

Université de Montréal

**Régénération des cellules ganglionnaires de la rétine chez l'adulte :  
inhibition de la croissance axonale et vaccin pro-régénératif**

Par  
Benjamin Ellezam-St-Denis

Département de physiologie  
Faculté de Médecine

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

Décembre, 2001

© Benjamin Ellezam-St-Denis, 2001



W  
4  
U58  
2002  
V. 080

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse de doctorat intitulée :

**Régénération des cellules ganglionnaires de la rétine chez l'adulte : inhibition de la croissance axonale et vaccin pro-régénératif**

présentée par :

Benjamin Ellezam-St-Denis

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

*Laurent Descarries*  
président-rapporteur

*Lisa McKerracher*  
directeur de recherche

*Adriana Di Polo*  
membre du jury

*Jean-Pierre Julien*  
examineur externe

*Elvire Vaucher*  
représentant du doyen de la FES

*Thèse acceptée le 23 mai 2002*

## RÉSUMÉ

Pour étudier l'échec régénératif propre au système nerveux central du mammifère adulte, nous nous sommes penchés sur le système visuel du rat. Nous avons examiné la contribution possible du facteur chimiotropique nétrine-1 à la régulation des capacités régénératives des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR). Nous avons montré par immunohistochimie et hybridation *in situ* que les récepteurs de nétrine-1, DCC et UNC5H2, sont exprimés par les CGR adultes. Quant au ligand, nétrine-1, il est exprimé tant par la glie du nerf optique que par celle du nerf sciatique. La régénération des CGR induite par une greffe de nerf périphérique n'a pas entraîné d'élévation d'expression intéressant les récepteurs de nétrine-1. Au contraire, peu importe leur capacité à régénérer un axone, les CGR axotomisées présentent une régulation à la baisse des ARNm de *Dcc* et *Unc5h2*. D'autre part, nous avons montré que le ligand nétrine-1, comme d'autres molécules de guidage axonal, est co-exprimé avec ses récepteurs par les CGR adultes. Ces résultats suggèrent que nétrine-1 joue un rôle dans la rétine adulte, et contribue, possiblement, à réguler les capacités régénératives des CGR. Pour mieux étudier la régénération, nous avons développé un nouveau modèle de lésion du nerf optique. Par microécrasement à l'aide d'un fil à suture 10.0, nous sommes parvenus à axotomiser toutes les CGR et produire un site de lésion circonscrit, dont la netteté sans précédent permet de mesurer avec exactitude la régénération axonale. Par marquage antérograde, nous avons pu démontrer la rétraction des axones lésés, suivie de leur croissance rapide. Celle-ci s'interrompt brusquement au site de lésion, lequel montre une forte immunoréactivité aux protéoglycanes à chondroïtine sulfatée (CSPG), suggérant une

contribution importante de ces glycoprotéines au blocage de la régénération. Cette zone CSPG-positif est GFAP-négative et dépourvue de myéline, alors que celle-ci demeure présente dans le nerf optique distal. Les axones ayant régénéré spontanément dans cette région ne la pénètrent que sur de courtes distances, suggérant que les inhibiteurs de croissance associés à la myéline puissent aussi contribuer à l'échec régénératif. Dans ce modèle de microécrasement, nous avons aussi évalué une nouvelle approche pour promouvoir la régénération : l'induction d'une réaction immunitaire pro-régénérative par suite d'une administration répétée d'un homogénat de moelle épinière. Ce vaccin est parvenu à stimuler la croissance des axones rétiniens au-delà du site de lésion. Pour préciser la nature de cet effet, nous avons testé la présence d'anticorps dirigés contre des protéines inhibitrices de la croissance axonale dans le sérum des animaux vaccinés. Bien que nous ayons détecté des anticorps contre la protéine basique de la myéline, aucun anticorps n'a été détecté contre NogoA, le récepteur de Nogo-66, la *myelin-associated glycoprotein* (MAG), ou contre les CSPG. La pré-incubation des substrats de culture avec les sérums d'animaux vaccinés a contrecarré l'effet inhibiteur de la myéline mais pas celui des CSPG. Notre vaccin n'a pas réduit la mort cellulaire induite par l'axotomie. Ces résultats laissent supposer que le vaccin stimule la régénération axonale sans affecter la survie cellulaire, et suggèrent qu'il ne s'agit pas d'un effet imputable à l'inactivation de protéines inhibitrices par des anticorps, mais plutôt à la liaison des anticorps aux protéines principales de la myéline.

**Mots-clés :** *nétrine, dcc, unc5h2, MAG, CSPG, NogoA, nerf optique, axotomie, écrasement, neuroprotection*

## SUMMARY

Injured axons don't successfully regenerate in the adult mammalian central nervous system. To study this regenerative failure we have turned to the adult rat visual system. We examined a possible contribution of chemotropic factor netrin-1 in the regulation of retinal ganglion cell (RGC) regenerative capacity. We showed that netrin-1 receptors DCC and UNC5H2 are expressed by adult RGCs. The ligand netrin-1, in turn, is expressed by both optic nerve and sciatic nerve glia. Peripheral nerve graft-induced RGC regeneration did not lead to increases in netrin-1 receptor expression. Regardless of regenerative outcome, axotomized RGCs downregulated both *Dcc* and *Unc5h2* mRNA. We have also shown that the ligand netrin-1, like other guidance molecules, is co-expressed with its receptors in adult RGCs. These results suggest that netrin-1 plays a role in the adult retina and may contribute to regulating RGC regenerative capacity. To help study regeneration, we have developed a new model of optic nerve injury. We have characterized a microcrush lesion made with 10.0 sutures to completely transect RGC axons. The well-defined lesion site that it produces allows accurate measurements of axon regeneration. By anterograde labelling, we showed axons retracting and growing back to stop abruptly at the lesion site, where a sharp line of chondroitin-sulphate proteoglycan (CSPG) immunoreactivity was detected, suggesting their implication in regenerative failure. The CSPG-positive lesion site was GFAP-negative and myelin-free, but myelin was still present in the distal optic nerve. Axons that had spontaneously regenerated in that area did not extend long distances, suggesting that myelin-derived growth inhibitors also contribute to RGC regenerative failure. Using the microcrush lesion model, we

examined a new approach to promote axon regeneration: the induction of a pro-regenerative immune response by repetitive vaccination with spinal cord homogenate (SCH). This vaccine stimulated RGC axon growth across the lesion site. To clarify the nature of this effect we tested the serum of vaccinated animals for antibodies against growth-inhibitory proteins. While we detected antibodies against myelin basic protein, antibodies against myelin-associated glycoprotein, NogoA, Nogo-66 receptor or CSPG were not detected. Pre-incubating culture substrates with serum of vaccinated animals blocked growth inhibition on myelin but not on CSPG. Our vaccine did not protect RGCs from axotomy-induced cell death. Thus, our results show that vaccination with SCH stimulates axon regeneration independently of cell survival, and suggest that this effect is not mediated by antibody blocking of growth-inhibitory proteins, but rather by the binding of antibodies to major myelin proteins.

*Key words: netrin, dcc, unc5h2, MAG, CSPG, NogoA, optic nerve, axotomy, crush, neuroprotection*

# TABLE DES MATIÈRES

	RÉSUMÉ.....	III
	SUMMARY.....	V
	TABLE DES MATIÈRES.....	VII
	LISTE DES TABLEAUX.....	XII
	LISTE DES FIGURES.....	XIII
	LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	XVI
	REMERCIEMENTS.....	XVIII
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>RÉGÉNÉRATION DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL : LES PREMIERS PAS.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>LE NERF OPTIQUE COMME MODÈLE DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL ....</b>	<b>8</b>
1.2.1	<i>Ontogenèse de la rétine et du nerf optique.....</i>	9
1.2.1.1	Développement de la rétine.....	9
1.2.1.2	Axogenèse des cellules ganglionnaires : croissance initiale.....	12
1.2.1.3	Axogenèse des cellules ganglionnaires : croissance vers la fissure.....	13
1.2.1.4	Développement du nerf optique.....	15
1.2.2	<i>Expression génique dans les cellules ganglionnaires après axotomie et durant la régénération.....</i>	20
1.2.2.1	GAP-43, un corrélat de l'état régénératif.....	20
1.2.2.2	Régulation du cytosquelette.....	21
1.2.2.3	Gènes précoces et régénération.....	22
1.2.3	<i>Mort et survie des cellules ganglionnaires.....</i>	24
1.2.3.1	L'axotomie entraîne l'apoptose.....	25
1.2.3.2	L'apoptose induite par la perte de facteurs trophiques?.....	25
1.2.3.3	L'apoptose induite par excitotoxicité?.....	29
1.2.3.4	Stratégies pour la survie : facteurs trophiques.....	31
1.2.3.5	Stratégies pour la survie : excitotoxicité et antiapoptotiques.....	34
1.2.3.6	Stratégies pour la survie : modulation de l'immunité.....	35
<b>1.3</b>	<b>HYPOTHÈSES SUR L'ÉCHEC RÉGÉNÉRATIF DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL ET STRATÉGIES STIMULATRICES.....</b>	<b>37</b>
1.3.1	<i>Protéines inhibitrices de la myéline.....</i>	38
1.3.1.1	L'inhibition par Nogo.....	40
1.3.1.2	L'inhibition par MAG.....	41



1.3.2	<i>Cicatrice gliale : barrière physique et chimique</i> .....	44
1.3.3	<i>Perte de l'aptitude à la régénération et modulation de la signalisation</i> .....	49
1.3.3.1	Les neurones du système nerveux central intrinsèquement désavantagés?.....	49
1.3.3.2	Stimuler la régénération axonale au niveau du corps cellulaire .....	50
1.3.3.3	Une voie de signalisation purement régénérative? .....	51
1.3.3.4	L'inhibition est modulable.....	52b
1.3.3.5	Conclusions sur l'échec régénératif .....	52b
<b>2</b>	<b>PREMIER ARTICLE</b> .....	<b>53</b>
<b>2.1</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>55</b>
<b>2.2</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>56</b>
<b>2.3</b>	<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>58</b>
2.3.1	<i>Surgery and tissue preparation for histology</i> .....	58
2.3.2	<i>Immunohistochemistry</i> .....	59
2.3.3	<i>In situ hybridization</i> .....	60
2.3.4	<i>Quantitative analysis</i> .....	61
2.3.5	<i>Western blot analysis</i> .....	62
2.3.6	<i>Northern blot analysis</i> .....	63
<b>2.4</b>	<b>RESULTS</b> .....	<b>63</b>
2.4.1	<i>Netrin and netrin receptor expression in the adult retina</i> .....	63
2.4.2	<i>Netrin receptors are down-regulated in RGCs after axotomy</i> .....	64
2.4.3	<i>Netrin receptors in regenerating RGCs</i> .....	67
2.4.4	<i>Netrins are expressed in adult optic and sciatic nerve</i> .....	69
2.4.5	<i>Netrin-1 mRNA is expressed by glial cells in adult optic and sciatic nerve</i> .....	72
<b>2.5</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>74</b>
<b>3</b>	<b>DEUXIÈME ARTICLE</b> .....	<b>80</b>
<b>3.1</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>82</b>
<b>3.2</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>83</b>
<b>3.3</b>	<b>METHODS</b> .....	<b>85</b>
3.3.1	<i>Surgical procedures and RGC survival studies</i> .....	85
3.3.2	<i>Anterograde labeling</i> .....	86
3.3.3	<i>Histological and immunostaining procedures</i> .....	87

<b>3.4</b>	<b>RESULTS.....</b>	<b>88</b>
3.4.1	<i>Microcrush lesions of the optic nerve and RGC survival .....</i>	88
3.4.2	<i>Cellular response to microcrush lesions .....</i>	91
3.4.3	<i>Anterograde tracing studies .....</i>	93
3.4.4	<i>GFAP and CSPG immunoreactivity and myelin staining after optic nerve lesion... 94</i>	
<b>3.5</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>97</b>
<b>4</b>	<b>TROISIÈME ARTICLE.....</b>	<b>102</b>
<b>4.1</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>104</b>
<b>4.2</b>	<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>107</b>
4.2.1	<i>Immunization and surgery.....</i>	107
4.2.2	<i>Anterograde labeling and quantification of regeneration .....</i>	108
4.2.3	<i>Retrograde labeling and quantification of survival .....</i>	108
4.2.4	<i>Time-course of serum IgG and IgM .....</i>	109
4.2.5	<i>Immunohistochemistry for immunoglobulins.....</i>	110
4.2.6	<i>Western blot analysis .....</i>	110
4.2.7	<i>ELISA for antigen specific immunoglobulins.....</i>	112
4.2.8	<i>Cell culture .....</i>	112
<b>4.3</b>	<b>RESULTS.....</b>	<b>113</b>
4.3.1	<i>Regeneration of RGC Axons after Optic Nerve Microcrush .....</i>	113
4.3.2	<i>Antibody Reaction Following Vaccination .....</i>	115
4.3.2.1	<i>Time-course of IgG and IgM production.....</i>	115
4.3.2.2	<i>Antibody-binding to spinal cord homogenate and growth-inhibitory proteins .....</i>	118
4.3.2.3	<i>Antibody binding in the optic nerve .....</i>	121
4.3.3	<i>Effect of SCH antiserum on RGC Neurite Outgrowth .....</i>	124
4.3.4	<i>RGC Survival after Optic Nerve Microcrush .....</i>	124
<b>4.4</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>127</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>134</b>
<b>5.1</b>	<b>NÉTRINE-1 ET SES RÉCEPTEURS DANS LE SYSTÈME VISUEL ADULTE : RÔLE POSSIBLE DANS LA MODULATION DES CAPACITÉS RÉGÉNÉRATIVES DES CELLULES GANGLIONNAIRES DE LA RÉTINE.....</b>	<b>135</b>
5.1.1	<i>Expression constitutive de nétrine-1 et de ses récepteurs chez l'adulte : rôles possibles .....</i>	136
5.1.2	<i>Modulations d'expression après lésion et lors de la régénération : les nétrines inhibitrices de la croissance axonale dans le système visuel adulte? .....</i>	140

5.1.3	<i>D'autres molécules de guidage axonal exprimées chez l'adulte?</i> .....	144
5.1.4	<i>Perspectives d'avenir</i> .....	147
<b>5.2</b>	<b>LA MICROLÉSION DU NERF OPTIQUE : UN MODÈLE DE CHOIX POUR L'ÉTUDE DE LA RÉGÉNÉRATION EN MILIEU INHIBITEUR</b> .....	<b>148</b>
5.2.1	<i>Conclusions sur les composantes cellulaires et moléculaires du site de lésion</i> ...	149
5.2.2	<i>Réponse axonale initiale et échec régénératif</i> .....	152
5.2.3	<i>Perspectives d'avenir</i> .....	154
<b>5.3</b>	<b>UN VACCIN POUR CONTRECARRER L'ÉCHEC RÉGÉNÉRATIF DANS LE NERF OPTIQUE : MÉCANISMES POSSIBLES</b> .....	<b>155</b>
5.3.1	<i>Efficacité d'une approche par vaccin pour stimuler la régénération axonale : rôle des anticorps</i> .....	156
5.3.2	<i>Comparaison des méthodes de vaccination : lymphocytes T et survie cellulaire</i> ..	161
5.3.3	<i>Perspectives d'avenir</i> .....	164
<b>5.4</b>	<b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES</b> .....	<b>166</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>169</b>
	<b>ANNEXE I – ATA ET SURVIE CELLULAIRE</b> .....	<b>XIX</b>
	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>XIX</b>
	<b>MÉTHODES</b> .....	<b>XIX</b>
	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>XX</b>
	<b>RÉFÉRENCE</b> .....	<b>XX</b>
	<b>ANNEXE II – MARQUAGE DU CORTEX MOTEUR</b> .....	<b>XXI</b>
	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>XXI</b>
	<b>MÉTHODES</b> .....	<b>XXI</b>
	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>XXII</b>
	<b>ANNEXE III – QUATRIÈME ARTICLE</b> .....	<b>XXIV</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XXVI</b>
	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>XXVII</b>
	<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>XXIX</b>
	<i>Cell culture</i> .....	<i>xxix</i>
	<i>Preparation of recombinant C3 and Y27632</i> .....	<i>xxix</i>
	<i>Spinal cord injury and delivery of Rho and Rho kinase inhibitors</i> .....	<i>xxx</i>
	<i>Anterograde labeling</i> .....	<i>xxx</i>
	<i>In situ hybridization</i> .....	<i>xxx</i>

<i>Behavioral testing</i> .....	xxx <i>i</i>
<b>RESULTS</b> .....	<b>XXXIII</b>
<i>Inactivation of Rho or ROK promotes growth on primary neurons plated on complex inhibitory substrates</i> .....	xxxiii
<i>Treatment of injured spinal cord promotes long distance regeneration</i> .....	xxxiii
<i>Effect of C3 on the expression of GAP-43 mRNA in the motor cortex of spinal cord injured animals</i> .....	xxxvi
<i>Behavioral testing</i> .....	xxxviii
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>XL</b>
<b>ANNEXE IV – CINQUIÈME ARTICLE</b> .....	<b>LIII</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>LV</b>
<b>REGULATION OF RHO GTPASES</b> .....	<b>LVI</b>
<b>INACTIVATION OF RHO BY C3-TRANSFERASE PROMOTES NEURITE GROWTH</b> .....	<b>LXI</b>
<b>INACTIVATION OF RHO IS SUFFICIENT TO PROMOTE NEURITE GROWTH ON INHIBITORY SUBSTRATES.</b> .....	<b>LXIII</b>
<b>THE OPTIC NERVE MICROCRUSH MODEL TO STUDY <i>IN VIVO</i> AXON REGENERATION</b> .....	<b>LXIV</b>
<b>C3 PROMOTES AXON REGENERATION OF RETINAL GANGLION CELL AXONS <i>IN VIVO</i></b> .....	<b>LXVIII</b>
<b><i>IN VIVO</i> SPINAL CORD INJURY EXPERIMENTS</b> .....	<b>LXX</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>LXXII</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>LXXIV</b>
<b>ANNEXE V – CONTRIBUTION AUX ARTICLES</b> .....	<b>LXXX</b>

# LISTE DES TABLEAUX

## INTRODUCTION

*TABLEAU I Comparaison des différentes approches favorisant la survie des cellules  
ganglionnaires telles que rapportées dans la littérature.....32*

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

<b>FIGURE 1</b> <i>Cupule optique et vésicule cristalliniene</i> .....	10
<b>FIGURE 2</b> <i>Parcours des cônes de croissance des CGR vers le nerf optique</i> .....	10
<b>FIGURE 3</b> <i>Mécanismes cellulaires pro-apoptotiques déclenchés par l'axotomie</i> .....	27
<b>FIGURE 4</b> <i>Hypothèses actuelles sur l'échec régénératif des axones du système nerveux central</i> .....	39

### PREMIER ARTICLE

<b>FIGURE 1</b> <i>Expression de nétrine et de DCC dans la rétine adulte</i> .....	65
<b>FIGURE 2</b> <i>Hybridation in situ montrant l'expression des transcrits de Dcc et Unc5h2 dans la rétine intacte ou lésée</i> .....	66
<b>FIGURE 3</b> <i>Quantification des changements d'expression de Dcc et Unc5h2 dans les cellules ganglionnaires lésées</i> .....	68
<b>FIGURE 4</b> <i>Expression de Dcc et Unc5h2 dans les cellules ganglionnaires qui régénèrent par suite d'une greffe de nerf périphérique</i> .....	70
<b>FIGURE 5</b> <i>Quantification des changements d'expression de Dcc et Unc5h2 dans les cellules ganglionnaires en régénération</i> .....	71
<b>FIGURE 6</b> <i>Immunoblot montrant l'expression de nétrine dans le nerf optique et le nerf sciatique</i> .....	73
<b>FIGURE 7</b> <i>Northern blot montrant l'expression de nétrine-1 dans la glie du nerf optique et du nerf sciatique</i> .....	73
<b>FIGURE 8</b> <i>Immunoréactivité à la nétrine dans le nerf optique</i> .....	75

### DEUXIÈME ARTICLE

<b>FIGURE 1</b> <i>La lésion par microécrasement axotomise toutes les cellules ganglionnaires</i> .....	89
---	----

<b>FIGURE 2</b> Quantification de la survie des cellules ganglionnaires après microécrasement du nerf optique.....	90
<b>FIGURE 3</b> Le site de lésion 24 h à 8 semaines après microécrasement .....	92
<b>FIGURE 4</b> Immunoréactivité à la laminine montrant la néovascularisation.....	95
<b>FIGURE 5</b> Immunoréactivité à la GFAP et aux CSPG .....	96
<b>FIGURE 6</b> Marquage de la myéline au bleu de Luxol.....	98

### TROISIÈME ARTICLE

<b>FIGURE 1</b> Effet du vaccin pro-régénératif sur les cellules ganglionnaires axotomisées.....	114
<b>FIGURE 2</b> Quantification de la régénération axonale induite par le vaccin.....	116
<b>FIGURE 3</b> Décours temporel de la réponse en IgG et IgM au vaccin .....	117
<b>FIGURE 4</b> Analyse western montrant l'absence d'anticorps sériques dirigés contre des protéines inhibitrices de la croissance.....	119
<b>FIGURE 5</b> Les anticorps produits par les animaux traité à l'homogénat de moelle épinière se lient aux extraits complets de moelle épinière et à MBP mais pas aux protéines inhibitrices connues.....	122
<b>FIGURE 6</b> Pénétration des anticorps dans la matrice du nerf optique chez les animaux vaccinés avec un homogénat de moelle épinière ou un homogénat de foie .....	123
<b>FIGURE 7</b> Le serum des animaux vaccines contrecarre l'effet inhibiteur de la myéline mais pas celui des CSPG .....	125
<b>FIGURE 8</b> Quantification de la survie des cellules ganglionnaires après microécrasement du nerf optique et administration d'un vaccin pro-régénératif .....	126

### QUATRIÈME ARTICLE

<b>FIGURE 1</b> Effet in vitro de l'inhibition de la voie de signalisation de Rho sur la croissance neuritique en présence de myéline .....	xxxiv
<b>FIGURE 2</b> Effet in vivo de l'inhibition de Rho sur la croissance axonale après hémisection de la moelle épinière .....	xxxv

