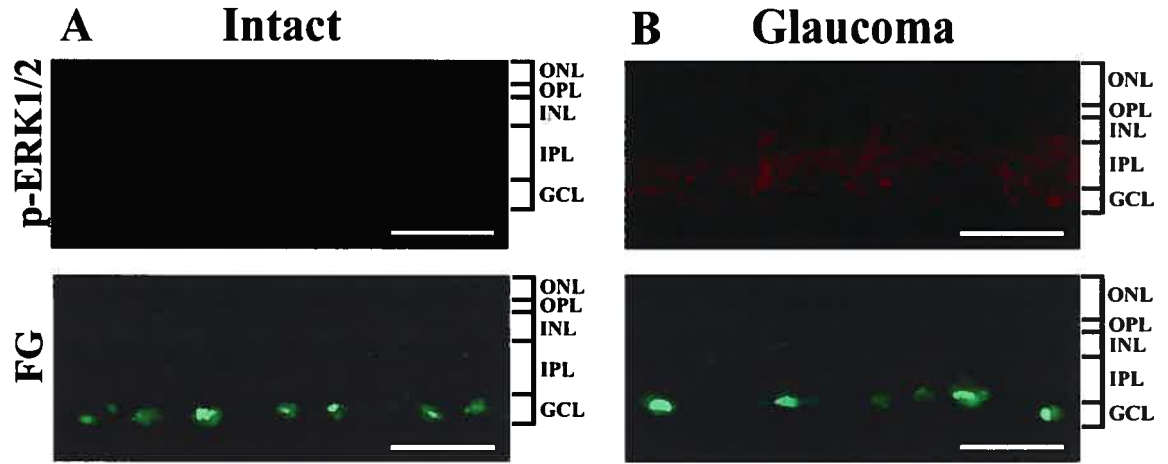
FIGURE 6

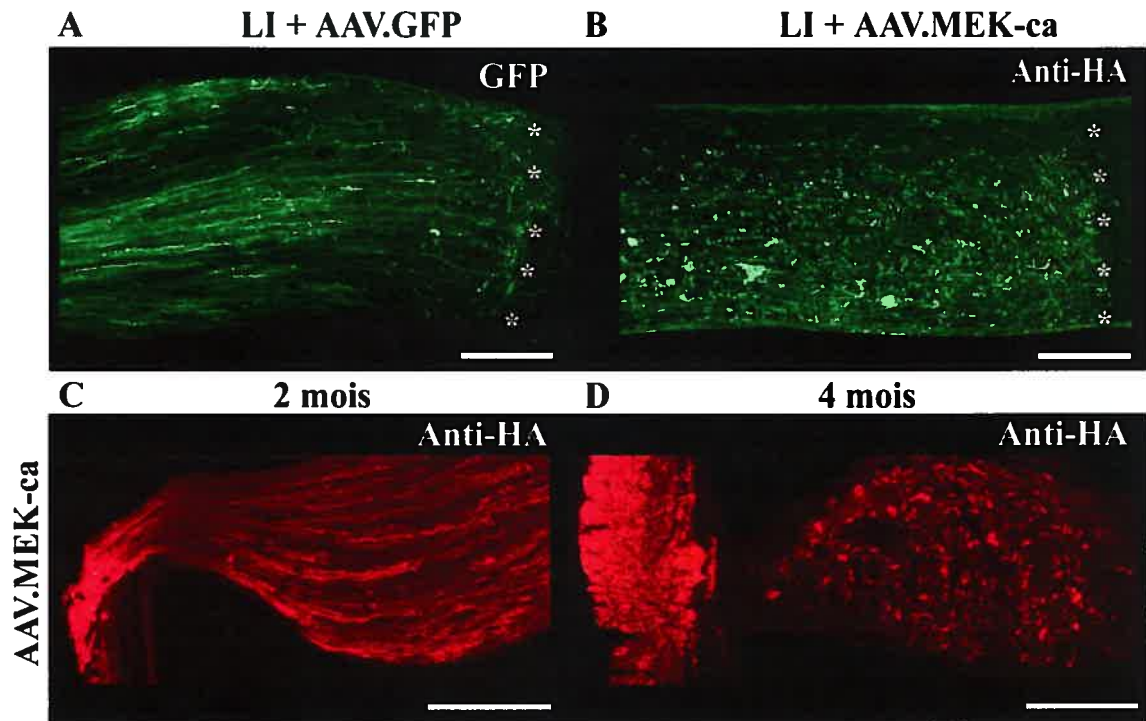


SUPPLEMENTARY FIGURE 1



SUPPLEMENTARY FIGURE 2



ANNEXE B

Dystrophie axonale causée par AAV.MEKI dans le nerf optique. (A) Deux semaines après une microlésion du nerf optique et la blessure du cristallin, les axones proximaux (à gauche de la blessure indiquée par les étoiles blanches), marqués en vert par l'expression de la protéine fluorescente verte (GFP) dans les CGRs, présentent une morphologie semblable aux axones d'un nerf intact (voir article 2, figure 5B). (B) Les axones des CGRs infectées par AAV.MEK-ca montrent une morphologie dystrophique sévère 2 semaines après la microlésion, visualisés par le marquage immunohistochimique de la séquence peptidique HA co-exprimée avec MEKI. (C) Dans le nerf intact, AAV.MEK-ca ne provoque pas de changements morphologiques des axones, 2 mois après l'injection du virus. (D) En revanche, 4 mois après l'injection d'AAV.MEK-ca, les axones apparaissent fortement dystrophiques dans la tête du nerf optique non blessé (en rouge, à droite de la photographie). Échelles : A-B= 200 μ m; C-D= 250 μ m.