<b>FIGURE 3</b> Quantification de la régénération axonale du faisceau cortico-spinal après inhibition de la voie de signalisation de Rho .....	xxxvii
<b>FIGURE 4</b> Expression de l'ARNm de GAP-43 dans le cortex moteur après hémisection de la moelle épinière et traitement avec C3.....	xxxix
<b>FIGURE 5</b> Tests comportementaux pour évaluer la récupération fonctionnelle après traitement avec C3 .....	xli

## CINQUIÈME ARTICLE

<b>FIGURE 1</b> Diagramme illustrant les divers signaux associés à la croissance qui convergent vers Rho .....	lix
<b>FIGURE 2</b> C3 rend possible la croissance neuritique sur substrat inhibiteur.....	lxii
<b>FIGURE 3</b> C3 stimule la régénération axonale après microécrasement du nerf optique....	lxvi



## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

6-TG .....	6-thioguanine
a, bFGF.....	<i>acidic, basic fibroblast growth factor</i>
AMPA .....	acide $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique
ATA.....	acide aurintricarboxylique
BBB.....	Basso-Beattie-Bresnahan
BDNF.....	brain-derived neurotrophic factor
CFA.....	<i>complete Freund's adjuvant</i>
CGR.....	cellules ganglionnaires de la rétine
cNOS.....	<i>constitutive nitric oxide synthase</i>
CNS.....	<i>central nervous system</i>
CNTF.....	ciliary neurotrophic factor
CSPG.....	protéoglycanes à chondroïtine sulfate
CST.....	<i>corticospinal tract</i>
DCC.....	deleted in colorectal cancer
EAE.....	encéphalomyélite autoimmune expérimentale
ELISA.....	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FL.....	fore limb
GAP.....	<i>GTPase activating protein</i>
GDNF.....	glial cell line-derived neurotrophic factor
GEF.....	<i>guanine exchange factor</i>
GFAP.....	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GR.....	ganglions rachidiens

HF.....	homogénat de foie
HL.....	<i>hind limb</i>
HME.....	homogénat de moelle épinière
IFA.....	<i>incomplete Freund's adjuvant</i>
LH.....	<i>liver homogenate</i>
LT.....	lymphocytes T
L-TC.....	L-thiocitrulline
MAG.....	myelin associated glycoprotein
MAPK.....	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP.....	<i>myelin basic protein</i>
MIF.....	<i>macrophage inhibitory factor</i>
MOG.....	<i>myelin-oligodendrocyte glycoprotein</i>
NGF.....	nerve growth factor
NgR.....	<i>Nogo-66 receptor</i>
NMDA.....	N-méthyl-d-aspartate
NT-3.....	neurotrophic factor 3
NT-4/5.....	neurotrophic factor 4/5
PKN.....	protéine kinase N
PLP.....	<i>proteolipid protein</i>
RGC.....	retinal ganglion cell
ROK.....	<i>Rho-associated kinase</i>
SCH.....	<i>spinal cord homogenate</i>
SCI.....	spinal cord injury

au ninu

## REMERCIEMENTS

Ces quatre années passées dans le laboratoire n'auraient pas été aussi formatrices, aussi stimulantes, et aussi agréables sans :

- la présence et l'enthousiasme exceptionnels de ma directrice de recherche, Lisa McKerracher;
- l'humour et l'encouragement de Nicole Leclerc;
- l'esprit de Maxime Lehmann;
- l'infatigable dévouement de Charlie;
- et la particulière indulgence de mes collègues du labo.

Je tiens aussi à remercier le Groupe de recherche sur le système nerveux central, la Faculté des études supérieures, le Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche, et le Fonds de recherche en santé du Québec pour leur soutien financier.

# 1 INTRODUCTION

« Peut-être, durant l'ontogenèse, les neurones ou les neuroblastes eurent-ils une phase de sécrétion neurotrophe spécifique; peut-être les éléments épendymaires collaborèrent-ils aussi chimiquement aux processus de soutien et d'orientation. Mais la noblesse fonctionnelle du cerveau imposa aux neurones deux douloureuses lacunes : l'incapacité proliférative et l'irréversibilité de leur différenciation intraprotoplasmique. C'est donc pour cette raison, qu'une fois achevé le développement, les sources de croissance et de régénération des axones et dendrites, définitivement se tarirent. Il est important de reconnaître que dans les centres adultes, les voies nerveuses sont une chose fixe, achevée, immuable. Tout peut mourir, rien ne se régénère.

Il appartiendra à la science de l'avenir de renverser, si possible, ce dur décret. Inspirée de grands idéaux, elle devra s'efforcer d'empêcher ou de modérer le déclin progressif des neurones, de surmonter la quasi invincible rigidité de leurs connexions, et de rétablir, en fin, les voies nerveuses normales, lorsque la maladie a séparé des centres intimement liés. »

Ramón y Cajal, 1914

## 1.1 Régénération dans le système nerveux central : les premiers pas

On reconnaissait déjà deux mille ans avant notre ère le caractère irréversible des lésions de la moelle épinière. Le célèbre papyrus d'Edwin Smith, retrouvé en Égypte, en fait état: « De celui dont une vertèbre du cou s'est disloquée, qui a perdu conscience de ses bras et de ses jambes, et dont l'urine s'écoule, on doit dire : un mal qu'on ne peut soigner » (Breasted, 1930). Quant au fonctionnement de la moelle épinière, l'ébauche de nos connaissances dû attendre l'avènement de l'expérimentation animale. C'est à Galien de Pergame, médecin à Rome au 2<sup>e</sup> siècle apr. J.-C., qu'on attribue les premières

expériences sur la moelle épinière. Cherchant à découvrir ses fonctions, Galien l'avait sectionnée à différents niveaux et avait observé différents effets sur la respiration, le contrôle moteur et la sensation (Siegel, 1973). Les hypothèses sur la moelle épinière avancées par Galien étaient encore enseignées au 19<sup>e</sup> siècle. C'est donc seulement à cette époque, avec la naissance de l'histologie et de l'électrophysiologie, que les neurosciences prirent leur envol. Dès lors, la communauté scientifique s'est rapidement convaincue de l'intrinsèque inaptitude régénérative du système nerveux central et, à l'opposé, des grandes capacités régénératives du système nerveux périphérique. Objet de nombreux débats, le mécanisme de la régénération spontanée des « nerfs » ne fût décrit avec justesse qu'au tournant du 20<sup>e</sup> siècle, grâce à une nouvelle technique histologique mise au point par Santiago Ramón y Cajal. Cette technique à l'argentation, qui imprègne les axones, permit à Cajal de démontrer histologiquement que la régénération des nerfs est le fruit du bourgeonnement et de la repousse du tronçon central se dirigeant vers sa cible, et non celui d'une reconstitution autonome du tronçon distal, reconstitué morceau par morceau par les cellules de Schwann, comme le voulait la théorie de l'époque (Ramón y Cajal, 1991). Mais plus important encore : c'est grâce à cette technique que Cajal pu observer pour la première fois un bourgeonnement similaire après lésion des axones de la moelle épinière ou du nerf optique. Toutefois, ces bourgeonnements ne donnaient lieu, dans les faisceaux du système nerveux central, qu'à des « actes régénératifs frustrés » et n'entraînaient pas, comme dans les nerfs, la régénération de longs axones. Dans le système nerveux périphérique, Cajal avait vu les fibres du nerf sciatique en régénération s'orienter distinctement vers les cellules de Schwann, et il remarqua, dans le système nerveux central, que les lésions de la moelle effectuées près des racines rachidiennes elles

aussi lésées, et donc riches en cellules de Schwann « activées », entraînaient une réaction de bourgeonnement plus vigoureuse. Cajal en conclut donc que c'était par manque de cellules de Schwann et de leurs sécrétions « neurotropes » que les axones du système nerveux central ne pouvaient entreprendre de réelle régénération.

Inspiré par ces résultats, Tello, étudiant doué de Cajal, eu l'idée d'apposer un nerf périphérique, comme source de cellules de Schwann, à un faisceau lésé du système nerveux central (Tello, 1911). Ainsi, il transplanta des segments de nerfs périphériques dans le cortex de lapins. Quelques semaines plus tard, après examen histologique avec imprégnation à l'argent, il observa la présence de faisceaux d'axones régénérant à l'intérieur des greffons; sur certaines coupes, il pouvait discerner des axones du tissu hôte s'orienter vers le greffon et pénétrer le périneurium. Curieusement, lorsque les nerfs greffés provenaient d'animaux ayant subi une section du nerf périphérique une à deux semaines auparavant, un plus grand nombre de fibres régénéraient dans le greffon. Deux conclusions furent tirées de ces observations : 1) que les neurones du CNS peuvent régénérer leur axone dans le micro-environnement d'un nerf périphérique, 2) que cela est causé par la synthèse de facteurs tropiques et trophiques par les cellules de Schwann en réponse à la dénervation. Pour tester cette deuxième hypothèse, Tello prépara un extrait à base de tronçon périphérique de nerf sciatique ayant été coupé 8 jours auparavant, et implanta dans le cerveau de deux lapins des bouts de moelle de sureau imbibés de l'extrait. Chez un des lapins, l'apparence histologique des coupes suggéra que des fibres du cerveau hôte s'étaient orientés vers l'implant et avaient pénétré dans ses pores. En fournissant ainsi les premières données expérimentales appuyant le concept de



neurotropisme, ces travaux extrêmement avant-gardistes, jetèrent les bases de la neurobiologie moderne.

Ne laissant personne indifférent, ces travaux furent fort critiqués, notamment par Le Gros Clark (1942), qui après avoir répété les expériences de Tello, émit des doutes quant à l'origine des fibres innervant les greffons. En effet, il suggéra que les axones régénérés pouvaient être d'origine sympathique, ayant bourgeonné de nerfs associés aux méninges ou au réseau vasculaire, et que l'orientation des axones vers le greffon pouvait s'expliquer par la dislocation et la distorsion mécanique des axones traumatisés en réaction à la greffe. Après cette critique sévère, les travaux de Tello ne furent poursuivis que par quelques laboratoires isolés. À la fin des années 60, Horvat (1966) répéta l'expérience chez la souris, mais ne parvint qu'à montrer la supériorité du cervelet comme site de greffe. D'autres groupes, ensuite, tentèrent sans succès de greffer des nerfs périphériques à la moelle épinière (Brown et McCouch, 1947; Barnard et Carpenter, 1950; Feigin *et al.*, 1951). Ce n'est qu'à la fin des années 70 qu'un groupe, grâce à une nouvelle technique, parvint à observer des axones régénérés dans un nerf sciatique greffé à la moelle (Kao *et al.*, 1977). Par l'utilisation de la microscopie électronique, ces auteurs purent en outre confirmer que ces axones avaient été myélinisés par les cellules de Schwann. Cette observation montrait donc que ces fibres n'étaient pas d'origine viscérale, puisque les axones sympathiques, amyéliniques, ne sont pas myélinisés lorsqu'ils pénètrent un nerf périphérique (Simpson et Young, 1945; Hilarp et Olivercrona, 1946).

C'est grâce à l'avènement, au début des années 80, des techniques anatomiques permettant de retracer l'origine et la terminaison des fibres nerveuses, qu'il a été enfin possible d'établir sans équivoque l'origine des fibres détectées après ce type de greffe. En

effet, en ayant recours à la peroxydase du raifort (HRP) ou à des marqueurs fluorescents déposés à l'extrémité distale des nerfs greffés, Aguayo et son groupe ont pu prouver que les axones pénétrant un greffon de nerf sont bel et bien d'origine centrale (pour revue, *cf.* Aguayo, 1985). Ces auteurs ont aussi démontré le potentiel régénératif de plusieurs types de neurones centraux, d'abord dans la moelle épinière (Richardson *et al.*, 1980, 1982b; David et Aguayo, 1981) puis dans le cerveau (Benfey et Aguayo, 1982), le cervelet (Dooley et Aguayo, 1982) et la rétine (So et Aguayo, 1985). Dans ces conditions expérimentales, la régénération des axones pouvait s'étendre sur de très longues distances, dépassant parfois la longueur de la projection d'origine (Benfey et Aguayo, 1982). De plus, certains des axones régénérés présentaient une activité électrique normale (Munz *et al.*, 1985). Il restait alors à déterminer si ces axones pouvaient être amenés à former des connexions stables.

C'est dans le système visuel qu'on a pu répondre à cette question. Les cellules ganglionnaires de la rétine, une population relativement homogène de neurones centraux, ont des terminaisons bien définies et leur activité est facile à tester. Cependant, pour relier ces cellules aux greffes de nerf périphérique, et étudier leur éventuelle reconnexion, il a fallu attendre le développement d'une technique de greffe capable de stimuler leur régénération jusqu'au collicule supérieur, et ce en passant par la papille. En effet, les seules greffes qui avaient jusqu'alors permis la régénération des cellules ganglionnaires avaient été apposées directement à la rétine, en greffant le nerf à travers la sclérotique (So et Aguayo, 1985). Pour envisager une récupération fonctionnelle, et pour stimuler un plus grand nombre de cellules ganglionnaires à régénérer, il était nécessaire de parvenir à placer le greffon vis-à-vis le nerf optique sectionné. Or, près de l'œil, l'artère centrale de

la rétine est incluse dans la gaine du nerf optique, ce qui rend l'opération très délicate puisqu'il faut éviter de compromettre l'apport sanguin aux cellules ganglionnaires. Les premières greffes furent donc effectuées loin de l'œil (Richardson *et al.*, 1982a), par une approche intra-crânienne, sur une portion du nerf optique dépourvue de vaisseaux importants, et là où Tello, avec Leoz et Arcuate (1914), avait déjà tenté, chez le lapin, de greffer un nerf sciatique sans grand succès. Comme pour leurs prédécesseurs, ces tentatives furent vaines, ce qui fit croire aux chercheurs du laboratoire Aguayo que les cellules ganglionnaires avaient peut-être, intrinsèquement, un potentiel régénératif limité. L'échec était en fait dû à la trop grande distance du corps cellulaire. Il fallu donc attendre l'expertise de Vidal-Sanz (1987) pour qu'un greffon puisse être attaché au nerf optique près de l'œil sans endommager l'artère centrale de la rétine. Dans ces nouvelles conditions, où l'autre extrémité du greffon était apposée au collicule supérieur, les cellules ganglionnaires parvenaient à régénérer leur axone sur de très longues distances. Grâce au marquage antérograde, il fut alors possible de montrer que les fibres régénérées formaient des arborisations dans les couches appropriées du collicule supérieur (Vidal-Sanz *et al.*, 1987) ainsi que des synapses différenciés et persistantes (Carter *et al.*, 1989; Vidal-Sanz *et al.*, 1991) capables de médier une excitation des neurones post-synaptiques en réponse à la lumière (Keirstead *et al.*, 1989). Ces résultats déjà impressionnants ont été depuis renforcés par la démonstration récente du maintien d'une certaine spécificité topologique lors de cette réinnervation des collicules (Sauve *et al.*, 2001). Par ailleurs, si le greffon est plutôt amené à réinnover l'aire préteectale, responsable du réflexe pupillaire, une partie de ce réflexe est recouverte (Aviles-Trigueros *et al.*, 2000). Il semble donc que les neurones adultes du système nerveux central conservent non seulement un certain

potentiel régénératif, mais aussi, vraisemblablement, la capacité de retrouver leur cible et d'y rétablir des synapses fonctionnelles. Outre leurs implications en termes de régénération axonale fonctionnelle, pour la réparation des lésions de la moelle épinière notamment, ces résultats laissent comprendre comment le système visuel peut constituer un modèle privilégié pour en étudier les mécanismes à l'échelon moléculaire.

## 1.2 Le nerf optique comme modèle du système nerveux central

Le nerf optique est un des faisceaux d'axones les plus facilement accessibles du système nerveux central. On peut, chez le rat, le léser par une approche intra-orbitale ou intracrânienne; sa section unilatérale est beaucoup moins incapacitante qu'une lésion médullaire et elle n'entraîne pas de complications. Anatomiquement, ce nerf est a été bien caractérisé : mis à part une petit groupe d'axones en provenance du prétectum (Itaya, 1980), ses fibres, rétino-fuges, sont issues d'une population homogène de cellules facilement identifiables, les cellules ganglionnaires de la rétine. Ces cellules, disposées dans la couche la plus interne de la rétine, peuvent être facilement atteintes malgré la barrière hématorétinienne. En effet, puisque cette barrière ne les protège pas des substances du corps vitré, elles sont accessibles par injection trans-sclérotique. Sans infliger de lésion majeure, cette voie d'administration permet de livrer aux cellules ganglionnaires différents composés pharmacologiques ou marqueurs antérogrades permettant de suivre la progression des axones en régénération. Le système facilite également les marquages par voie axonale rétrograde, puisque chez le rat plus de 90 % des cellules ganglionnaires émettent une branche vers le collicule supérieur (Linden et Perry, 1983), une cible facilement accessible dans le cerveau. Ces considérations pratiques ont fait du système visuel un modèle favori pour étudier la survie cellulaire et la

régénération axonale après lésion, tant du point de vue cellulaire que moléculaire. Dans ce contexte, l'étude du développement de la rétine et du nerf optique a suscité un intérêt tout particulier, puisqu'elle permet de mieux comprendre les mécanismes de croissance et de guidage axonal qui, on le suppose, sont récapitulés lors de la régénération chez l'adulte.

### **1.2.1 Ontogenèse de la rétine et du nerf optique**

Il est d'usage de classer le nerf optique parmi les nerfs crâniens, même si du point de vue de sa structure et de son développement il s'agit en fait d'un faisceau du système nerveux central (Ranson et Clark, 1969). En effet, le nerf optique relie la rétine au cerveau, deux structures centrales, tandis que les autres nerfs crâniens, à l'instar des nerfs spinaux, relient des noyaux centraux à des structures périphériques. Et contrairement aux autres nerfs crâniens, le nerf optique n'est pas un dérivé de la crête neurale et ne contient donc pas de cellules de Schwann. Pour mieux comprendre ces différences il est essentiel de revoir brièvement l'ontogenèse du nerf optique et de la rétine.

#### *1.2.1.1 Développement de la rétine*

La rétine se forme à partir de la vésicule optique, un prolongement direct du système nerveux central (Offret *et al.*, 1986). En effet, chez les vertébrés, la vésicule optique primitive représente une évagination de la paroi latérale du diencéphale et reste liée à l'encéphale par le pédicule optique. L'invagination simultanée des faces antérieure et inférieure de la vésicule optique primitive et du pédicule optique crée une cavité continue qu'on appelle fente ou fissure fœtale (Figure 1, p.10). C'est dans cette fente que

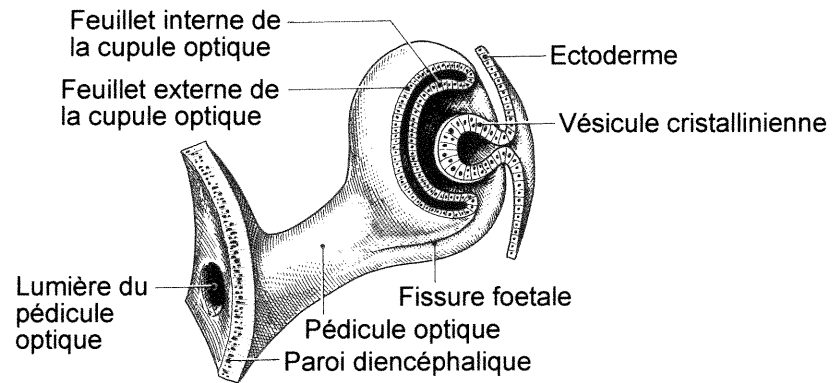


Figure 1. Cupule optique et vésicule cristallinienne (d'après Mann, 1964).

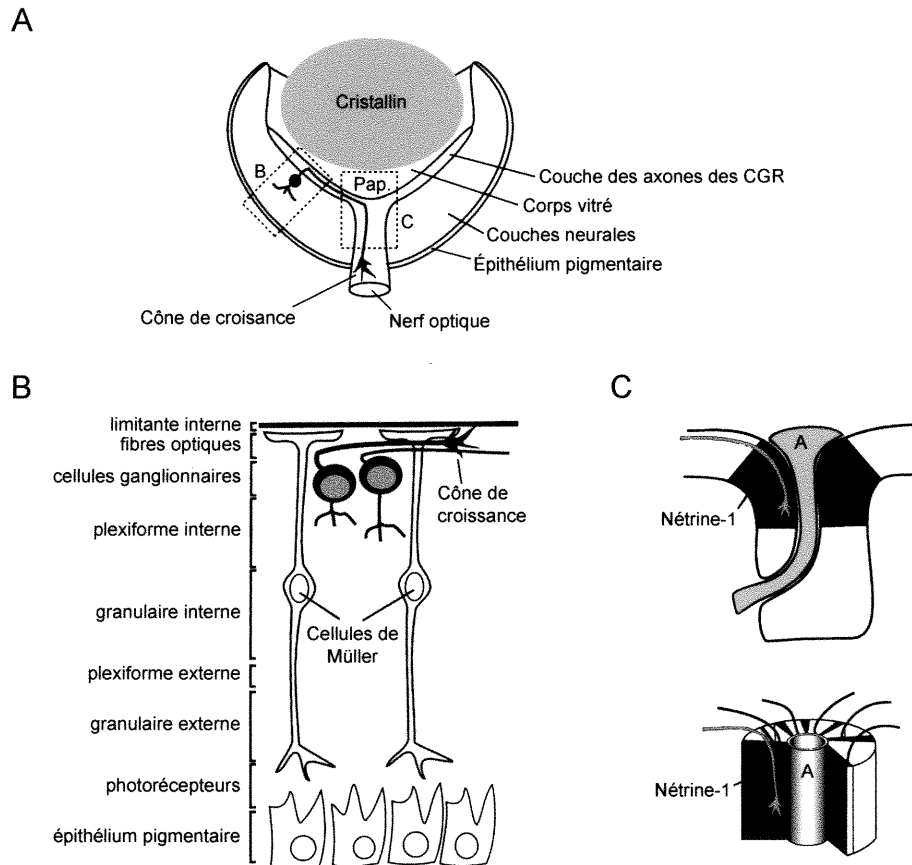


Figure 2. Parcours des cônes de croissance des CGR, de la rétine au nerf optique (A) Représentation schématique d'un oeil en développement illustrant le parcours emprunté par l'axone d'une CGR. Pap., papille (B) Schéma d'une coupe transversale de la rétine montrant l'organisation spatiale des axones des CGR par rapport aux cellules de Müller. (C) Schéma de la région papillaire en coupe longitudinale (haut) ou en représentation tridimensionnelle (bas) illustrant le rôle de nétrine-1 dans le guidage des axones dans la papille. A, artère centrale de la rétine (d'après Stuermer et Bastmeyer, 2000).

l'artère centrale se forme et que les premiers axones quittent la rétine. Au cours de la sortie progressive de ces axones, les deux côtés de la fente fusionnent et le neuroépithélium rétinien prend sa forme de dôme inversé : la cupule optique. Le pédicule optique, attaché au pôle postérieur de la cupule, deviendra le nerf optique. Ce sont les cellules épithéliales du pédicule qui donnent naissance aux cellules gliales du nerf optique. Les cellules rétiniennes et les axones qu'on retrouve à la jonction rétine-nerf optique constituent ensemble la papille primitive; ces cellules, nous le verrons, contribuent au guidage des axones quittant la rétine vers le nerf optique.

La rétine visuelle comme telle se développe à partir du neuroépithélium de la cupule optique. Six types de neurones et un type de cellule gliale émergent de cette structure, selon un patron spatio-temporel bien connu, qui donne à la rétine sa structure stratifiée caractéristique (Ramón y Cajal, 1911; Sidman, 1961). Les cellules ganglionnaires sont les premières cellules rétiniennes à se différencier; leur soma occupe le côté interne, ou vitréal, du feuillet neuroépithélial, celui qui formera la future couche ganglionnaire. Les axones des cellules ganglionnaires se projettent toujours vers la face vitréale du neuroépithélium, où ils entrent en contact avec les pieds des cellules gliales de Müller – qui se différencient au même moment – puis prennent un virage à 90° et poussent vers la fissure (Figure 2, A et B, p.10). Les premières cellules ganglionnaires se différencient près de la fente, de sorte que les premiers axones n'ont qu'à couvrir une courte distance pour s'y rendre. Ces axones pionniers frayent le chemin le long de la fissure et poussent vers le cerveau. Le développement des cellules ganglionnaires suit un gradient centro-périphérique, et donc les axones plus tardifs doivent parcourir une plus longue distance pour atteindre la fissure, ou à un stade ontogénique plus avancé, la

papille. Ils peuvent compter sur les axones plus vieux pour s'orienter. Les axones pionniers, en revanche, doivent être guidés, via leur cône de croissance, par les molécules de guidage rencontrées dans l'épithélium. Ces molécules de guidages permettent aux axones pionniers de 1) pousser vers l'aspect interne du neuroépithélium; 2) de virer à 90° et se diriger vers la fissure, et 3) quitter la rétine par la papille primitive et continuer vers le cerveau le long du nerf optique.

#### 1.2.1.2 Axogenèse des cellules ganglionnaires : croissance initiale

Tout comme dans le neuroépithélium à l'origine d'autres structures du système nerveux central, les neuroblastes précurseurs des cellules ganglionnaires entrent en mitose à la surface ventriculaire, pour ensuite se différencier en migrant vers la surface piaie, ici la surface vitréale (Hinds et Hinds, 1974). Une fois attachée par un pied terminal à la surface du vitré, la cellule ganglionnaire entreprend la résorption de son ancrage à la surface ventriculaire et élabore des neurites à partir du pied terminal (Watanabe *et al.*, 1990; Brittis et Silver, 1995). On croit que l'élaboration de ces neurites primaires est déclenchée par des signaux reçus par le pied terminal, une fois en contact avec la limitante du vitré. Riehl *et al.* (1996) ont proposé un rôle possible des cadhérines, molécules contribuant à la croissance axonale via un mécanisme  $Ca^{2+}$ -dépendant. En effet, chez *Xenopus*, ils ont montré que la transfection de cellules ganglionnaires en développement avec une forme dominante-négative de la N-Cadhérine bloque la formation de prolongements axonaux ou dendritiques. On peut alors se demander pourquoi l'élaboration de neurites est restreinte à l'aspect interne du neuroépithélium, entre la limitante interne et la couche ganglionnaire. Certaines données suggèrent que les axones élaborés à partir des pieds terminaux des cellules ganglionnaires primitives se



trouvent pris entre une zone permissive et une zone inhibitrice (Stier et Schlosshauer, 1995, 1998). En effet, les cellules de Müller, ou glie radiale, ont des pieds qui forment une couche s'appuyant sur la surface vitréale de la rétine (Figure 2B, p.10). Ces pieds constituent un substrat permissif pour la croissance des axones des cellules ganglionnaires. En revanche, les corps cellulaires de la glie radiale offrent un substrat qui inhibe la croissance des axones. On ne connaît pas encore la nature exacte de ce facteur inhibiteur. Toutefois, pour ce qui est du contenu permissif des pieds de la glie radiale, on sait qu'ils déposent de grandes quantités de laminine sur la surface vitréale. Cependant, même après inactivation de la laminine, les axones des cellules ganglionnaires poussent volontiers sur une préparation de pieds de glie radiale. Ceci suggère qu'il existe sur ce substrat d'autres facteurs encourageant la croissance neuritique. Les axones seraient donc confinés à cette couche principalement par l'inhibition provenant des couches plus internes et en raison de la barrière physique formée par les pieds de la glie radiale sur la surface vitréale.

### *1.2.1.3 Axogénèse des cellules ganglionnaires : croissance vers la fissure*

Comment les axones s'orientent-ils ensuite vers la fissure fœtale? Tout d'abord, peu avant la croissance des axones optiques, se développe, près de la fissure, un ensemble organisé de canaux neuroépithéliaux (Silver et Sidman, 1980). Ceux-ci sont orientés de façon radiale vers la fissure optique. Jusqu'à récemment on s'expliquait mal comment ces structures sans apparente polarité pouvaient générer des signaux de guidage à sens unique. Ce sont des travaux plus récents de l'équipe de Silver qui ont permis d'élucider en partie cette question. Croyant d'abord à l'existence de gradients de concentration de molécules diffusibles libérées par la fissure, comme il avait été démontré dans d'autres

systèmes, ces chercheurs ont inversé une portion de l'épithélium, réorientant ainsi les axones à 180° pour voir s'ils feraient demi-tour pour s'orienter à nouveau vers la fissure (Brittis et Silver, 1995). Contrairement à cette prédiction, les axones ont continué de pousser dans la direction opposée à leur trajet naturel, et ce à la même vitesse que les nouveaux axones poussant dans la bonne direction. C'est en étudiant, dans la rétine en développement, l'expression d'un type de molécules inhibitrices de la croissance axonale, les protéoglycanes à chondroïtine-sulphate (CSPG; Snow *et al.*, 1990), qu'un phénomène intéressant fut remarqué. L'expression des CSPG, d'abord observée au centre de la rétine, s'atténue ensuite au centre pour progressivement migrer vers les régions périphérique au moment où les cellules ganglionnaires élaborent leur premier axone (Brittis *et al.*, 1992). Des études plus poussées suggèrent en fait, qu'au fur et à mesure que la matrice de CSPG se dissipe au sein des cellules ganglionnaires immatures, seuls les neurites faisant dos à la périphérie (riche en CSPG) et faisant face à la fissure fœtale deviennent axones matures (Brittis et Silver, 1995).

Selon un mécanisme conservé dans l'ontogenèse de plusieurs faisceaux du système nerveux, les axones pionniers construisent un échafaudage qui permet aux axones plus jeunes de suivre le même parcours : c'est ce qu'on appelle la fasciculation (pour revue, *cf.* Bastiani *et al.*, 1984). Dans la rétine, une étude a montré que les neurites mineurs des cellules ganglionnaires immatures de la périphérie présentent des dépôts focaux de la protéine d'adhésion L1 lorsqu'ils entrent en contact avec d'autres axones plus matures (Brittis et Silver, 1995). Chez l'embryon de rat où l'on a inactivé LI sur les cônes de croissances, ceux-ci poussent de façon aberrante, à angle droit par rapport aux faisceaux établis par les axones précédents (Brittis et Silver, 1995). De plus, tant les pieds

de la glie radiale que les axones eux-mêmes expriment à leur surface la protéine NCAM (Brittis et Silver, 1995), une autre molécule d'adhésion cellulaire, laquelle contribue aux interactions fibres-fibres et encourage la croissance neuritique (pour revue, *cf.* Rutishauser et Jessell, 1988). Ces molécules se lient de façon homophile et agissent, vraisemblablement, en entraînant une cascade de signalisation favorisant la croissance. NCAM est présente tant dans la rétine centrale que dans la rétine périphérique (Brittis et Silver, 1995). Ainsi, selon un modèle mis de l'avant par Silver (Brittis et Silver, 1995), les axones des cellules ganglionnaires « post-pionniers » sont guidés par un mécanisme qui s'appuie à la fois sur les propriétés inhibitrices des CSPG et les propriétés stimulatrices de L1 : les neurites mineurs dont l'orientation initiale est incorrecte se dirigent vers un territoire riche en CSPG et en NCAM et pauvre en L1, et sont donc rapidement éliminés. En revanche, les neurites dont l'orientation initiale est juste se dirigent vers un territoire plus faible en CSPG et riche en L1 et NCAM, et poursuivent ainsi leur croissance. C'est donc grâce à un équilibre délicat entre mécanismes stimulateurs et inhibiteurs que les axones parviennent ici à être guidés vers leur cible; un concept de plus en plus courant en neurobiologie.

#### 1.2.1.4 Développement du nerf optique

Ce n'est que récemment qu'on a commencé à comprendre comment les axones une fois arrivés à la fissure parviennent à quitter la rétine et à poursuivre leur parcours le long du nerf optique. On sait que les structures en développement du prosencéphale, particulièrement la cupule optique et le pédicule optique, présentent des territoires d'expression distincts en regard des facteurs de transcription Pax-2 et Pax-6 (pour revue, *cf.* Macdonald et Wilson, 1996). Chez la souris, l'expression de Pax-6 intéresse la rétine

et la plupart des structures de l'œil, à l'exception du cristallin, de la cornée et de la région de la fissure fœtale. L'expression de Pax-2 est, pour sa part, restreinte aux cellules du pédicule optique et à des cellules bordant la fissure, structures qui formeront le nerf optique et la papille optique, respectivement. La perturbation de l'expression de Pax-2 et Pax-6 entraîne une absence de fermeture de la fente fœtale et empêche les cônes de croissance des cellules ganglionnaires de quitter la rétine et de pénétrer le nerf optique (Nornes *et al.*, 1990; Walther et Gruss, 1991). Ces malformations se manifestent à l'âge adulte par un colobome – une fermeture incomplète de la fissure – et une hypoplasie du nerf optique (Keller *et al.*, 1994). Chez l'homme, une déficience en Pax-2 entraîne les mêmes symptômes (Sanyanusin *et al.*, 1995). Plus récemment, ces malformations ont été aussi observées chez la souris *netrin-1*<sup>-/-</sup> (Deiner *et al.*, 1997), suggérant qu'elles puissent être le résultat, du moins en partie, d'un défaut d'expression de netrin-1 dans les cellules gliales de la papille optique.

Les nétrines sont des molécules de guidage axonal sécrétées et liées à la matrice extracellulaire; leur structure est homologue au bras court de la laminine (Kennedy *et al.*, 1994; Serafini *et al.*, 1994). Leur rôle a été bien défini dans la plaque basale du système nerveux central primitif, où elles contribuent au guidage circonférentiel des axones commissuraux (pour revue, *cf.* Mueller, 1999). Nétrine-1 est exprimée par les cellules gliales de la papille optique et localisée à leur surface (Deiner *et al.*, 1997). L'analyse des souris *pax-2*<sup>-/-</sup> et *netrin-1*<sup>-/-</sup> suggère que nétrine-1, produite au niveau de la papille optique, contribue à ce que les axones des cellules ganglionnaires pénètrent dans le nerf optique et quittent la rétine, évitant ainsi qu'ils ne poursuivent leur croissance à l'intérieur de la rétine (Figure 2C, p.10) (Deiner *et al.*, 1997). Cette influence de nétrine-1 ne semble pas

s'exercer à distance, mais plutôt par contact, puisque chez les souris *netrin-1*<sup>-/-</sup> les axones parviennent quand même à se diriger vers la papille (Deiner *et al.*, 1997). Pour répondre à nétrine-1, les cellules ganglionnaires doivent exprimer DCC, un des récepteurs connus des nétrines (Keino-Masu *et al.*, 1996; de la Torre *et al.*, 1997). Le phénotype des mutants *Dcc*<sup>-/-</sup> est similaire à celui des mutants *netrin-1*<sup>-/-</sup> : les axones des cellules ganglionnaires ne parviennent pas à quitter l'œil et l'animal développe une hypoplasie du nerf optique (Deiner *et al.*, 1997).

Tout comme dans la plaque basale, où les axones commissuraux doivent changer de direction après avoir croisé la ligne médiane, les axones des cellules ganglionnaires doivent recevoir un signal pour quitter la rétine et pénétrer dans le nerf optique. Il est possible que ce signal implique un mécanisme réversible de nétrine-1 sur le cône de croissance. D'élégantes expériences ont montré que la modulation de l'AMP cyclique (AMPC) intracellulaire permet ce type de réversibilité (Song *et al.*, 1997). En effet, des expériences *in vitro* ont montré que les cônes de croissance des cellules ganglionnaires de *Xenopus* répondent à nétrine-1 en s'orientant vers la source de nétrine, un effet chimioattractif (Ming *et al.*, 1997). Cet effet est DCC-dépendant, et le couple nétrine-1/DCC entraîne, dans les cônes de croissance, une augmentation de l'AMPC intracellulaire (de la Torre *et al.*, 1997). Étonnamment, lorsqu'on bloque cette augmentation, les cônes de croissance inversent leur réponse à nétrine-1 : dans ces conditions, ils s'éloignent d'une source de nétrine-1 (Song *et al.*, 1997). Un autre groupe a montré que la laminine-1 pouvait empêcher l'augmentation d'AMPC induite par nétrine-1, entraînant, comme dans le cas précédent, un revirement de la réponse du cône de croissance à une source de nétrine-1 (Hopker *et al.*, 1999). Si, dans le même bioessai, la

laminine est remplacée par un court peptide tiré de sa séquence (YIGSR), le même effet est observé. Dans le but de vérifier l'importance de ce mécanisme *in vivo*, les mêmes auteurs ont injecté le peptide vis à vis la papille primitive à l'âge embryonnaire approprié. Ce traitement, comme l'inactivation de nétrine-1 ou de DCC, a empêché la sortie des axones vers le nerf optique. Selon le modèle proposé par Holt (Hopker *et al.*, 1999), la laminine-1, limitée à la surface vitréale de la rétine, constituerait un substrat permissif pour les axones jusqu'à ce que ceux-ci atteignent la papille, où dû à la présence de nétrine-1 la surface vitréale deviendrait inhibitrice. Ainsi, suivant l'unique issue de cet environnement inhibiteur, les axones seraient déviés vers la tête du nerf optique, où nétrine-1 est seule exprimée, pour poursuivre leur croissance vers le cerveau. Si ce modèle est juste, il serait donc possible qu'*in vivo* des influences locales modulent, via les niveaux d'AMPC, la nature inhibitrice ou stimulatrice des molécules de guidage. On conçoit facilement l'importance d'un tel concept en termes de régénération axonale chez l'adulte.

Mais un autre modèle pourrait aussi rendre compte du rôle de nétrine-1 dans le même contexte. En effet, la papille optique et les axones des cellules ganglionnaires expriment un autre duo récepteur-ligand qui participe au guidage axonal dans la plaque basale. En plus de nétrine-1, la plaque basale exprime des protéines de la famille Slit (Brose *et al.*, 1999; Kidd *et al.*, 1999), alors que les axones commissuraux expriment les récepteurs de type Robo (Kidd *et al.*, 1998a). Par suite de l'analyse fonctionnelle de ces molécules, effectuée chez la drosophile, on croit que l'inhibition, par Slit, des cônes de croissance exprimant Robo sert à empêcher les axones de faire marche arrière une fois croisée la ligne médiane que constitue la plaque basale (pour revue, *cf.* Harris et Holt,

1999). Selon ce modèle, les axones attirés vers la plaque par nétrine-1 peuvent s'en approcher même si elle est riche en Slit, car Robo est réprimé par un troisième joueur, Comm, tant et aussi longtemps que l'axone n'a pas atteint la plaque (Seeger *et al.*, 1993; Kidd *et al.*, 1998b). Une fois la ligne médiane traversée, Robo est réexprimé dans l'axone et la plaque riche en Slit devient répulsive, empêchant les axones de la croiser à nouveau. Récemment, on a montré qu'une fois passée la ligne médiane, non seulement les axones se mettent-ils à répondre à l'inhibiteur Slit mais ils cessent de répondre à nétrine-1, même s'ils continuent d'exprimer DCC (Stein et Tessier-Lavigne, 2001). Dans la rétine en développement, l'ARNm de Slit2 est exprimé par les cellules de la papille optique et par la glie du nerf optique, et l'ARNm de Robo1 est présent dans la couche ganglionnaire en formation (Yuan *et al.*, 1999). Comme tous les Slit lient Robo1 (Brose *et al.*, 1999), il ne serait pas surprenant que ces molécules jouent un rôle dans le guidage des axones des cellules ganglionnaires. Ainsi, dans un modèle qui n'est pas incompatible avec le précédent, les axones arrivant à la papille seraient d'abord repoussés par le duo nétrine/laminine et déviés vers la tête du nerf optique. Dans un deuxième temps, alors qu'ils poussent vers le nerf optique, une expression accrue de Robo contribuerait à la sortie de la papille, riche en Slit. Enfin, ayant parcourue cette zone, les axones perdraient aussi leur sensibilité à nétrine-1, évitant ainsi le risque de faire demi-tour ou de se cantonner à cet environnement permissif. Il se pourrait que de tels mécanismes soient remis en marche après une lésion dans le système nerveux adulte. C'est pourquoi il sera important, dans les années à venir, de déterminer comment l'expression de ces molécules chez l'adulte peut affecter le potentiel régénératif des axones.

### **1.2.2 Expression génique dans les cellules ganglionnaires après axotomie et durant la régénération**

Accessibles et facilement identifiables, les cellules ganglionnaires de la rétine constituent un modèle de choix pour étudier les changements moléculaires qui s'opèrent dans les neurones lésés, qu'ils soient ou non en cours de régénération. On sait depuis Cajal que les cellules ganglionnaires adultes montrent une certaine réponse régénérative après lésion du nerf optique (Ramón y Cajal, 1991). Cette réponse initiale a été étudiée avec beaucoup de détail. En bref, dans les heures qui suivent une lésion du nerf optique, les axones du tronçon proximal – celui encore attaché à l'œil – montrent des signes de dégénérescence et, par suite d'une « rétraction » de 50 à 100  $\mu\text{m}$ , un intense bourgeonnement (Zeng *et al.*, 1994; et *cf.* chapitre 3). Cependant, cette réponse régénérative initialement vigoureuse n'est que temporaire, puisque une semaine après lésion, la grande majorité des bourgeonnements axonaux n'a pas dépassé le site de lésion, une cicatrice gliale s'est formée et une phase rapide de mort cellulaire s'est installée (*cf. infra*).

#### **1.2.2.1 GAP-43, un corrélat de l'état régénératif**

La courte fenêtre temporelle permettant d'étudier l'expression génique qui soutient la repousse des cellules ganglionnaires adultes s'est heureusement élargie grâce à l'usage de greffes de nerf périphériques qui peuvent entraîner une régénération soutenue (Vidal-Sanz *et al.*, 1987). Ainsi, certains gènes dont l'expression n'est que temporairement régulée à la hausse après axotomie, sont régulés à la hausse de façon soutenue quand les cellules régénèrent grâce à une greffe. C'est le cas de GAP-43, une protéine neuronale qu'on croit importante pour la croissance et le guidage des



bourgeoisements axonaux et qui, dans plusieurs populations neuronales différentes, est considérée comme un corrélât moléculaire de l'état régénératif (pour revue, *cf.* Benowitz et Routtenberg, 1997). L'expression de GAP-43 dans les cellules ganglionnaires n'est détectée que durant le développement (Freeman *et al.*, 1986; McGuire *et al.*, 1988; Doster *et al.*, 1991). Toutefois, après axotomie, GAP-43 est temporairement réexprimée, autant dans les axones (Freeman *et al.*, 1986; Doster *et al.*, 1991; Wouters *et al.*, 1998) que le corps cellulaire (Schaden *et al.*, 1994). Cette expression s'éteint après 2 ou 3 semaines. Si, par contre, on permet aux cellules ganglionnaires de régénérer dans un greffon de nerf périphérique, l'expression de GAP-43, tant dans le corps cellulaire que les axones, subsiste pendant au moins 1 mois (Schaden *et al.*, 1994; Wouters *et al.*, 1998). Il semble donc, comme on l'a montré pour d'autres neurones du système nerveux central ou périphérique (Fernandes *et al.*, 1999), que la régulation à la hausse de GAP-43 soit aussi un corrélât de l'état régénératif dans les cellules ganglionnaires. On ne connaît pas avec détails les mécanismes d'action de GAP-43, mais on sait que cette molécule s'associe avec l'actine, un constituant majeur du cytosquelette (Hens *et al.*, 1993), et que les changements de morphologie observés dans les cellules surexprimant GAP-43 sont associés à la formation de F-actine (Widmer et Caroni, 1993). Il semble donc que ce soit via le cytosquelette que GAP-43 agisse sur l'état de croissance des cellules.

#### 1.2.2.2 Régulation du cytosquelette

La  $\beta$ -tubuline, une composante des microtubules, montre aussi une régulation particulière dans les cellules ganglionnaires en régénération. Un jour après axotomie, on observe dans ces cellules une légère augmentation des niveaux d'ARNm de  $\beta$ -tubuline, suivie d'une baisse rapide sous les niveaux de base (McKerracher *et al.*, 1993b). Après

une greffe de nerf périphérique, par contre, les cellules ganglionnaires dont l'axone est en cours de régénération présentent des niveaux d'ARNm de l'ordre de 300% des niveaux de base, tandis que les cellules survivant à la lésion mais dont l'axone ne régénère pas, conservent un niveau d'environ 60%, semblable aux niveaux mesurés après axotomie sans greffe (McKerracher *et al.*, 1993a). Des études plus poussées sur les différents isotypes de  $\beta$ -tubuline ont montré que si, en effet, les isotypes  $\beta$ -I,  $\beta$ -II,  $\beta$ -III et  $\beta$ -IVa sont tous exprimés dans les cellules ganglionnaires, ce sont plus spécifiquement les isotypes  $\beta$ -II et  $\beta$ -III qui contribuent à l'augmentation observée dans les cellules ganglionnaires en régénération (Fournier et McKerracher, 1997). Ces études ont aussi révélé que l'autre sous-unité nécessaire à l'élaboration de microtubules, l' $\alpha$ -tubuline, est elle aussi régulée à la hausse, spécifiquement dans les cellules ganglionnaires en régénération. Contrairement aux sous-unités des microtubules, il ne semble pas qu'une telle hausse d'expression ait lieu pour les neurofilaments, puisque NF-M, la sous-unité de 150 kDa, est réduite dans les cellules ganglionnaires axotomisées, peu importe qu'elles parviennent ou non à régénérer un axone (McKerracher *et al.*, 1993b). On ne comprend pas encore bien comment une régulation à la baisse des neurofilaments peut influencer sur la régénération, mais il a été suggéré que ce phénomène réduise les interactions entre neurofilaments et microtubules et retarde ainsi le mouvement de la tubuline le long de l'axone en régénération (Bisby et Tetzlaff, 1992).

### 1.2.2.3 Gènes précoces et régénération

Les gènes à réponse très précoce de la famille Jun, des facteurs de transcription inductibles par des signaux extra-cellulaires, ont aussi été associés à l'état régénératif des neurones. Dans la rétine du rat adulte, les protéines Jun ne sont normalement pas

déTECTABLES; cependant, 5 jours après axotomie, on les retrouve dans près de 70% des cellules ganglionnaires (Hull et Bahr, 1994). Cette réexpression n'est soutenue que dans la rétine des animaux greffés; sans traitement régénératif l'expression s'estompe en moins de 2 semaines. Deux autres facteurs de transcription, ATF-2 et Fra-2, sont exprimés constitutivement dans les cellules ganglionnaires adultes (Robinson, 1996). Ici, l'expression chute après axotomie, mais le niveau basal est conservé dans les cellules ayant régénéré. D'autres gènes à réponse très précoce, comme Fos, Krox et CREB (Hull et Bahr, 1994; Robinson, 1994), ont aussi été étudiés dans les cellules ganglionnaires en régénération, mais aucun d'eux n'y semblent l'objet d'une régulation spécifique (Hull et Bahr, 1994; Robinson, 1994). Ainsi, l'état régénératif semble être associé spécifiquement à Jun. De plus, on sait que chez le poisson rouge, dont le nerf optique régénère spontanément (Stuermer, 1988), l'axotomie entraîne une expression soutenue de Jun (Herdegen *et al.*, 1993). Peut-être une telle différence de régulation génique chez le poisson et les mammifères explique-t-elle les capacités régénératives fort différentes de leurs neurones du système nerveux central.

D'autres gènes, chez le poisson, sont, comme Jun, régulés à la hausse de façon soutenue après axotomie. L'étude de ces molécules constitue une approche très intéressante pour mettre au jour les voies de signalisation associées à la régénération axonale. Chez le poisson, Tag-1, SC-1 et L1, molécules d'adhésion cellulaire membres de la superfamille des immunoglobulines, sont toutes – comme GAP-43 et Jun – régulées à la hausse de façon soutenue après axotomie (Paschke *et al.*, 1992; Giordano *et al.*, 1997; Warren *et al.*, 1999). Ces trois molécules sont aussi exprimées chez le rat, tant durant le développement que chez l'adulte. Toutefois, après axotomie, Tag-1 et SC-1 sont régulés à

la baisse et seule l'expression de L1 se poursuit (Jung *et al.*, 1997). La greffe d'un nerf périphérique n'affecte pas les niveaux d'expression de ces molécules, de telle sorte que seulement L1 continue d'être exprimée dans les cellules ganglionnaires en régénération (Jung *et al.*, 1997). Le fait que Tag-1 et SC-1 semblent être impliquées dans le processus régénératif chez le poisson rouge laisse supposer qu'une induction de ces molécules chez le rat lésé pourrait s'avérer intéressante en termes d'augmentation de capacité régénérative neuronale.

### **1.2.3 Mort et survie des cellules ganglionnaires**

Le nerf optique et la rétine constituent aussi un modèle idéal pour étudier l'effet des lésions axonales sur la survie des neurones. On peut léser les axones des cellules ganglionnaires par écrasement ou par section du nerf optique. Chez le rat, tant que la lésion est effectuée à au moins un demi millimètre du globe oculaire, elle n'entraîne pas de réaction ischémique dans la rétine (Kiernan, 1985). L'artère centrale de la rétine pénètre le nerf optique juste derrière la papille, et distalement, le nerf optique ne contient pas de grands vaisseaux internes. Avant de pénétrer le nerf optique, l'artère centrale chemine toutefois sur une longue distance à l'intérieur des méninges. Il faut donc aborder le nerf optique par une incision longitudinale de sa gaine pour léser le nerf en épargnant l'artère. De cette façon, les changements post-opératoires observés dans la rétine peuvent être attribués avec confiance à la dégénérescence axonale. Le décours temporel et la sévérité de la mort cellulaire induite par l'axotomie dépend du type de lésion effectuée et de sa distance par rapport à l'œil. Il est généralement admis que les lésions proximales, effectuées dans l'orbite, entraînent une mort cellulaire précoce, alors que les lésions

distales, intra-crâniennes, entraînent une mort cellulaire plus tardive et moins sévère (Villegas-Perez *et al.*, 1993; Berkelaar *et al.*, 1994).

#### 1.2.3.1 *L'axotomie entraîne l'apoptose*

Il semble de plus en plus évident qu'il existe un continuum, plutôt qu'une différence nette, entre l'apoptose et la nécrose (Nicotera *et al.*, 1999). Cependant, la plupart des études qui ont examiné la mort neuronale des cellules ganglionnaires axotomisées concluent à un mécanisme bel et bien apoptotique. En effet, cette mort cellulaire ne commence qu'à partir du 5<sup>e</sup> jour post-lésion, un délai caractéristique de l'apoptose (Berkelaar *et al.*, 1994). Cependant, dans les cellules ganglionnaires, les marqueurs de l'apoptose apparaissent très tôt après lésion : Bax (Isenmann *et al.*, 1997) et p38 MAP kinase (Kikuchi *et al.*, 2000) sont régulés à la hausse en moins de 6 heures; à 2 jours, le marquage Tunel apparaît (Isenmann *et al.*, 1997) et l'on peut, à 3 jours, détecter des noyaux pyknotiques (Barron *et al.*, 1986). De plus, l'inhibition pharmacologique de plusieurs voies de signalisation apoptotiques limite ou retarde la mort cellulaire (*cf. infra*). Enfin, chez la souris, la surexpression neuronale de l'anti-apoptotique Bcl-2 bloque la mort des cellules ganglionnaires axotomisées (Cenni *et al.*, 1996).

#### 1.2.3.2 *L'apoptose induite par la perte de facteurs trophiques?*

En accord avec la théorie trophique, selon laquelle le transport rétrograde des facteurs trophiques venant de la cible est nécessaire à la survie des neurones (pour revue, *cf. Oppenheim*, 1991), on attribue traditionnellement le déclenchement de l'apoptose induite par l'axotomie à l'interruption du transport des facteurs trophiques dérivés de la cible (Figure 3, p. 27). Les molécules trophiques potentiellement importantes pour les

cellules ganglionnaires incluent une variété de facteurs de croissance et de facteurs neurotrophiques. Un de ces facteurs, le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), semble être particulièrement important pour les cellules ganglionnaires durant leur développement. On sait que BDNF, *in vitro*, favorise la survie de cellules ganglionnaires néonatales dissociées (Johnson *et al.*, 1986). Au cours du développement *in vivo*, le récepteur de BDNF, TrkB, est exprimé par les cellules ganglionnaires (Rickman et Brecha, 1995); BDNF est aussi exprimé par les tissus cibles (Maisonpierre *et al.*, 1990; Friedman *et al.*, 1991; Schoups *et al.*, 1995) et la période de dépendance des cellules ganglionnaires au BDNF coïncide avec le décalage temporel de l'innervation de leurs cibles (Rodriguez-Tebar *et al.*, 1989). La question s'est posée à savoir si c'était le BDNF en provenance de la cible qui était important pour les cellules ganglionnaires? Chez le nouveau-né, l'ablation du collicule supérieur, cible de près de 90% des cellules ganglionnaires, entraîne une perte significative de ces cellules (Perry et Cowey, 1979; Cui et Harvey, 1995). Et même si l'ablation des collicules supérieurs cause également une lésion des terminaisons axonales, qui pourrait à elle seule contribuer à la mort cellulaire, des expériences où les collicules supérieurs sont lésés par l'injection d'acide kaïnique – sans effet sur les terminaisons axonales – ont montré une perte similaire des cellules ganglionnaires (Carpenter *et al.*, 1986). De plus, l'application de BDNF purifié dans le collicule supérieur pendant la période aiguë de mort cellulaire réduit significativement le nombre de cellules ganglionnaires pyknotiques (Ma *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent dans l'ensemble que le BDNF transporté par voie axonale rétrograde est important pour la survie des cellules ganglionnaires en développement.

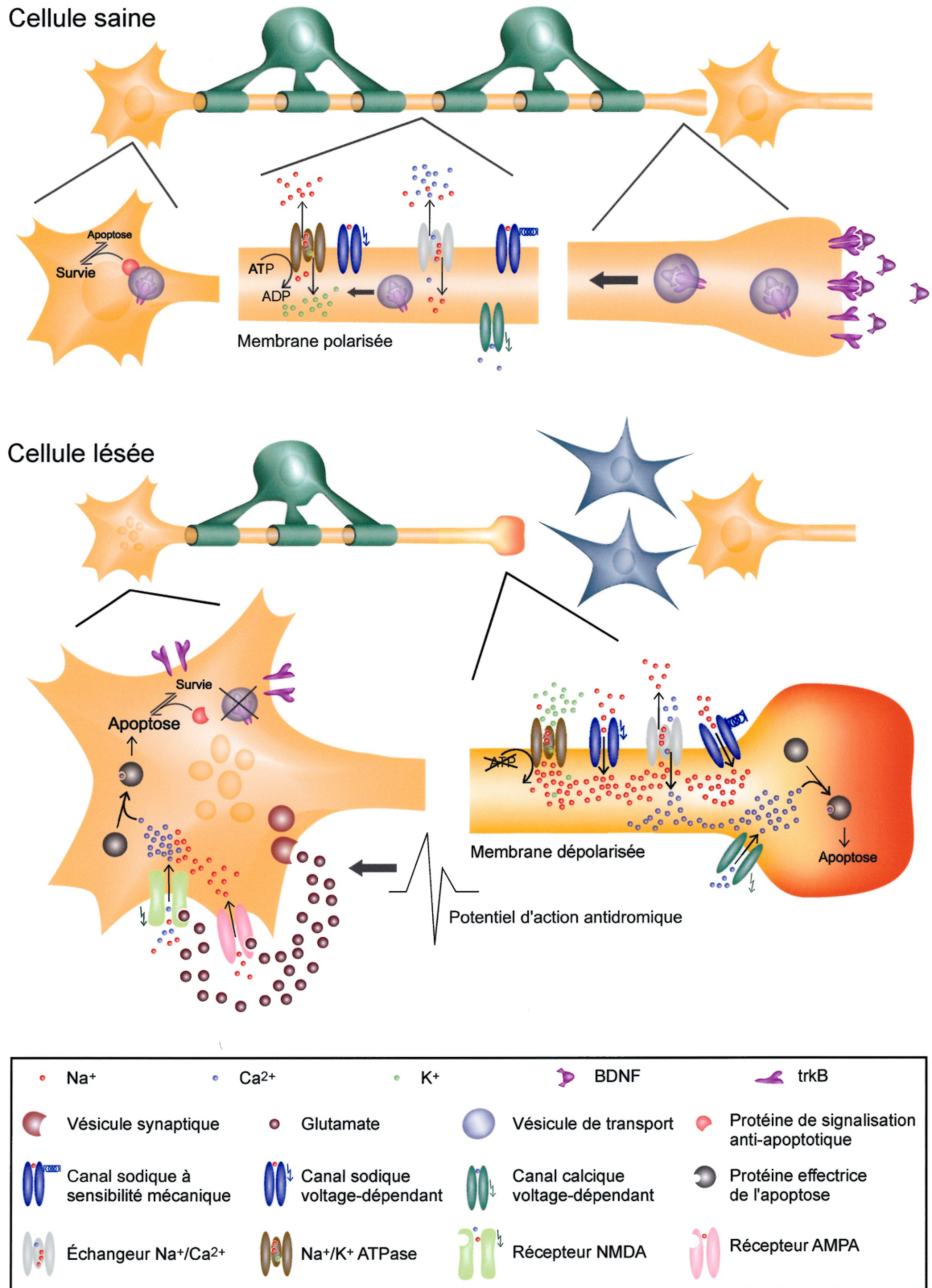


Figure 4. Mécanismes cellulaires pro-apoptotiques déclenchés par l'axotomie.

Est-ce que le transport rétrograde de BDNF est nécessaire à la survie des cellules ganglionnaires chez l'adulte? On sait aujourd'hui à ce sujet que le BDNF est bel et bien transporté de façon rétrograde par les cellules ganglionnaires adultes (Fournier *et al.*, 1997; Quigley *et al.*, 2000), et que ce transport est bloqué après élévation aiguë de la pression oculaire chez le rat, un modèle du glaucome (Pease *et al.*, 2000; Quigley *et al.*, 2000). Cependant, le transport de BDNF ne semble pas indispensable à la survie des cellules ganglionnaires adultes, puisqu'elles survivent à l'ablation combinée de leurs deux cibles principales – le noyau genouillé latéral et le collicule supérieur (Perry et Cowey, 1979). À elles deux, ces régions constituent la cible de plus de 99% des cellules ganglionnaires (Bunt *et al.*, 1974; Linden et Perry, 1983) (pour l'apport respectif, *cf.* Ahmed *et al.*, 1996) et la possibilité d'un apport trophique en provenance d'autres collatérales est faible; seulement 30% des cellules ganglionnaires se projettent sur l'aire prétectale (Young et Lund, 1998), moins de 1% sur l'hypothalamus (Moore *et al.*, 1995), et quelques unes seulement sur le tronc cérébral (Shen et Semba, 1994; Qu *et al.*, 1996). Les cellules ganglionnaires survivent donc sans l'apport de BDNF rétrogradement transporté et, probablement, à cause de la présence de BDNF produit dans la rétine. En effet, des expériences chez le poussin suggèrent que la majorité du BDNF trouvé dans la rétine ne provient pas du transport rétrograde (Herzog et von Bartheld, 1998). Par ailleurs, chez le rat adulte, les cellules ganglionnaires elles-mêmes montrent une régulation à la hausse de l'ARNm du BDNF par suite de lésion (Gao *et al.*, 1997). D'autres données expérimentales sont révélatrices à cet égard. L'apport de BDNF exogène, soit par injection intraoculaire (Mey et Thanos, 1993; Mansour-Robaey *et al.*, 1994; Peinado-Ramon *et al.*, 1996) soit par infection via un virus modifié (Di Polo *et al.*, 1998),



prolonge significativement, quoique temporairement, la survie des cellules ganglionnaires axotomisées. Ceci confirme que la perte de BDNF transporté par voie axonale rétrograde n'explique pas à elle seule la mort cellulaire provoquée par l'axotomie. D'ailleurs, en accord avec cette conclusion, le blocage du transport rétrograde dans le nerf optique du rat néonatal, par l'application de lidocaïne, n'induit l'apparition que d'un nombre limité de cellules ganglionnaires pyknotiques par comparaison avec une section du nerf optique (Fagiolini *et al.*, 1997). Il existe donc d'autres mécanismes, enclenchés par l'axotomie, par lesquels les cellules ganglionnaires entrent en mort cellulaire.

#### 1.2.3.3 *L'apoptose induite par excitotoxicité?*

Une hypothèse différente veut que la mort neuronale puisse être induite par la lésion axonale elle-même (Figure 3, p. 28). Un argument solide à l'appui de cette hypothèse est que plus les lésions sont rapprochées du corps cellulaire, plus sévère est l'apoptose (Berkelaar *et al.*, 1994). Quel serait alors le mécanisme par lequel une lésion axonale entraîne la mort des neurones? Dans le cas des cellules ganglionnaires, une réponse apportée à cette question suppose une excitotoxicité. En effet on sait qu'une lésion du nerf optique provoque une hausse de la concentration de glutamate dans le corps vitré (Yoles et Schwartz, 1998). Cette augmentation de glutamate, en agissant sur les récepteur AMPA et NMDA des cellules ganglionnaires enclencherait la chaîne d'événements typiques de l'excitotoxicité menant à l'apoptose : débordement du calcium intracellulaire, activation des cascades d'enzymes cataboliques, production de radicaux libres (Choi, 1992). L'effet bénéfique des bloqueurs du récepteur AMPA (Schuettauf *et al.*, 2000) ou du récepteur NMDA (Yoles *et al.*, 1997; Kikuchi *et al.*, 2000) dans ce modèle conforterait cette hypothèse. Par ailleurs, les bloqueurs des récepteurs

glutamatergiques métabotropiques – qui ne sont pas des canaux calciques – n’ont pas cet effet bénéfique (Kermer *et al.*, 2001).

On ne sait trop comment l’axotomie entraîne une libération de glutamate dans l’environnement du corps cellulaire, mais il est généralement accepté que l’excitotoxicité est une conséquence du déficit énergétique et que l’axotomie provoque localement un tel déficit (pour revue, *cf.* Choi, 1992). Selon ce modèle, donc, l’épuisement local de l’activité  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, provoquant une accumulation intracellulaire de  $\text{Na}^+$ , dépoliariserait graduellement l’axone, déclenchant ainsi l’ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants, la pénétration massive de  $\text{Na}^+$ , la création de potentiels d’actions antidromiques, et enfin, la libération au niveau des synapses somatiques et dendritiques d’une quantité excessive de glutamate.

L’augmentation de  $\text{Na}^+$  dans l’axone provoque aussi une pénétration locale de  $\text{Ca}^{2+}$  (LoPachin et Lehning, 1997). En effet, une concentration élevée de  $\text{Na}^+$  intracellulaire peut activer un fonctionnement inverse de l’échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et ainsi stimuler l’entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  (LoPachin et Lehning, 1997). De plus, les travaux récents de Wolf *et al.* (2001) suggèrent que les canaux calciques voltage-dépendants contribuent, eux aussi, à cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans les lésions partielles, associées à une déformation mécanique des axones, ces auteurs ont d’ailleurs montré que l’entrée initiale de  $\text{Na}^+$  s’effectue non pas seulement par les canaux sodiques voltage-dépendants, mais aussi par les canaux sodiques à sensibilité mécanique. Quel qu’en soit le mécanisme, l’entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$ , on le sait, déclenche la machinerie de l’apoptose (Choi, 1992). Cependant, on ignore si l’entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de l’axone a les mêmes conséquences apoptotiques que l’entrée de calcium au niveau du corps cellulaire par suite de

l'activation des récepteur NMDA. Dans les modèles de lésion partielle, le blocage de l'influx de calcium, par les bloqueurs de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (LoPachin et Lehning, 1997) ou même avec la tétradotoxine pour bloquer l'influx initial de  $\text{Na}^+$  (Teng et Wrathall, 1997; Rosenberg *et al.*, 1999), diminue les pertes axonales secondaires et favorise la récupération fonctionnelle. Cependant, on ne connaît toujours pas l'effet de ces inhibiteurs sur la survie des cellules ganglionnaires après lésion complète.

#### 1.2.3.4 Stratégies pour la survie : facteurs trophiques

Les différentes approches pharmacologiques visant à promouvoir la survie des cellules ganglionnaires axotomisées donnent une bonne idée des différents points de vue actuels sur les mécanismes en cause. Ainsi, conformément à la théorie trophique plusieurs tentatives ont eu pour but de limiter l'apoptose par application de neurotrophines. L'injection intravitreuse unique ou répétée de BDNF (Mey et Thanos, 1993; Mansour-Robaey *et al.*, 1994; Peinado-Ramon *et al.*, 1996), NT-4 (Mansour-Robaey *et al.*, 1994; Peinado-Ramon *et al.*, 1996), NGF (Carmignoto *et al.*, 1989), CNTF (Cui *et al.*, 1999), ou GDNF (Klocker *et al.*, 1997; Koeberle et Ball, 1998; Yan *et al.*, 1999) retarde l'apparition de la mort cellulaire et réduit sa sévérité dans les premières semaines après la lésion. Selon les laboratoires, la proportion des cellules ganglionnaires qui survivent à l'axotomie sans traitement est de 50-75% après 7 jours, 10-20% après 14 jours et 5-10% après 30 jours. La plupart des études se sont penché sur la survie à 14 jours (Tableau I, p.32) et l'injection de neurotrophines pouvait faire passer le taux de survie à 67% au mieux (Mansour-Robaey *et al.*, 1994). L'apport de neurotrophines par l'intermédiaire de vecteurs adénoviraux, infectant les cellules de Muller pour qu'elles synthétisent de façon prolongée les facteurs voulus, a été testé avec BDNF (Di Polo *et al.*, 1998) et CNTF

<u>Traitement</u>	<u>Lésion</u>	<u>Dist.</u>	<u>Temps</u>	<u>Témoins</u>	<u>Traités</u>	<u>ISA</u>	<u>Référence</u>
aFGF (45ng au site de lésion)	trans.	4,0	4	10%	34%	27%	(Sievers et al., 1987)
bFGF (45ng au site de lésion)	trans.	4,0	4	10%	31%	23%	(Sievers et al., 1987)
Grefte de nerf périphérique	trans.	0,5	2	16%	35%	23%	(Villegas-Pérez et al., 1988)
Grefte de nerf périphérique	trans.	0,5	4	6%	21%	16%	(Villegas-Pérez et al., 1988)
NGF (3ug 2x/sem)	trans.	8,0	7	13%	30%	20%	(Carmignoto et al., 1989)
Cellules de Schwann	trans.	8,0	14	8%	25%	18%	(Maffei et al., 1990)
MIF (1x5pmol)	trans.	0,5	2	20%	59%	49%	(Thanos et al., 1993)
BDNF (4x5ug)	trans.	0,5	2	12%	67%	63%	(Mansour-Robaey et al., 1994)
BDNF (1x5ug)	trans.	0,5	2	12%	41%	33%	(Mansour-Robaey et al., 1994)
Ponction du crystallin (1x)	trans.	0,5	2	12%	38%	30%	(Mansour-Robaey et al., 1994)
NT-4 (1x5ug)	trans.	0,5	2	22%	35%	17%	(Peinado-Ramon et al., 1996)
BDNF (1x5ug)	trans.	0,5	2	22%	55%	42%	(Peinado-Ramon et al., 1996)
Ad-BDNF	trans.	0,5	3	5%	26%	22%	(Dipolo et al., 1998)
Ad-BDNF	trans.	0,5	4	3%	13%	10%	(Dipolo et al., 1998)
BDNF (1x5ug)	trans.	0,5	4	3%	9%	6%	(Dipolo et al., 1998)
Inhibiteur de caspase-3 (4x4ug)	trans.	2,0	2	17%	45%	34%	(Kermer et al., 1998)
BDNF (3x0.5ug) + inhibiteur de RL 2xj	trans.	2,0	2	17%	73%	67%	(Klöcker et al., 1998)
BDNF (3x0.5ug) + inhibiteur de NOS 2xj	trans.	2,0	2	17%	62%	54%	(Klöcker et al., 1998)
GDNF (3x0.5ug)	trans.	2,0	2	16%	34%	21%	(Klöcker et al., 1998)
GDNF (1x5ug)	trans.	2,0	2	20%	47%	34%	(Koeberle et Ball, 1998)
Grefte de nerf périphérique	trans.	0,5	13	5%	13%	8%	(Villegas-Pérez et al., 1988)
Inhibiteur de cNOS (L-TC 1x0,5umol)	trans.	2,0	2	15%	53%	45%	(Koeberle et Ball, 1999)
BDNF (2x5ug)	trans.	0,5	2	9%	61%	57%	(Yan et al., 1999)
GDNF (2x 5ug)	trans.	0,5	2	9%	48%	43%	(Yan et al., 1999)
Ponction du crystallin (1x)	écras.	0,5	2	2%	39%	38%	(Fischer et al., 2000)
ATA (1x8ug, 1jpl)	trans.	0,5	2	15%	58%	51%	(Heiduschka et Thanos, 2000)
Inhibiteur de caspase-9 (4x4ug)	trans.	2,0	2	18%	37%	23%	(Kermer et al., 2000)
MK-801 (3x2nmol)	trans.	1,0	2	14%	53%	45%	(Kikuchi et al., 2000)
Inhibiteur de p38 MAPK (3x2nmol)	trans.	1,0	2	14%	51%	43%	(Kikuchi et al., 2000)
Ad-CNTF	trans.	2,0	2	17%	43%	31%	(Weise et al., 2000)
Vaccin pPLP non-enceph. (souris)	écras.	1,5	2	35%	51%	25%	(Fisher et al., 2001)
Vaccin pMOG non-enceph. (souris)	écras.	1,5	2	20%	28%	10%	(Fisher et al., 2001)

**Tableau 1.** Comparaison des différentes approches favorisant la survie des cellules ganglionnaires telles que rapportées dans la littérature. *Traitement*, description de l'agent et du dosage. *Lésion*, section (sect.) ou écrasement (écras.) du nerf optique. *Temps*, nombre de semaines post-lésion. *Témoins*, taux de survie moyen des cellules ganglionnaires axotomisées sans traitement. *Traités*, taux de survie moyen chez les animaux traités. *TSA*, taux de sauvetage ajusté = proportion des cellules autrement destinées à mourir qui survivent grâce au traitement. *RL*, radicaux libres; *NOS*, nitric oxide synthase; *non-enceph.*, non-encéphalitique; *Ad*, adénovirus. *Cf.* p.xvi pour autres abréviations.

(Weise *et al.*, 2000), mais tout comme l'injection répétée de BDNF (Mansour-Robaey *et al.*, 1994) ou l'application prolongée de NT-4 par mini-pompe implantée (Clarke *et al.*, 1998) ces stratégies n'entraînent, après un mois, qu'une amélioration marginale de la survie.

En fait, on croit aujourd'hui que, dans le cas d'un traitement prolongé au BDNF, la plupart des cellules ganglionnaires perdent graduellement leur sensibilité au support trophique. Des auteurs expliquent ce phénomène par la privation d'activité électrique et la baisse conséquente d'AMPc dans les cellules ganglionnaires lésées, ou encore par la perte de disponibilité membranaire du récepteur TrkB (Carter *et al.*, 1995; Meyer-Franke *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1999). Un désavantage des neurotrophines est leur effet secondaire potentiel. En culture, BDNF peut augmenter la production de radicaux libres et renforcer la mort cellulaire par nécrose (Koh *et al.*, 1995). Pour cette raison, une des approches pharmacologiques qui s'avère jusqu'à maintenant la plus efficace en termes de survie à 14 jours est l'injection répétée de BDNF combinée à l'injection de suppresseurs de radicaux libres et d'inhibiteurs de la NO synthase; le taux de survie est alors de 73%. On ne sait toujours pas, cependant, si l'application prolongée de ces inhibiteurs est suffisante pour assurer la survie à long terme des cellules ganglionnaires. Des travaux moins récents, misant sur une méthode différente d'application de facteurs trophiques, se sont limités à observer le taux de survie à un mois et ont obtenu des résultats plus satisfaisants que par l'approche intravitréale (Sievers *et al.*, 1987). Dans ces expériences, un taux de survie de ~30% a été atteint en plaçant au site de section un morceau de Gelfoam imbibé de aFGF ou bFGF. Ce résultat prouve tout au moins l'efficacité de l'administration locale d'un agent thérapeutique potentiel au site même de la lésion axonale. D'autres données

appuient l'idée selon laquelle des facteurs trophiques acheminés par transport axonal rétrograde peuvent contribuer à la survie neuronale. Les greffes de nerf périphérique peuvent être vues comme un autre moyen de fournir du BDNF de façon prolongée, puisque celui-ci est sécrété par les cellules de Schwann (Meyer *et al.*, 1992). De telles greffes favorisent la survie d'un nombre 2 à 3 fois plus élevé de cellules ganglionnaires à 3 mois, comparativement à l'axotomie sans traitement (Villegas-Perez *et al.*, 1988). De façon analogue, la transplantation de cellules de Schwann directement dans le corps vitré améliore significativement la survie à long terme (Maffei *et al.*, 1990). Il semblerait donc que l'apport vraisemblablement plus complexe des cellules de Schwann soit plus efficace à long terme que l'application d'un seul facteur trophique purifié. En effet, les cellules de Schwann sécrètent toute une gamme de facteur, dont BDNF (Meyer *et al.*, 1992), NGF (Rush, 1984), CNTF (Stockli *et al.*, 1989), GDNF (Henderson *et al.*, 1994) et bFGF (Liu *et al.*, 1995; Grothe *et al.*, 1997).

#### 1.2.3.5 Stratégies pour la survie : excitotoxicité et antiapoptotiques

D'autres approches pharmacologiques visent plutôt le processus d'excitotoxicité ou encore, directement, les voies apoptotiques. D'abord testé dans le contexte des lésions partielles, pour déterminer l'importance de l'excitotoxicité dans la dégénérescence secondaire (Yoles *et al.*, 1997), le bloqueur du récepteur NMDA, MK-801, administré par injection répétée après section du nerf optique, a fait passer la survie à 14 jours de 14% à 51% (Kikuchi *et al.*, 2000). La même neuroprotection pouvait être atteinte avec des injections d'un inhibiteur de la MAP kinase p38, une kinase traditionnellement associée à l'apoptose causée par le stress environnemental (pour revue, *cf.* Kyriakis et Avruch, 1996) et dont il est connu que l'expression est activée dans les cellules ganglionnaires qui

entrent en apoptose après administration de NMDA ou section du nerf optique (Kikuchi *et al.*, 2000). Une autre approche, visant à interférer directement avec la signalisation intracellulaire de l'apoptose, a eu recours à l'inhibition des caspases, connues pour leur rôle-clé dans la voie apoptotique (pour revue, *cf.* Cohen, 1997). Dans les cellules ganglionnaires, une caspase de type CPP32 est spécifiquement régulée à la hausse après section du nerf optique (Kermer *et al.*, 1998). Des injections intraoculaires d'un inhibiteur spécifique des caspases de ce type protège jusqu'à 34% des cellules ganglionnaires autrement destinées à mourir dans les 14 jours suivant l'axotomie. Enfin, on a rapporté qu'un autre inhibiteur de l'apoptose, l'acide aurintricarboxylique (ATA), dont on ignore le mécanisme d'action précis mais qui semble agir principalement par l'inhibition des endonucléases, a assuré la survie de 60% des cellules ganglionnaires à 14 jours, après une seule injection effectuée un jour après la section du nerf optique (Heiduschka et Thanos, 2000). L'efficacité de cette méthode devra toutefois être confirmée puisque, entre nos mains, l'ATA n'a eu aucun effet sur la survie (Annexe I).

#### 1.2.3.6 Stratégies pour la survie : modulation de l'immunité

Une troisième approche vise à moduler la réaction inflammatoire secondaire à la lésion. Les cellules microgliales de la rétine sont rapidement activées après l'axotomie (Perry *et al.*, 1987) et sont responsable de la phagocytose des cellules ganglionnaires en dégénérescence (Thanos, 1991). Des études *in vitro* et *in vivo* montrent aussi que la microglie rétinienne, tout comme les macrophages périphériques pénétrant au site de lésion, contribue à la dégénérescence des neurones par la production et la libération de molécules cytotoxiques (Giulian *et al.*, 1993, 1994; Kreutzberg, 1996). En injectant dans le corps vitré un peptide qui inhibe l'activité métabolique des macrophage, le MIF,

Thanos *et al.* (1993) ont vu la survie des cellules ganglionnaires multipliée par 6 un mois après l'axotomie. Selon ces études, il semble donc important de limiter l'activité inflammatoire après lésion pour augmenter la survie neuronale. Cependant, les macrophages peuvent aussi avoir un effet bénéfique sur la survie. En effet, d'autres études montrent qu'une ponction du cristallin, qui stimule la pénétration de macrophages ED-1<sup>+</sup> dans la rétine, augmente le nombre de cellules ganglionnaires qui survivent 2 ou 3 semaines après l'axotomie (Fischer *et al.*, 2000; Leon *et al.*, 2000). Une telle ponction a aussi un effet positif sur la régénération des cellules ganglionnaires après écrasement du nerf optique (*cf. infra*), et cet effet est mimé par l'application de Zymosan, un activateur des monocytes (Leon *et al.*, 2000). Ceci suggère que des monocytes activés peuvent favoriser la régénération des cellules ganglionnaires et probablement aussi leur survie. Cependant, l'effet prolongé sur la survie nécessite une activation soutenue des macrophages dans le corps vitré, un milieu très réfractaire à l'inflammation (Osusky *et al.*, 1996). Cette propriété a rendu vaines les tentatives de ces chercheurs en vue de prolonger les effets de la ponction du cristallin par l'injection d'interféron gamma ou l'introduction intravitréale de macrophages péritonéaux activés.

La réaction des lymphocyte T (LT) après lésion peut aussi être modulée en vue d'une neuroprotection. En effet, selon Schwartz (2001), les LT peuvent être bénéfiques pour les neurones après une lésion du système nerveux central. Les études de cet auteur ont montré qu'une réaction auto-immune bénéfique, mettant en jeu les LT, est déclenchée par toute lésion du système nerveux central (Yoles *et al.*, 2001). Le concept proposé par Schwartz est à l'effet que, parmi les LT endogènes qui s'accumulent non-spécifiquement au site d'une lésion du système nerveux central (Hirschberg *et al.*, 1998), certains sont



spécifiques pour des épitopes de la myéline. En contact avec ces épitopes, ces LT activés exerceraient un effet neuroprotecteur, vraisemblablement par la sécrétion de neurotrophines (Moalem *et al.*, 2000). En stimulant cette réaction naturelle en prenant soin de ne pas déclencher de réaction auto-immune néfaste, on pourrait amplifier l'effet neuroprotecteur des lymphocytes T et ainsi réduire la mort cellulaire. Du fait que ce n'est qu'en présence d'épitopes spécifiques encéphalitogènes que les LT peuvent entraîner l'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE), l'amplification de LT spécifiques à des épitopes non-encéphalitogènes pourrait avoir un effet bénéfique sans conséquences auto-immunes délétères. En effet, chez la souris, la vaccination contre des épitopes non-encéphalitogènes de deux protéines de la myéline, MOG et PLP, favorise la survie des cellules ganglionnaires après axotomie sans induire d'EAE (Fisher *et al.*, 2001).

### 1.3 Hypothèses sur l'échec régénératif du système nerveux central et stratégies stimulatrices

Depuis les découvertes importantes de Cajal sur le développement et la régénération des nerf périphériques, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'échec régénératif dans le système nerveux central. Ce champ de recherche demeure de nos jours très actif, en raison des percées importantes réalisées au cours des dernières années. Longtemps expliqué par l'existence d'une barrière gliale (Clemente, 1955), une carence en facteur trophique (Ramón y Cajal, 1914), ou encore l'absence de conduits formés par les cellules de Schwann (Halliburton, 1907), l'échec régénératif dans le système nerveux central est, depuis les années 80, attribué à la présence d'inhibiteurs actifs dans cet environnement. Les premiers tenants de cette hypothèse (Berry, 1982; Schwab et Thoenen, 1985) ont suggéré que ces inhibiteurs soient associés à la myéline,

une proposition appuyée par les nombreuses études qui ont suivi (pour revue, cf. David et McKerracher, 2000; Huber et Schwab, 2000). Aujourd'hui, depuis les expériences récentes suggérant l'importance d'inhibiteurs exprimés par la cicatrice gliale, une controverse s'est installée quant à l'importance de la myéline comme source d'inhibition *in vivo* (Davies *et al.*, 1999). Pour ajouter à cette polémique, d'autres données récentes laissent croire que ce soient plutôt des propriétés moléculaires intrinsèques acquises durant le développement qui confèrent aux neurones du système nerveux central leur piètre aptitude à la régénération (Goldberg et Barres, 2000; Cai *et al.*, 2001). Examinons maintenant ces différentes hypothèses (Figure 4, p. 39) et les stratégies régénératives qu'elles peuvent amener à proposer.

### **1.3.1 Protéines inhibitrices de la myéline**

Bien que l'hypothèse de l'inhibition dérivant de la myéline ait été formulée d'abord par Berry (1982), qui avait remarqué les meilleures capacités régénératives des fibres nonmyélinisées du système nerveux central, notamment celles des cellules ganglionnaires poussant à l'intérieur de la rétine (McConnell et Berry, 1982), ce sont les travaux de Schwab et Thoenen (1985) qui ont donné le véritable coup d'envoi de la théorie sur les inhibiteurs de croissance. Ces auteurs ont comparé la croissance neuritique de neurones dissociés mis en contact avec des explants de nerf optique ou de nerf sciatique en présence de NGF. Après deux semaines en culture, aucun axone n'était détecté dans les explants de nerf optique, alors qu'une croissance massive avait eu lieu dans les explants de nerf sciatique, et ce même lorsque leurs cellules de Schwann avaient été préalablement tuées. Une conclusion s'imposait : le nerf optique présentait des

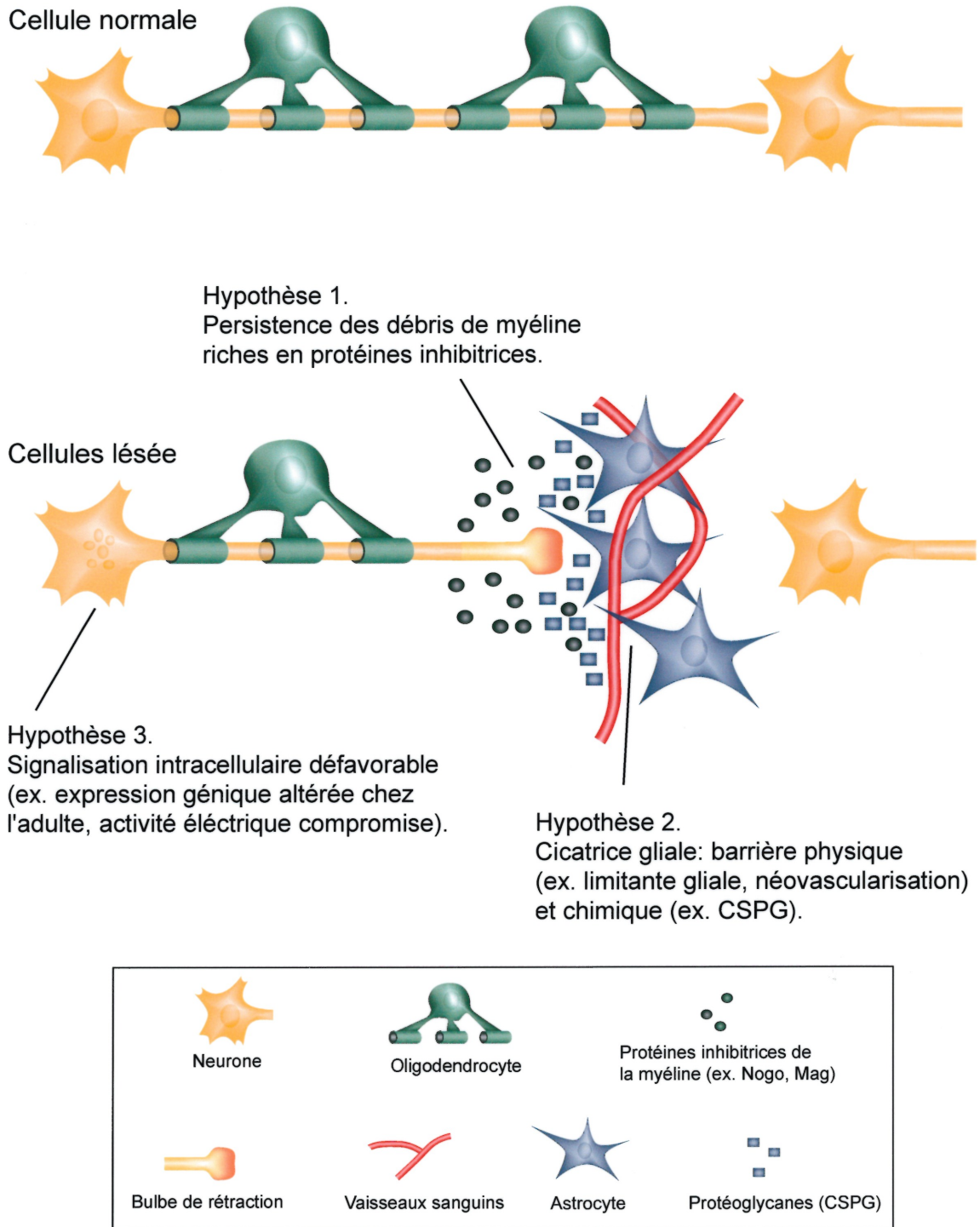


Figure 3. Hypothèses actuelles sur l'échec régénératif des axones du système nerveux central adulte.

conditions non-permissives à la croissance qui ne pouvaient être compensées par l'effet trophique connu du NGF.

#### 1.3.1.1 *L'inhibition par Nogo*

L'identification, dans la myéline du système nerveux central du rat, de deux fractions membranaires ayant de puissantes propriétés inhibitrices fournit peu après la preuve de l'existence de facteurs inhibiteurs de la croissance (Caroni et Schwab, 1988b). De plus, IN-1, un anticorps monoclonal levé contre ces fractions, rendit possible la croissance axonale de neurones dissociés dans l'environnement non-permissif d'explants de nerf optique (Caroni et Schwab, 1988a). L'importance *in vivo* de ces fractions membranaires, dont l'identité exacte restait inconnue, fut démontrée lorsque IN-1, sécrété *in situ* par des hybridomes transplantés, stimula la régénération axonale dans le tractus corticospinal (Schnell et Schwab, 1990) et le nerf optique (Weibel *et al.*, 1994) de jeunes rats, ainsi qu'au sein du tractus corticospinal du rat adulte, lorsque combiné à des greffes de tissu embryonnaire (Schnell et Schwab, 1993). Dans d'autres expériences, l'anticorps IN-1 favorisa aussi la récupération de certaines fonctions locomotrices après lésion du tractus corticospinal chez de jeunes rats adultes (Bregman *et al.*, 1995).

Ce n'est que récemment que trois laboratoires, simultanément, sont parvenus à cloner la protéine correspondant à l'une de ces fractions membranaires myéliniques, qui fut appelée Nogo-A (Chen *et al.*, 2000; GrandPre *et al.*, 2000; Prinjha *et al.*, 2000). La Nogo-A recombinante inhibe la croissance neuritique des neurones sensibles à la myéline (Chen *et al.*, 2000; GrandPre *et al.*, 2000; Prinjha *et al.*, 2000), et de nouveaux anticorps contre Nogo-A neutralisent en grande partie le pouvoir inhibiteur *in vitro* de la myéline (Chen *et al.*, 2000), confirmant le rôle de Nogo comme constituant inhibiteur dérivé de la

myéline. Ces publications initiales ont toutefois provoqué une certaine confusion quant au domaine de Nogo-A responsable de l'activité inhibitrice. Alors que deux groupes (Chen *et al.*, 2000; Prinjha *et al.*, 2000) ont localisé l'activité inhibitrice à une région aminoterminal spécifique à Nogo-A, le troisième (GrandPre *et al.*, 2000) situe cette activité dans un domaine de 66 résidus (Nogo-66), contenu entre deux domaines hydrophobes, commun aux isoformes Nogo-B et Nogo-C, lesquelles, selon Chen *et al.* (2000) sont dépourvues d'activité inhibitrice. Ces résultats ont donc compliqué d'emblée l'interprétation du mode de fonctionnement de cet inhibiteur. Cependant, même si la question n'est pas encore réglée, le groupe de Strittmatter a récemment identifié un récepteur responsable de l'effet inhibiteur de Nogo-66 (Fournier *et al.*, 2001). Ce récepteur de Nogo-66 (NgR) est exprimé dans le cerveau adulte, et notamment dans le cortex, où se trouvent les neurones pyramidaux stimulés par IN-1 après lésion médullaire. De plus, NgR est détectable par immunocytochimie sur les axones de neurones en culture, et ce de façon prééminente dans les cultures de neurones d'embryon plus tardif, où l'inhibition par Nogo est également plus forte comparativement aux neurones de stade embryonnaire plus précoce. Ces résultats appuient l'hypothèse voulant que Nogo-66 soit bien un inhibiteur de croissance axonale dans le système nerveux central.

#### 1.3.1.2 L'inhibition par MAG

Deux laboratoires avaient démontré en 1994 des propriétés inhibitrices d'un autre composant de la myéline, la *myelin associated glycoprotein* (MAG; McKerracher *et al.*, 1994; Mukhopadhyay *et al.*, 1994). Tant la MAG native, purifiée à partir de la myéline de bovin (McKerracher *et al.*, 1994), que la MAG recombinante exprimée par des cellules CHO (Mukhopadhyay *et al.*, 1994), inhibent la croissance neuritique de plusieurs

populations neuronales en culture. En plus de ses effets inhibiteurs comme molécule liée au substrat, la MAG, dans sa forme soluble, inhibe aussi la croissance neuritique de neurones cultivés sur des substrats permissifs constitués de molécule d'adhésion comme L1, N-CAM et N-cadhérine, ce qui suggère un rôle de molécule inhibitrice et non seulement de substrat non-permissif (Tang *et al.*, 1997b). En effet, les cônes de croissance de neurones en culture s'effondrent dès qu'ils entrent en contact avec MAG (Li *et al.*, 1996). Par ailleurs, DeBellard *et al.* (1996) ont montré que MAG inhibe la croissance neuritique en interagissant avec une sialoglycoprotéine propre à toute une variété de neurones. Cependant, un réel récepteur de MAG n'a jamais été identifié.

L'importance de MAG *in vivo* a été difficile à démontrer vu l'absence d'anticorps capables de bloquer sa fonction *in vitro* (Tang *et al.*, 1997a). Les expériences visant à comparer le potentiel inhibiteur de la myéline extraite des souris  $MAG^{+/+}$  et  $MAG^{-/-}$  ont donné, dans différents laboratoires, des résultats contradictoires (Bartsch *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998). La capacité des souris  $MAG^{-/-}$  à régénérer des axones corticospinaux n'a pu être clairement démontrée (Bartsch *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996). Ces résultats ne sont toutefois pas surprenant, compte tenu de la persistance d'autres facteurs contribuant au caractère inhibiteur de la myéline chez les souris  $MAG^{-/-}$ . L'implication de MAG *in vivo* a été mieux démontrée dans le système nerveux périphérique, où cette protéine s'exprime aussi. Chez des souris mutantes où le recrutement et l'activation des macrophages sont déficients, le ralentissement de la dégénérescence wallérienne entraîne une réduction significative de la régénération axonale (Brown *et al.*, 1992; Chen et Bisby, 1993). En revanche, lorsque ces souris sont croisées avec des souris MAG  $-/-$ , et que leur myéline est donc dépourvue de MAG, la

capacité régénérative apparaît significativement augmentée (Schafer *et al.*, 1996). L'absence de Nogo dans les cellules de Schwann pourrait expliquer pourquoi cette situation révèle l'importance de MAG.

Malgré qu'un récepteur de MAG n'ait toujours pas été identifié, on commence à comprendre la cascade intracellulaire déclenchée dans les neurones dont la croissance est inhibée par MAG. En effet, plusieurs études ont lié l'effet inhibiteur de MAG aux niveaux d'AMPC intracellulaire (Song *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 1999). Lorsque les neurones de *Xenopus* sont mis en culture, ils s'éloignent d'une source de MAG, par contre, lorsque l'AMPC intracellulaire est élevé par activation de la protéine kinase A (PKA), cette répulsion est transformée en attraction (Song *et al.*, 1998). De façon similaire, l'addition d'un analogue stable de l'AMPC permet aux neurones en culture d'élaborer des neurites sur un substrat inhibiteur composé de MAG ou de myéline. Ces résultats suggèrent que MAG agit sur les neurones en modulant l'AMPC, un mécanisme qui semble être commun à plusieurs molécules affectant la croissance des neurites, tant pour les inhibiteurs que pour les facteurs trophiques (Song *et al.*, 1998; Ming *et al.*, 1999; Song et Poo, 1999).

Il apparaît donc, que deux constituants de la myéline, MAG et Nogo, exercent une activité inhibitrice bien démontrée. Quant à l'importance de la myéline comme source d'inhibition axonale *in vivo*, elle est aussi appuyée par d'autres observations : au cours de l'ontogenèse, on observe chez le rat, le poussin et l'opossum une étroite corrélation entre la fin de la période autorisant la régénération, l'apparence des premiers oligodendrocytes différenciés et le début de la myélinisation (Hasan *et al.*, 1991; Bregman *et al.*, 1993; Saunders *et al.*, 1998). Chez l'adulte, la capacité des neurones du système nerveux central à régénérer est inversement proportionnelle à leur degré de myélinisation (Berry, 1982;

Kapfhammer et Schwab, 1994a, 1994b). L'élimination des oligodendrocytes par irradiation aux rayons-X (Weibel *et al.*, 1994) ou l'accélération de la dégradation de la myéline après lésion par transplantation de macrophages activés (Lazarov-Spiegler *et al.*, 1996) stimulent la régénération du nerf optique. Enfin, un vaccin générant des anticorps contre la myéline (*cf.* chapitre 4) stimule la régénération dans la moelle épinière de la souris adulte (Huang *et al.*, 1999). Alors que ces études supportent, ensemble, un rôle de la myéline dans l'échec régénératif du système nerveux central, il faut néanmoins tenir compte de données récentes qui remettent à jour un rôle éventuel de la cicatrice gliale (Davies *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999).

### **1.3.2 Cicatrice gliale : barrière physique et chimique**

Dans les années 50 à 70, plusieurs neurobiologistes acceptaient l'hypothèse voulant que les axones centraux ne présentent pas de régénération parce qu'incapables de pénétrer la cicatrice gliale qui se développe au site de lésion. Cette hypothèse, initialement proposée par Sugar et Gerard (1940), avait rapidement reçu l'appui de plusieurs travaux où une stimulation de la régénération avait été observées par suite de traitements capable de réduire la densité de la cicatrice gliale (pour revue, *cf.* Clemente, 1955). On avait déjà décrit à cette époque les principaux événements cellulaires menant à la formation de cette cicatrice : dépôt de collagène, formation de tissu conjonctif dense, pénétration de macrophages, néovascularisation et rétablissement d'une limitante gliale (Clemente, 1955). On savait aussi que les lésions chez le rat néonatal ne causent pas ce type de cicatrice, ce qui suggérait d'emblée l'importance de cette barrière physique dans l'échec régénératif chez l'adulte.



Ce n'est que récemment qu'on a examiné et revu en détail la progression des événements cellulaires impliqués dans la formation de la cicatrice gliale (pour revue, *cf.* Maxwell *et al.*, 1990). Dans les premières heures après lésion on observe une diminution rapide du nombre d'astrocytes périvasculaires au voisinage immédiat de la lésion; l'influx de plasma entraîne la formation d'un œdème, puis le contenu plasmatique, ainsi extravasé, entre en contact avec les astrocytes en périphérie du site, qui amorcent une hypertrophie et expriment intensément la GFAP; c'est la phase de gliose réactive. Au deuxième jour s'amorce la migration des monocytes suivie de celle des macrophages qui sécrètent le FGF. Attirées des méninges par ce facteur, les fibroblastes envahissent alors le site de lésion et forment un tissu conjonctif dense entre les ramifications des capillaires sanguins. En parallèle, dès le jour 4, les prolongements astrocytaires s'insinuent à travers le neuropile et créent, en formant des desmosomes les uns avec les autres, une couche étanche qui sépare le tissu nerveux du tissu mésenchymateux. C'est cette couche cellulaire, et la membrane basale riche en collagène qu'elle dépose, qu'on appelle collectivement limitante gliale. Dans les lésions pénétrantes du cerveau celle-ci est achevée au 8<sup>e</sup> jour post-lésion.

C'est donc cette structure tridimensionnelle dense qui semblait, pour plusieurs, bloquer la régénération des axones. Cependant, l'étanchéité de cette barrière n'atteint sa maturité qu'après la période initial de bourgeonnement axonal (Maxwell *et al.*, 1990; Berry *et al.*, 1996, et *cf.* chapitre 3), ce qui suggère que ce ne sont pas les propriétés physiques de la cicatrice qui empêchent la régénération des premiers bourgeons axonaux, mais plutôt une déficience du milieu extracellulaire de la cicatrice, ou encore la présence de facteurs inhibiteurs. Pour aborder cette question, l'équipe de Silver a élaboré une

expérience originale (Rudge et Silver, 1990) : dans le but de tester les propriétés de la cicatrice gliale *in vitro*, ces auteurs ont implanté des filtres de nitrocellulose dans le cortex d'animaux adultes ou néonataux. Une fois les filtres envahis par les cellules de la cicatrice, il les ont prélevés et mis en culture. Quelques jours après avoir déposé sur ces filtres des neurones hippocampiques, ils ont observé une croissance neuritique et démontré une croissance significativement réduite sur des filtres provenant d'animaux adultes par comparaison à ceux provenant d'animaux néonataux. Puisque, dans ce modèle *in vitro*, la croissance axonale était inhibée sur une surface bi-dimensionnelle, on ne pouvait s'expliquer l'inhibition dans la cicatrice gliale – ou ici sur un substrat d'astrocytes réactifs – uniquement par des contraintes mécaniques. Dans des études qui suivirent, il fut démontré que l'inhibition de la croissance neuritique sur ces filtres était corrélée à la quantité de deux types de molécules inhibitrices présents à la surface des astrocytes réactifs (McKeon *et al.*, 1991). Ces molécules, les CSPG et la ténascine, venaient de faire l'objet d'une étude démontrant leur activité inhibitrice *in vitro* (Snow *et al.*, 1990). L'implication des CSPG fut démontrée encore plus directement dans une expérience subséquente, où, après traitement avec la chondroïtinase ABC qui modifie enzymatiquement les CSPG, la croissance neuritique sur les filtres adultes apparut significativement accrue (McKeon et Silver, 1995). Il semble donc, selon ces expériences, que la cicatrice gliale produise elle même des molécules inhibitrices qui pourraient expliquer comment les bourgeons axonaux ne dépassent pas le site de lésion dans l'intervalle précédent l'apparition de la limitante gliale.

Des expériences récentes de ce même groupe ont tenté d'explorer dans le cerveau du rat adulte l'importance relative de ces nouveaux inhibiteurs par rapport aux inhibiteurs

dérivés de la myéline. À l'aide d'une technique de micro-transplantation qui limite la formation de la cicatrice gliale (Davies *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1994), ces auteurs ont transplanté des neurones de ganglion rachidien de souris adulte dans le corps calleux de rats adultes (Davies *et al.*, 1997). Ces neurones, observés après quelques jours, avaient élaboré de longues projections dans un milieu riche en myéline. Dans les greffes où la réaction gliale avait excédé un certain seuil, tel que révélé par l'expression de CSPG, les axones ne montraient pas de régénération. Dans cette situation, en l'absence apparente de barrière physique GFAP-positive, certains axones avaient fait demi-tour à l'approche de régions spécifiquement riches en CSPG. Ces données suggèrent donc l'importance *in vivo* des CSPG dans l'échec régénératif, et jetèrent un doute sur l'importance relative de la myéline. Une des premières critiques adressées à ces expériences était à l'effet que la myéline restée intacte dans ces conditions n'avait peut-être pas « exposé » ses inhibiteurs, comme on pourrait supposer qu'elle le fasse après une lésion conventionnelle. Pour aborder cette question, le groupe de Silver a transplanté les mêmes neurones, selon la même technique de micro-transplantation, dans des faisceaux de matière blanche d'une moelle épinière en état de dégénérescence aiguë ou chronique (Davies *et al.*, 1999). Dans ces conditions, les neurones ont néanmoins élaboré de long prolongements le long de la moelle épinière, en étroit contact avec la myéline, jusqu'au site de la lésion initiale de la moelle où les cônes de croissance sont apparus stoppés et de type dystrophique. Ces expériences confirment donc que les CSPG sont un important obstacle à la régénération et que la myéline peut mieux supporter la croissance qu'on ne le croyait auparavant. Il n'en reste pas moins que cette démonstration s'appuie sur une situation artificielle, où les neurones de ganglion rachidien de souris, avant d'être transplantés, doivent

nécessairement être lésés puisqu'ils sont dissociés. On peut croire qu'un tel traitement, outre la différence d'espèce souris-rat, puisse influencer la sensibilité des neurones transplantés aux inhibiteurs de la myéline, compte tenu notamment de l'effet, bien décrit, des lésions « conditionnantes » (Richardson et Issa, 1984; *cf. infra*, section 1.3.3). Silver et son groupe répondent à ce sujet qu'au cours de leurs travaux, les neurones de GR de souris, mis en coculture avec des oligodendrocytes de rat adulte, ont élaboré des neurites relativement plus courts que ceux mis en culture sur un substrat de laminine (Davies *et al.*, 1999), suggérant que les neurones transplantés n'ont pas perdu leur sensibilité *in vitro* aux inhibiteurs dérivés de la myéline. Par ailleurs, si dans leur modèle la myéline ne semble pas inhiber la croissance des axones, la démonstration directe d'une telle inhibition par les CSPG reste à faire.

Un appui à l'hypothèse de Silver est récemment venu d'une expérience qui a directement testé l'importance des CSPG *in vivo*, en démontrant que l'infusion de chondroïtinase ABC après lésion d'un faisceau de matière blanche du système nerveux central pouvait à elle seule stimuler la régénération axonale (Moon *et al.*, 2001). Dans ce travail, des neurones dopaminergiques de la substance noire, lésés au sein du faisceau nigrostriatal, ont régénéré leur axone jusqu'au striatum où ils ont formé de nombreuses branches. Ce résultat récent constitue la première preuve directe d'un rôle des CSPG dans l'inhibition de la régénération *in vivo*. Il sera intéressant de tester l'efficacité de ce traitement dans le contexte de lésions impliquant des faisceaux plus longs, et particulièrement dans la moelle épinière ou dans le nerf optique, où les résultats pourraient être comparés à ceux obtenus grâce à d'autres stratégies.

### **1.3.3 Perte de l'aptitude à la régénération et modulation de la signalisation**

L'importance *in vivo* de l'inhibition active, qu'elle vienne de la myéline ou de la cicatrice, se doit d'être réévaluée avec un esprit critique. Plusieurs modèles expérimentaux suggèrent en effet que, peu importe le substrat sur lequel l'axone doit repousser, c'est la régulation moléculaire, au niveau du corps cellulaire, qui en grande partie détermine l'efficacité de la régénération. En d'autres termes, c'est peut-être « l'état régénératif » du neurone qui détermine comment son cône de croissance réagit aux molécules de la myéline ou de la cicatrice gliale. Même si différentes données expérimentales en soulignent l'importance, on ne sait pas encore comment s'opère la régulation moléculaire de cet état régénératif et si elle dépend de l'activité électrique ou d'un programme ontogénique préétabli.

#### *1.3.3.1 Les neurones du système nerveux central intrinsèquement désavantagés?*

D'abord, malgré leur efficacité à stimuler la régénération de longs axones, les greffes de nerf périphériques n'entraînent la régénération que d'une faible proportion des neurones lésés, peu importe le site de la greffe (pour revue, *cf.* Aguayo, 1985; Bray *et al.*, 1987). Autre fait significatif: jamais des faisceaux centraux lésés ne parviennent à envahir un greffon de nerf périphérique avec autant d'efficacité que les branches périphériques de neurones ganglionnaires rachidiens ou de neurones moteurs (McQuarrie, 1978; Oblinger et Lasek, 1984). Il doit donc nécessairement exister une différence intrinsèque dans le potentiel régénératif de ces neurones. On sait d'ailleurs que différentes populations neuronales du système nerveux central répondent avec plus ou moins de succès aux greffes de nerf périphérique (pour revue, *cf.* Aguayo, 1985). Dans le nerf optique, il est tentant d'expliquer la faible proportion de cellules ganglionnaires qui

réussissent à régénérer après une greffe par l'importance de la mort neuronale qu'entraîne l'axotomie (Villegas-Perez *et al.*, 1988; Villegas-Perez *et al.*, 1993). Cependant, même dans les greffes effectuées dans une région du cerveau où une majorité de neurones survivent à l'axotomie, le taux de régénération axonale reste faible (Richardson *et al.*, 1984). De plus, l'absence de régénération spontanée chez la souris surexprimant *bcl-2*, où toutes les cellules ganglionnaires survivent un mois après lésion (Chierzi *et al.*, 1999), suggère que la simple survie d'un neurone central n'est pas suffisante pour favoriser son état régénératif.

#### 1.3.3.2 Stimuler la régénération axonale au niveau du corps cellulaire

On a montré dans différents modèles expérimentaux qu'il est possible de stimuler la régénération axonale au delà de la cicatrice gliale et dans l'environnement de la myéline sans intervenir directement avec des constituants de l'un ou de l'autre. L'effet des lésions conditionnantes traduit bien cette possibilité. En effet, la section simultanée de la branche périphérique d'un neurone sensoriel favorise remarquablement la régénération de son long axone spinal (Richardson et Issa, 1984), vraisemblablement sous l'influence d'éléments induisant un certain état régénératif au niveau du corps cellulaire. Dans le nerf optique adulte, on a pu stimuler la régénération de nombreux axones au delà d'un site d'écrasement, grâce à l'insertion d'explants de nerf sciatique dans le corps vitré (Berry *et al.*, 1996). Il faut donc imputer un tel effet à l'action de facteurs libérés par ces explants, qui vraisemblablement stimulent les cellules ganglionnaires à entrer dans un mode régénératif. Des données plus récentes ont montré une réaction similaire des cellules ganglionnaires après lésion du cristallin (Leon '00). En effet, une telle lésion, effectuée au

même moment qu'un écrasement du nerf optique augmente significativement la régénération. Les facteurs libérés par le cristallin ne sont pas encore identifiés, mais les données actuelles indiquent qu'ils stimulent l'infiltration de macrophages, activent les cellules de Müller et entraînent une augmentation d'expression de GAP-43 dans les cellules ganglionnaires (Leon *et al.*, 2000). Les macrophages semblent jouer un rôle-clé puisque l'injection intravitréale d'une préparation membranaire de levure, le Zymosan, induit les macrophages en l'absence de lésion du cristallin et stimule aussi la régénération. Tant dans le cas des explants que dans celui des lésions du cristallin, on peut difficilement expliquer l'effet stimulant sur la régénération par la libération de BDNF, puisque l'injection intra-oculaire de BDNF ne parvient pas à stimuler la régénération dans le nerf optique (Mansour-Robaey *et al.*, 1994). Il sera intéressant de connaître la nature des facteurs libérés dans le corps vitré et surtout les cascades de signalisation qu'ils déclenchent dans les cellules ganglionnaires.

#### 1.3.3.3 Une voie de signalisation purement régénérative?

Récemment, des études *in vitro* ont montré l'existence d'une voie de signalisation qui semble stimuler la régénération sans avoir d'effets concomitants sur la survie. Le joueur-clé de cette voie est la protéine kinase N (PKN), une sérine-thréonine kinase induite par le NGF (Batistatou *et al.*, 1992; Volonte et Greene, 1992). En culture, un inhibiteur spécifique de la PKN, la 6-TG, bloque la croissance neuritique induite par le NGF sans affecter la survie (Volonte *et al.*, 1989; Greene *et al.*, 1990), alors que l'inosine, vraisemblablement agoniste de PKN, renverse cet effet de la 6-TG (Benowitz *et al.*, 1998). Dans les cellules ganglionnaires en culture, l'axogenèse stimulée par les neurotrophines coïncide avec l'activation de plusieurs gènes, dont GAP-43, et la 6-TG

bloque cette activation (Petrausch et al., 2000b). L'inosine, en revanche, stimule la croissance neuritique en l'absence de neurotrophine (Benowitz et al., 1998) et augmente l'expression de GAP-43 (Petrausch et al., 2000b). Dans une étude *in vivo*, il a été constaté que l'inosine ne stimule pas, comme telle, la régénération d'axones lésés du tractus corticospinal, mais induit, dans la zone dénervée, un vigoureux bourgeonnement compensatoire des axones de neurones pyramidaux controlatéraux épargnés par la lésion (Benowitz et al., 1999).

L'étude de cette nouvelle voie de signalisation est prometteuse. Il sera intéressant de voir si elle peut aussi nous renseigner sur les mécanismes qui permettent aux axones des cellules ganglionnaires de régénérer, *in vivo*, sur des substrats inhibiteurs, notamment après lésion du cristallin ou transplantation d'explants de nerf périphérique. Un tel effet pourrait dépendre d'une régulation de l'expression membranaire des récepteurs de molécules inhibitrices, ou impliquer les différents éléments des cascades de signalisation déclenchées par l'interaction du cône de croissance avec son environnement. Plusieurs données récentes favorisent ces deux hypothèses. Ainsi, il a été montré que l'expression membranaire des récepteurs neuronaux impliqués dans le guidage axonal peut être considérablement modulée au cours du développement (ex. sémaphorines, Bastiani *et al.*, 1987; intégrines, Hall *et al.*, 1987; TAG-1, Dodd *et al.*, 1988; Unc-5, Hamelin *et al.*, 1993). Chez l'adulte, une telle modulation provoquée artificiellement serait envisageable. Par ailleurs, Bandtlow et Löschinger (1997) ont constaté *in vitro* que la sensibilité des neurones centraux à l'effet inhibiteur de NI-35/250 (Nogo) ne s'acquiert qu'après le stade néonatal, suggérant que l'expression des récepteurs impliqués dans l'inhibition subit elle aussi une régulation ontogénique. Là encore, chez l'adulte, cette expression pourrait être



artificiellement modulée. L'identification récente du récepteur de Nogo (Fournier *et al.*, 2001) devrait permettre de mettre cette dernière hypothèse à l'épreuve.

#### 1.3.3.4 *L'inhibition est modulable*

Les études *in vitro* ayant montré qu'une molécule inhibitrice comme MAG, peut susciter une réponse attractive si les niveaux intracellulaire d'AMPc sont élevés, et qu'inversement l'effet attractif de BDNF peut être transformé en effet répulsif (Song *et al.*, 1998), suggèrent fortement qu'*in vivo* les neurones adultes répondent à l'environnement en fonction de leur configuration intracellulaire du moment, ce qu'on pourrait appeler leur « état régénératif ». Une nouvelle approche, développée par McKerracher, vise justement à faire passer le cône de croissance dans cet état régénératif en inactivant la GTPase Rho. Rho est un élément important des voies de signalisation reliant l'environnement extracellulaire au cytosquelette (Mackay *et al.*, 1996; van Leeuwen *et al.*, 1997), qu'on croit impliqué dans l'effondrement des cônes de croissance et la rétraction des neurites (Jalink *et al.*, 1994; Tigyi *et al.*, 1996; Katoh *et al.*, 1998). L'application de C3, un inhibiteur de Rho, au site même d'une lésion du nerf optique, stimule la régénération axonale (Lehmann *et al.*, 1999). De plus, en présence de C3, la croissance neuritique sur des substrats inhibiteurs *in vitro* est grandement améliorée (Lehmann *et al.*, 1999).

#### 1.3.3.5 *Conclusions sur l'échec régénératif*

Comment alors expliquer l'échec régénératif du système nerveux central chez l'adulte? Il est vrai que la cicatrice gliale se forme avec beaucoup d'ampleur une fois dépassé le stade néonatal (Berry *et al.*, 1983). Il est vrai aussi que la myélinisation

coïncide avec une perte de la capacité de régénération spontanée (Schonbach *et al.*, 1968; Kalil et Reh, 1979; Bregman *et al.*, 1993). Cependant il ne faut pas perdre de vue que des changements ontogéniques s'opèrent aussi au niveau du neurone lui-même. Raisman et son équipe l'ont montré dans une expérience d'une élégante simplicité : lorsque deux régions adjacentes du cerveau, prélevées à différents âges, furent mises au contact l'une de l'autre en culture, les neurones des régions jeunes innervèrent rapidement les régions plus âgées, tandis que ceux des régions âgées n'ont pas innervé les régions jeunes (Li *et al.*, 1995). Riche en astrocytes réactifs, l'interface entre les régions était la même dans les deux cas, et la myélinisation avait été bien amorcée dans les couches plus âgées, ce qui montre que l'âge des neurones était le principal déterminant de leur réponse régénérative, et non la maturité ou le degré de myélinisation du neuropile à travers lequel ils devaient pousser. On ne connaît pas encore la régulation moléculaire responsable de ce changement ontogénique du neurone, mais il est raisonnable de spéculer, un peu comme on l'a vu plus haut, qu'il implique soit le début de l'expression de récepteurs de molécules inhibitrices associées à la myéline ou à la cicatrice gliale, soit des changements qui affectent les voies de signalisation déclenchées par ces récepteurs. En fait, des données récentes du laboratoire de Filbin suggèrent que ce sont des changements ontogéniques des niveaux neuronaux d'AMPC qui expliquent cette perte de capacité régénérative (Cai *et al.*, 2001). En effet, dans les populations de neurones qu'ils ont étudiées, ces auteurs ont mesuré des niveaux d'AMPC endogène beaucoup plus élevés dans les neurone jeunes – que la myéline stimule – que dans les neurones plus âgés qui sont, on le sait, inhibés par la myéline. L'inhibition de la PKA, un effecteur en aval de l'AMPC, bloque l'effet stimulateur de la myéline sur les neurone jeunes, alors qu'une

élévation des niveaux d'AMPC, dans les neurones plus âgés, bloque son effet inhibiteur. Enfin, *in vivo*, la plasticité qu'on observe dans les axones des faisceaux de la moelle épinière de rats néonataux est sérieusement compromise lorsqu'on inhibe la PKA (Cai *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent donc que les voies de signalisation en aval de l'AMPC sont nécessaires à l'état régénératif des neurones, et soulignent le potentiel de ces voies comme cibles stratégiques pour stimuler la régénération axonale.

Depuis Cajal – on l'a vu – mais surtout depuis les 20 dernières années, l'étude de la régénération a fait d'énormes progrès. Les travaux récents ont permis d'élucider de nombreux mécanismes cellulaires, et de révéler autant de cibles thérapeutiques potentielles. Plus que jamais, il faut garder à l'esprit que le développement ultime d'une stratégie régénérative efficace demeure tributaire, avant tout, d'une réelle compréhension de l'échec régénératif chez l'adulte. Dans ce contexte, cette thèse envisage, d'une part, le rôle possible d'un nouveau joueur dans la modulation des capacités régénératives du système nerveux central, et évalue, d'autre part, une nouvelle stratégie pour stimuler la régénération axonale.

## 2 PREMIER ARTICLE

« Ellezam, B., Selles-Navarro, I., Manitt, C., Kennedy, T. E., et McKerracher, L. (2001) Expression of Netrin-1 and Its Receptors DCC and UNC-5H2 after Axotomy and during Regeneration of Adult Rat Retinal Ganglion Cells. *Exp Neurol* **168**, 105-115. »

## **Expression of netrin-1 and its receptors DCC and UNC-5H2 after axotomy and during regeneration of adult rat retinal ganglion cells**

Benjamin Ellezam,<sup>1</sup> Inmaculada Selles-Navarro,<sup>1</sup> Colleen Manitt,<sup>2</sup> Timothy E. Kennedy,<sup>2</sup> and Lisa McKerracher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, and* <sup>2</sup>*Centre for Neuronal Survival, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montréal, Québec H3A 2B4, Canada.*

***Abbreviated title: Netrins and axon regeneration in the optic nerve***

*Address correspondence to:*

Dr. Lisa McKerracher

Département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

C.P. 6128, succursale centre-ville

Montréal, QC H3C 3J7

Phone: (514) 343-7776

Fax: (514) 343-5755

Email: [mckerral@ere.umontreal.ca](mailto:mckerral@ere.umontreal.ca)

### **Acknowledgements**

We thank Charles Essagian and Martin Beaudet for excellent technical help. This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (L.M.), and the Medical Research Council (L.M and T.E.K.), and the Paralyzed Veterans of America Spinal Cord Research Foundation (C.M. and T.E.K.). L.M. is a chercheur-boursier investigator of Fonds de la Recherche en Santé du Québec and T.E.K. is a scholar of the Medical Research Council. I.S.N present address: Departamento de Oftalmologia, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, Spain.

## 2.1 ABSTRACT

Netrins are a family of chemotropic factors that guide axon outgrowth during development, however their function in the adult CNS remains to be established. We examined the expression of the netrin receptors DCC and UNC5H2 in adult rat retinal ganglion cells (RGCs) after grafting a peripheral nerve (PN) to the transected optic nerve and following optic nerve transection alone. *In situ* hybridization revealed that both *Dcc* and *Unc5h2* mRNAs are expressed by normal adult RGCs. In addition, netrin-1 was found to be constitutively expressed by RGCs. Quantitative analysis using *in situ* hybridization demonstrated that both *Dcc* and *Unc5h2* were down-regulated by RGCs following axotomy. In the presence of an attached PN graft, *Dcc* and *Unc5h2* were similarly down-regulated in surviving RGCs regardless of their success in regenerating an axon. Northern blot analysis demonstrated expression of *netrin-1* in both optic and sciatic nerve, and western blot analysis revealed the presence of netrin protein in both nerves. Immunohistochemical analysis indicated that netrin protein was closely associated with glial cells in the optic nerve. These results suggest that netrin-1, DCC, and UNC5H2 may contribute to regulating the regenerative capacity of adult RGCs.

**Key words:** netrin, peripheral nerve graft, DCC, Unc5h2, optic nerve, axon guidance, growth inhibitory protein.

## 2.2 INTRODUCTION

During development, an important mechanism for axon pathfinding is chemotropism, and in the last several years, a growing number of chemotropic factors have been identified. Some of these have been shown to be bifunctional molecules, with both chemoattractive and chemorepulsive activity (Mueller, 1999; Wong *et al.*, 1999; David et McKerracher, 2000). Netrins are chemotropic factors with chemoattractant and chemorepellent guidance activities that have been described *in vitro* and *in vivo* (reviewed in Mueller, 1999). A chemoattractive axon guidance function for netrin was first demonstrated for the circumferential projection of developing spinal commissural axons toward the floor plate (Kennedy *et al.*, 1994; Serafini *et al.*, 1994; Serafini *et al.*, 1996). Subsequently, netrins were shown to have chemorepulsive effect on the axons of developing rat trochlear motor neurons that extend circumferentially in a dorsal direction away from the floor plate (Colamarino et Tessier-Lavigne, 1995).

Consistent with netrins acting as bifunctional guidance cues, netrin receptors that mediate attractive or repulsive responses have been identified. DCC (Deleted in Colorectal Cancer) is a receptor or component of a receptor complex that signals a chemoattractive response to netrin (Keino-Masu *et al.*, 1996). Mammalian homologs of the *C. elegans* gene *unc-5* encode receptors or components of a receptor complex that signals a chemorepulsive effect of netrin (Leonardo *et al.*, 1997; Colavita et Culotti, 1998; Hong *et al.*, 1999). However, genetic studies in *C. elegans* have shown that *unc-40* (the ortholog of DCC) is required for ectopic *unc-5* function, suggesting that UNC-5 and DCC functionally collaborate to signal a chemorepulsive response to netrin. (Hedgecock *et al.*,

1990; McIntire *et al.*, 1992; Colavita et Culotti, 1998). Moreover, in growth cone turning assays performed with *Xenopus* spinal neurons, expression of an *unc-5* family member changed netrin-dependent chemoattraction into chemorepulsion. In this case, both the attractant and the repellent response to netrin required DCC function, suggesting that DCC and UNC-5 family members likely co-operate to mediate the chemorepellent response to netrin (Hong *et al.*, 1999). In addition, DCC and the DCC homolog neogenin (Keino-Masu *et al.*, 1996) as well as the mammalian UNC-5 homolog family members, UNC5H1, UNC5H2 (Leonardo *et al.*, 1997) and UNC5H3 (Leonardo *et al.*, 1997; Przyborski *et al.*, 1998), all bind netrin, supporting the conclusion that they function as netrin receptors.

During development, retinal ganglion cell (RGC) axons grow to the optic disc to form the optic nerve. The growth of embryonic RGC axons into the optic nerve is mediated, at least in part, by a DCC dependent response of the RGC axons to netrin-1 expressed at the optic nerve head (Deiner *et al.*, 1997). During retinal development, netrin-1 is expressed by cells in the optic disc while DCC is expressed by RGC axons. Netrin-1 promotes RGC neurite outgrowth in cultured E14 rat retinal explants, and this activity is reduced by blocking DCC function. In netrin-1 and DCC-deficient embryos, RGC axons fail to properly exit the optic disc, resulting in optic nerve hypoplasia (Deiner *et al.*, 1997). In addition, *in vitro* studies utilizing embryonic *Xenopus* RGCs demonstrated that RGCs orient their axons toward a source of netrin-1, and that this effect is blocked by antibodies to DCC (de la Torre *et al.*, 1997).

Netrins continue to be expressed in the adult vertebrate CNS (Kennedy *et al.*, 1994; Livesey et Hunt, 1997; Meyerhardt *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Madison *et al.*,



2000), but their possible role in the neuronal response to injury is unknown. After injury in the adult CNS, axotomized axons reform growth cones that sense the surrounding environment. However, axons do not extend long distances in the adult CNS because of inhibitory cues present in the environment. Peripheral nerve (PN) grafts have been shown to provide a favourable environment for the regrowth of injured CNS axons (David et al., 1981). An autologous segment of peripheral nerve attached to the eye after optic nerve transection allows on average 3% of transected RGC axons to regrow (Vidal-Sanz *et al.*, 1987). However, the molecular components of PN grafts responsible for aiding regeneration are not known, and we do not understand why more RGCs do not regenerate axons into PN grafts. Here we show that netrin-1 is expressed in both adult optic and sciatic nerves. We report that netrin as well as both DCC and UNC5H2 are constitutively expressed in adult RGCs. Furthermore, we demonstrate that both receptors are down-regulated by RGCs following axotomy, and that a similar down-regulation of receptor expression was observed in regenerating RGCs growing into a PN graft.

## 2.3 MATERIALS AND METHODS

### 2.3.1 *Surgery and tissue preparation for histology*

Adult female Sprague-Dawley rats, 180-220 g, were anaesthetised before surgery with intraperitoneal injections of 2.5 mg/kg diazepam, 30 mg/kg ketamine and 0.6 ml/kg hypnorm (0.315 mg/ml fentanyl citrate and 10 mg/ml fluanisone; Janssen, Beerse, Belgium) and the left optic nerve was transected intraorbitally 0.5 mm from the eye (Vidal-Sanz *et al.*, 1987). In 5 animals the axotomized and contralateral eyes were removed 30 d after surgery. In 4 additional animals an autologous PN graft was sutured to

the optic nerve stump immediately after axotomy (Vidal-Sanz *et al.*, 1987). The grafted and contralateral retinas were compared 30 d after inserting the PN graft. To label regrowing RGCs passively, crystals of the retrograde tracer DiI were gently inserted at multiple sites in the mid and distal regions of the graft (McKerracher *et al.*, 1993a) 1 week before the eyes were removed. Animals were sacrificed under deep anaesthesia, perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2. The cornea and lens were removed, and the eye cups were post-fixed for 1-2 hr, washed in PBS (0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, in saline) and soaked in 30% sucrose in PBS overnight. The pairs of experimental and control eyes were frozen together in Tissue Tek O.C.T. (Canlab, Montreal, QC) by immersion in isopentane at -70°C, then wrapped in parafilm and stored at -80°C. Radial or near-radial 12-14 µm cryostat sections (through the region of the optic nerve head), were placed on slides. The netrin-1 deficient mice were bred and genotyped as described previously (Skarnes *et al.*, 1995; Serafini *et al.*, 1996). The eyes were prepared as described above, and embedded in paraffin for sectioning.

### **2.3.2 Immunohistochemistry**

Immunostaining of cryostat sections for DCC immunoreactivity was carried out with 2.5 µg/ml monoclonal anti-DCC antibody (clone G97-4449, PharMingen, Mississauga, ON) followed by a goat anti-mouse IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:250 dilution, Promega, Madison, WI). Blocking and incubations were all with 3% BSA, 2% goat serum and 0.02% Triton X-100 in PBS. Diaminobenzidine (DAB; Sigma, Mississauga, ON) with Ni-Co enhancement was used as a chromogen

(Lehmann *et al.*, 1999). Before the procedure, retinas from PN-grafted animals were examined by fluorescent microscopy to identify the position of DiI-labeled cells and allow their localization under bright field when the immunostaining was complete. Immunostaining for netrin was performed on 16  $\mu\text{m}$  thick transverse and longitudinal cryostat sections of adult rat optic nerve fixed by perfusion with 4% PFA and 15% picric acid in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2. Slides were incubated overnight with an affinity purified rabbit polyclonal netrin antibody raised against a peptide (11760, described in Deiner *et al.*, 1997) corresponding to a sequence conserved in vertebrate netrin-1 sequences, diluted 1:75, followed by a peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Jackson Immunoresearch Lab., West Grove, PA), diluted 1:250. Blocking solution and DAB staining were as described above. Immunostaining of netrin in mouse was performed on 10  $\mu\text{m}$  paraffin sections of retina as described above, with anti-netrin or anti- $\beta$ -galactosidase (1:200, Eppendorf-5 Prime, Boulder, CO) antibodies. Primary antibodies were omitted for control slides in all experiments.

### **2.3.3 In situ hybridization**

<sup>35</sup>S-labeled *Dcc* and *Unc5h2* cRNA anti-sense probes were generated (RNA transcription kit, Stratagene, La Jolla, CA) using cDNAs of 0.8–1 kb obtained from Dr. Marc Tessier-Lavigne (UCSF, San Francisco, CA); control sense probes were also generated for each of the cDNAs. Slides of paired control and experimental retinas were warmed on a slide warmer before use. As for immunohistochemistry, because DiI labeling does not survive the hybridization procedure, sections from PN-grafted retinas with DiI labeling were examined and images collected (Northern Eclipse, Empix

Imaging, Mississauga, ON) or photographed before hybridization. Slides were post-fixed in 4% PFA, acetylated, washed in PBS, and pre-hybridized for 1 hr with 2X SSC, 50% deionized formamide, 10 mM DTT, 250  $\mu\text{g/ml}$  denatured tRNA, 250  $\mu\text{g/ml}$  denatured fish sperm DNA, 1X Denhardt's solution, 5 mM EDTA, pH 8, and 0.2% SDS. Subsequently, slides were hybridized overnight with  $2 \times 10^6$  CPM of labeled probe in pre-hybridization solution with 50% dextran sulfate. Hybridization temperature was 53°C and 45°C for *Dcc* and *Unc5h2* probes respectively. After hybridization, slides were washed sequentially at 65°C in 4X SSC, 1 mM DTT for 2X 10 min, then 4X SSC, 2X 10 min. Single-stranded RNA was digested with Rnase A (50  $\mu\text{g/ml}$  RNase A, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris, and 0.1 mM EDTA) at 37°C for 30 min. Final washes were with SSC, gradually increasing the stringency to a final wash of 0.1X SSC for 30 min at 65°C. Slides were air-dried and dipped in Kodak NTB2 autoradiographic emulsion diluted 1:1 with water and stored in a light-tight box. Exposure times varied from 4 to 10 days. Slides were developed for 5 min in Kodak D19 mixed 1:1 with water at 20°C, rinsed, and fixed for 5 min in Kodak fixative. Sections were stained with 0.25% thionin, dehydrated, and mounted with a Tissue-Tek automated coverslipper (Sakura Finetek, Torrance, CA).

#### **2.3.4 Quantitative analysis**

After *in situ* hybridization, the autoradiographic silver grain density over RGCs was measured with the Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON). Images of treated and intact retinas were taken with a 100X Zeiss Plan Neofluar objective and digitalized for analysis. To restrict our quantification to RGCs, cells smaller than 70  $\mu\text{m}^2$ , which would include all displaced amacrine cells (Perry, 1981) as well as some

superficially cut RGCs, were excluded from the analysis. For each slide, the average grain density over experimental and control RGCs was counted, then the average value for control RGCs was transformed to 100 grains/ $\mu\text{m}^2$ , and the grain density value for each RGC on the slide was normalized to this control value. For each treatment, the difference in grain density between experimental and control RGCs was calculated using data collected from 16-32 slides taken from the retinas of 3-5 different animals. All experiments for a given treatment or probe were repeated 3-5 times. Data were collected in Excel (Microsoft, Redmond, WA) and statistical significances were determined using the Student *t* test in Sigma Stat (Jandel, Corte Madera, CA).

### **2.3.5 Western blot analysis**

Pooled sciatic and optic nerves (3 for each experiment) were homogenized for 1 min in gel sample buffer (25  $\mu\text{l}/\text{mg}$  of nerve; 0.0625 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% glycerol) using a Polytron or a Teflon-in-glass homogenizer, respectively. Injured optic nerve samples were prepared with the nerve segment distal to axotomy collected 2 d after injury. Post-natal day 3 (P3) rat brain homogenate was prepared in gel sample buffer using a Teflon-in-glass homogenizer. Homogenates were boiled for 5 min and clarified by centrifugation. Supernatants were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, blocked with 5% skimmed milk in TBS/Tween-20 (0.050 M Tris-HCl pH 7.4, 0.150 M NaCl, 0.1% Tween-20), and incubated overnight with netrin antibody 11760 (see immunohistochemistry), diluted 1:150, followed by a peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Jackson Immunoresearch Lab., West

Grove, PA), diluted 1:5000. The first antibody was omitted for experimental controls. Blots were analyzed using a chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL).

### **2.3.6 Northern blot analysis**

Optic nerves and sciatic nerves from 20 animals were pooled, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Each pool of tissue was homogenized in  $10\ \mu\text{l}/\text{mg}$  Trizol reagent (Gibco BRL, Burlington, ON) using a Polytron, and total RNA was purified. Poly (A)<sup>+</sup> RNA was isolated using an mRNA extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON). 1-2  $\mu\text{g}$  of poly (A)<sup>+</sup> RNA per sample was electrophoresed on an agarose-formaldehyde gel, transferred to a nylon membrane (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC). The blot was hybridized with approximately  $10^6$  cpm/ml  $^{32}\text{P}$ -labeled rat netrin-1 cDNA (462 bp) in hybridization buffer (50% formamide, 10% Dextran Sulfate, 1% SDS, 1 M NaCl, and 100  $\mu\text{l}$  salmon sperm DNA (100 mg/ $\mu\text{l}$ )) for 12 hr at  $42^{\circ}\text{C}$ , was washed to a stringency of 0.2X saline-sodium citrate (SSC), 0.1% SDS at  $55^{\circ}\text{C}$  for 45 min and exposed on a Phosphor screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) for 24 hr.

## **2.4 RESULTS**

### **2.4.1 Netrin and netrin receptor expression in the adult retina**

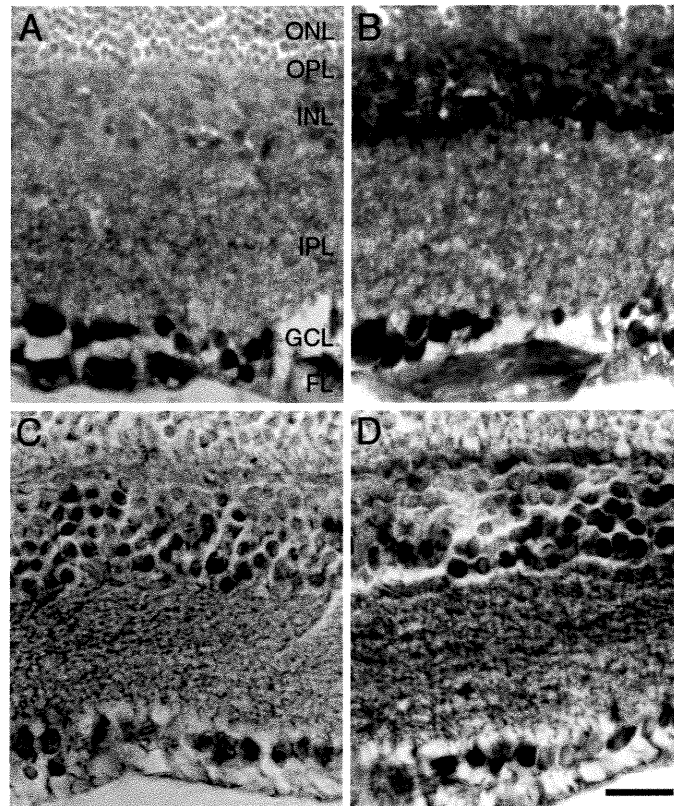
To examine the expression of netrin and its receptors in adult rat RGCs, we used both immunohistochemical and *in situ* hybridization analyses. Immunohistochemical analysis of retinal sections using an antibody against DCC we detected DCC protein in

the RGC fibre layer, in RGC cell bodies and displaced amacrine cells, in cells of the inner nuclear layer (INL), and diffuse immunostaining in the plexiform layers (Fig. 1A).

Immunostaining with an antibody against netrin revealed positive staining in the ganglion cell layer and in the INL, particularly in the innermost part, where amacrine cell bodies are found (Fig. 1B). Diffuse immunoreactivity was also observed in the plexiform layers. In retinal sections of an adult mouse heterozygous for a mutation in which the endogenous netrin-1 promoter drives expression of a netrin/ $\beta$ -galactosidase fusion protein, immunostaining with either anti-netrin (Fig. 1C) or anti- $\beta$ -galactosidase (Fig. 1D) antibodies revealed an expression pattern similar to that observed in adult rat. These results indicate that netrin and DCC expression is conserved in the adult retina and show that RGCs express both ligand and receptor. Antibodies to netrin receptors of the UNC-5 family are not available. To examine UNC5H2 and DCC expression, we examined *Dcc* and *Unc5h2* mRNAs in adult rat retina by *in situ* hybridization. Retinal ganglion cells were positive for both *Dcc* and *Unc5h2* mRNAs (Figs. 2A, 2B, 2E, 2F), showing that both types of netrin receptors are constitutively expressed in the adult retina.

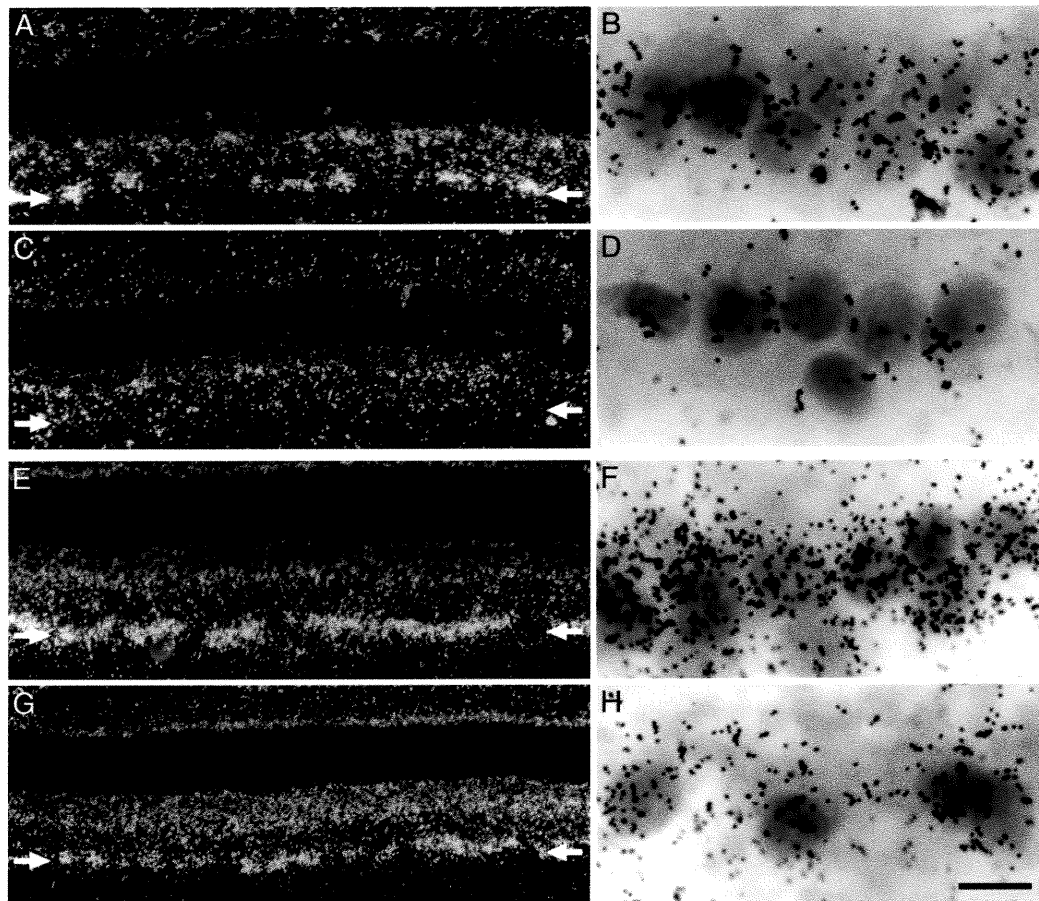
#### **2.4.2 Netrin receptors are down-regulated in RGCs after axotomy**

Before studying the expression of netrin receptors in axotomized RGCs that regenerate in PN grafts, we first examined how the expression of *Dcc* and *Unc5h2* in RGCs was affected by optic nerve transection alone. Thus, we performed *in situ* hybridization on axotomized and control retinas using *Dcc* and *Unc5h2* riboprobes. Dark field microscopy was used to view silver grains at low magnification. A clear reduction in signal intensity in the axotomized retina was observed compared to controls for both *Dcc*



*Figure 1.* Immunohistochemistry revealed immunoreactivity for both netrin and DCC in RGCs in adult rat retina. (A) DCC immunoreactivity in the ganglion cell layer (GCL) and in RGC axons (FL). (B) Netrin immunoreactivity in the GCL. (C, D) Radial sections of adult mouse retina. (C) Detection of netrin using the anti-netrin antibody. (D) Netrin localization in the netrin-1 +/- mouse detected with a  $\beta$ -galactosidase immunoreaction. FL, fibre layer; GCL, retinal ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; PR, photoreceptors; RPE, retinal pigment epithelium. Scale bar, (A, B), 30  $\mu$ m; (C, D), 20  $\mu$ m.





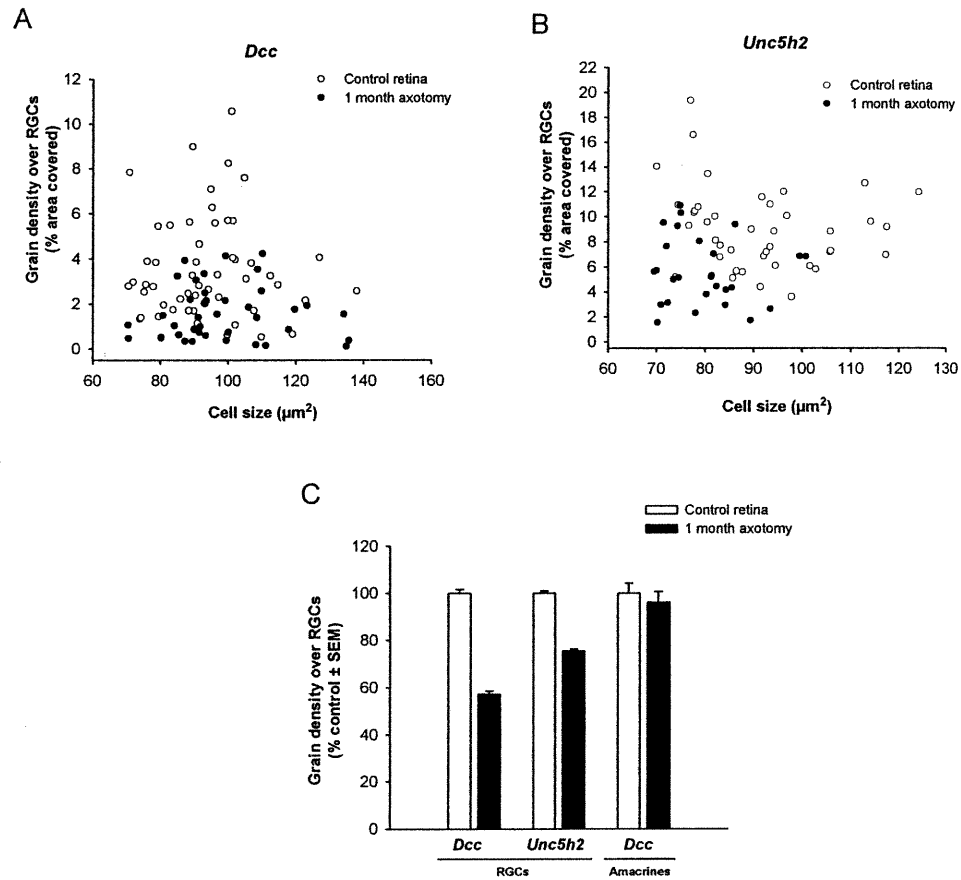
*Figure 2.* In situ hybridization showing *Dcc* and *Unc5h2* mRNA expression revealed by in situ hybridization. (A, B) Control uninjured or (C, D) 30 d axotomized adult rat retina showing *Dcc* mRNA expression. (E, F) Uninjured and (G, H) axotomized retinas showing *Unc5h2* mRNA expression. (Left column) Low-magnification dark field micrographs of horizontal sections through the retina. Arrows indicate the ganglion cell layer. (Right column) High-magnification bright field micrographs of the ganglion cell layer showing a decrease in autoradiographic grain density over single RGCs after axotomy. Scale bar, (left column), 80  $\mu\text{m}$ ; (right column), 10  $\mu\text{m}$ .

(Figs. 2A and 2C) and *Unc5h2* (Figs. 2E and 2G). In bright field at high magnification, the number of autoradiographic grains was reduced over single RGC cell bodies viewed by thionin staining, for both *Dcc* (Figs. 2B and 2D) and *Unc5h2* (Figs. 2F and 2H). These results indicate that the reduction of grain intensity in the RGC layer was not attributable solely to cell death caused by axotomy, but that the mRNA levels in surviving RGCs were reduced.

To quantify the reduction of *Dcc* and *Unc5h2* expression in RGCs after axotomy, the density of autoradiographic grains over RGCs from axotomized retinas was compared to contralateral control retinas mounted on the same slide. For each slide, the grain density over single RGCs was plotted on a scattergram (Figs. 3A,B), and then an average change in grain density after each treatment was calculated. Thirty days after axotomy, the reductions in mRNA expression averaged 44% for *Dcc* and 26% for *Unc5h2* (Fig. 3C). To verify that the decrease in mRNA level was specific to axotomized RGCs, we also examined *Dcc* in displaced amacrine cells. Displaced amacrine cells do not send an axon into the optic nerve and have a surface area under  $70 \mu\text{m}^2$ , which we used as a size threshold to include all amacrine cells and exclude most RGCs. After axotomy, no significant change in *Dcc* mRNA expression was observed in this cell population (Fig. 3C) supporting the reliability of our quantification techniques.

### **2.4.3 Netrin receptors in regenerating RGCs**

In rats that have received a PN graft after optic nerve transection, 1 month after the operation we examined if regenerating and non-regenerating surviving RGCs regulate netrin receptor expression differently. For these experiments, regenerating RGCs were



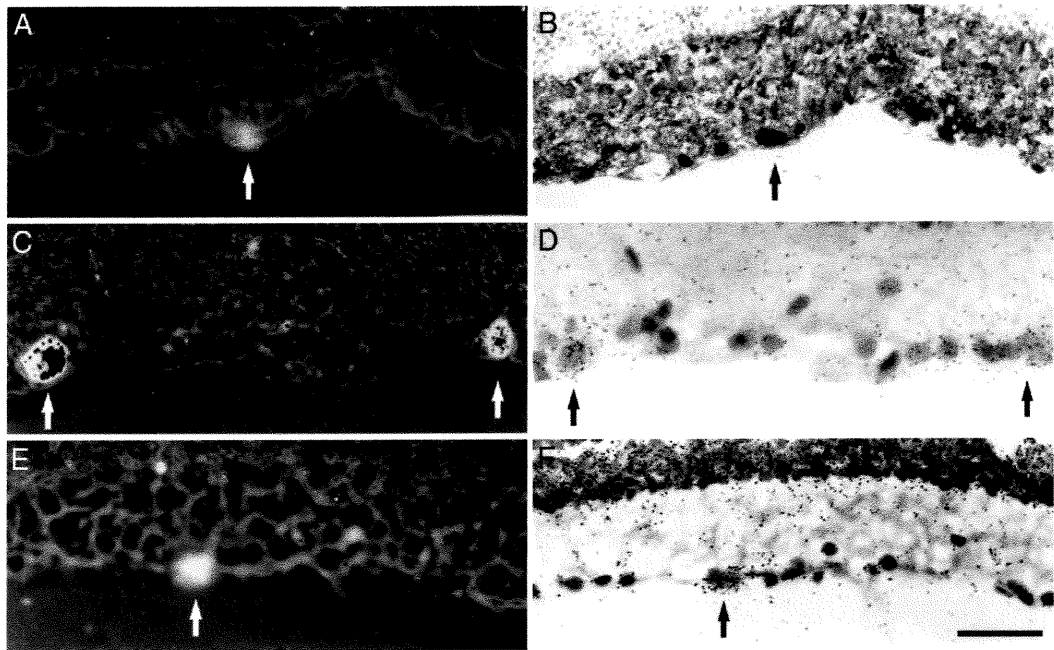
**Figure 3.** *Dcc* and *Unc5h2* mRNA expression is down-regulated in axotomized RGCs. Scattergrams of raw data from representative slides probed for (A) *Dcc* or (B) *Unc5h2* mRNAs, with each point representing an individual cell. (C) Average grain densities over RGCs in control and axotomized retinas showed a significant change after axotomy. The smaller cells ( $<70 \mu\text{m}^2$ ) mostly amacrine cells, showed no significant difference in *Dcc* mRNA expression.

identified by retrograde transport of Dil placed in the PN graft. The same RGCs were then examined by immunohistochemistry or *in situ* hybridization. We detected DCC protein in regenerating RGCs by immunohistochemistry (Figs. 4A and B) showing that regenerating RGCs continue to express DCC. By *in situ* hybridization, we detected expression of both *Dcc* (Figs. 4C and D) and *Unc5h2* (Figs. 4E and F) mRNAs, indicating that regenerating RGCs express both DCC and UNC5H2 receptors.

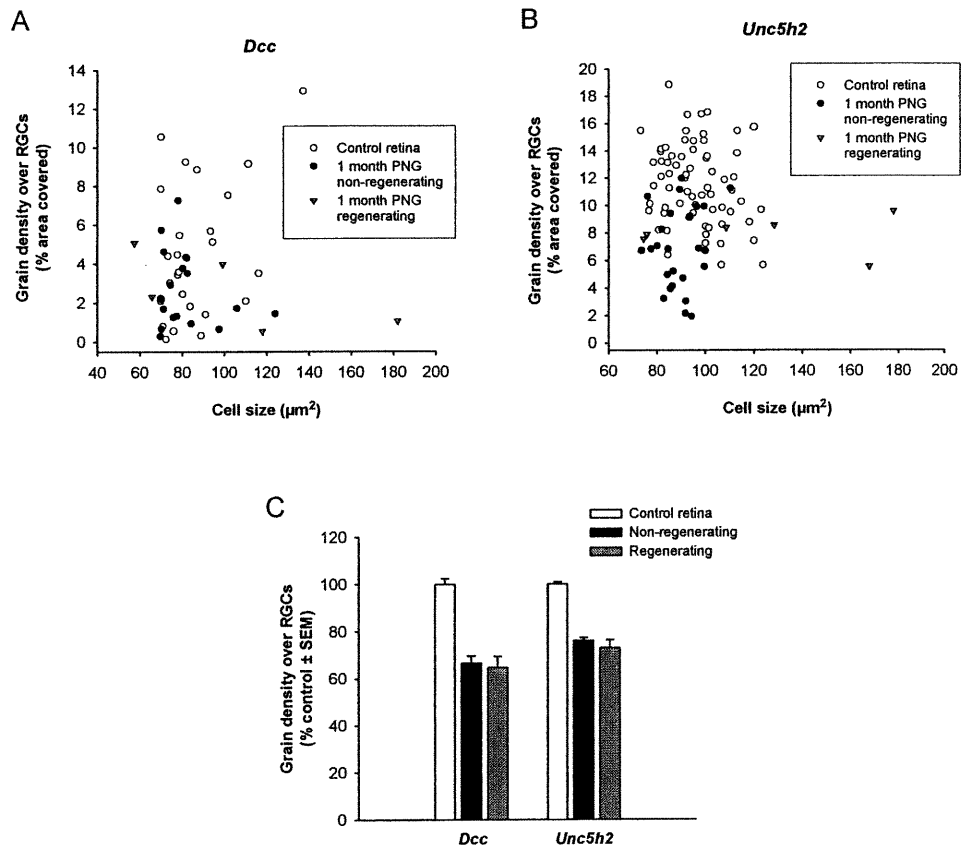
We examined quantitative changes in *Dcc* and *Unc5h2* mRNA levels in both regenerating and non-regenerating RGCs in grafted retinas. For each slide, the silver grain density over each RGC in the control and operated retinas was plotted on a scattergram (Figs. 5A and B) and average grain densities normalized against contralateral controls were calculated for both regenerating and non-regenerating RGCs. Thirty days after PN grafting, the level of *Dcc* expression was reduced by 37% in regenerating RGCs and 36% in non-regenerating RGCs (Fig. 5C). For *Unc5h2* the observed reduction in regenerating and non-regenerating RGCs was 32% and 27%, respectively (Fig. 5C). These results show that after PN grafting, as with optic nerve transection alone, netrin receptors are down-regulated in RGCs and that this down-regulation does not significantly differ in regenerating and non-regenerating RGCs of PN-grafted retinas. In positive control experiments with the same grafted retinas,  $\text{T}\alpha\text{1}$  tubulin mRNA was up-regulated (not shown) as we have previously reported (Fournier et McKerracher, 1997).

#### **2.4.4 Netrins are expressed in adult optic and sciatic nerve**

To better understand the significance of the changes in netrin receptor expression in injured and regenerating RGCs, we next examined netrin expression in optic and



*Figure 4.* DCC protein and Dcc and Unc5h2 mRNAs after attachment of a PN graft to the transected optic nerve. (Left panel) Radial sections were visualized by fluorescence microscopy to identify RGCs retrogradely labeled with Dil (white arrows). The black profiles in RGCs in (C) represent saturated fluorescent light detected by the videomicroscope. (Right panel) The same sections as those shown on the left, with regenerating RGCs (black arrows) after immunostaining for (B) DCC or in situ hybridization for (D) Dcc or (F) Unc5h2. Scale bar, (A, B, E, F), 50  $\mu\text{m}$ ; (C, D), 35  $\mu\text{m}$ .



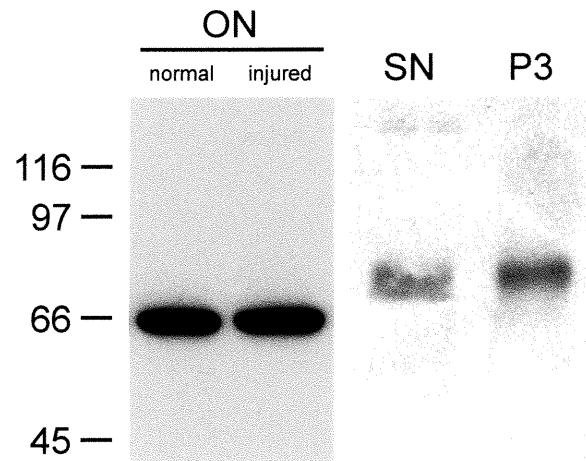
**Figure 5.** *Dcc* and *Unc5h2* mRNA expression is down-regulated in both regenerating and non-regenerating attaching a PN graft to the transected optic nerve. Scattergrams of raw data from representative slides probed with (A) *Dcc* or (B) *Unc5h2* riboprobes. (C) Average grain densities over RGCs in control and grafted retinas. No significant difference in *Dcc* and *Unc5h2* mRNA expression was observed between regenerating and non-regenerating RGCs in grafted retinas.

sciatic nerve. We performed western blot analysis on protein extracts from intact adult rat optic nerves, and from the distal stumps of axotomized optic nerves collected 2 d after injury, the time at which axotomized axons that have retracted attempt to regrow past the lesion site (Selles-Navarro *et al.*, 2001). In protein samples from a post-natal day 3 (P3) rat brain used as control the pan-netrin antibody recognized a single prominent band at ~75 kDa (Fig. 6). In both normal and injured optic nerve samples a prominent band with slightly greater mobility was detected. This may be due to differential glycosylation or partial proteolysis of netrin protein in adult optic nerve compared to that expressed during development. Sciatic nerve was used for the PN grafts, and we also detected a major immunoreactive band in adult sciatic nerve samples (Fig. 6).

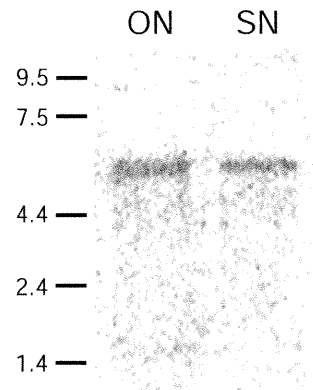
#### **2.4.5 *Netrin-1* mRNA is expressed by glial cells in adult optic and sciatic nerve**

Netrin proteins detected in whole nerve homogenates could originate either from non-neuronal cells, or from neuronal expression and transport of netrin into axons in the