ANNEXE C

CONTRIBUTIONS AUX ARTICLES

Pour l'article "**Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not regeneration, of adult injured CNS neurons *in vivo***" (Chapitre 2 de la thèse), j'ai réalisé la totalité des expériences à l'exception de la préparation du virus après le sous-clonage du transgène (MEK-ca et MEK-wt). J'ai analysé l'ensemble des données et j'ai rédigé l'article en collaboration avec ma directrice de recherche, la Dre Adriana Di Polo.

Pour l'article "**Brain-derived neurotrophic factor and lens injury act synergistically to promote retinal ganglion cell survival but lead to optic nerve dystrophy *in vivo***" (Chapitre 3 de la thèse), j'ai réalisé la totalité des manipulations expérimentales et la rédaction du manuscrit en collaboration avec ma directrice de recherche, la Dre Adriana Di Polo.

Pour l'article "**Polyamines regulate NMDA-induced retinal ganglion cell death *in vivo***" (Chapitre 4 de la thèse), j'ai réalisé la totalité des manipulations expérimentales et la rédaction du manuscrit en collaboration avec ma directrice de recherche, la Dre Adriana Di Polo.

Pour l'article "**Activation of the extracellular signal-regulated kinase ½ pathway protects retinal ganglion cells in experimental glaucoma**" (Annexe A de la thèse), j'ai participé en réalisant le sous-clonage des transgènes MEK-ca et MEK-wt, en contribuant à l'élaboration de la figure 3a et 3b du manuscrit, ainsi que par certains commentaires sur le texte de l'article.

ANNEXE D

Faculté de médecine
Département de pathologie et biologie cellulaire
THÈSES PAR ARTICLES

Les personnes suivantes autorisent :

- Le microfilmage et
- La diffusion de l'article (ou des articles) faisant partie de la thèse de :

Nom de l'étudiant : Vincent Pernet.

Titre de l'article : "Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons in vivo".


Liste des coauteurs:

Noms:

Signatures:

1. Dr. William W. Hauswirth

2. Dr. Adriana Di Polo

W. Hauswirth

A. Di Polo

Faculté de médecine
Département de pathologie et biologie cellulaire
THÈSES PAR ARTICLES

Les personnes suivantes autorisent :

- Le microfilmage et
- La diffusion de l'article (ou des articles) faisant partie de la thèse de :

Nom de l'étudiant : Vincent Pernet.

Titre de l'article : "Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy *in vivo*".

Liste des coauteurs:

Noms:

Signatures:

1. Dr. Adriana Di Polo



Faculté de médecine
Département de pathologie et biologie cellulaire
THÈSES PAR ARTICLES

Les personnes suivantes autorisent :

- Le microfilmage et
- La diffusion de l'article (ou des articles) faisant partie de la thèse de :

Nom de l'étudiant : Vincent Pernet.

Titre de l'article : "Polyamines regulate NMDA-induced retinal ganglion cell death *in vivo*".

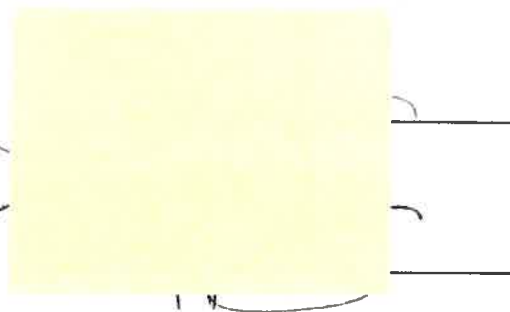
Liste des coauteurs:

Noms:

Signatures:

1. Dr. Adriana Di Polo

2. Mr Philippe Bourgeois



Faculté de médecine
Département de pathologie et biologie cellulaire
THÈSES PAR ARTICLES

Les personnes suivantes autorisent :

- Le microfilmage et
- La diffusion de l'article (ou des articles) faisant partie de la thèse de :

Nom de l'étudiant : Vincent Pernet.

Titre de l'article : "Activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by AAV gene transfer protects retinal ganglion cells in glaucoma".

Liste des coauteurs:

Noms:

1. Dr. Yu Zhou

2. Dr. William W. Hauswirth

3. Dr. Adriana Di Polo

Signatures:

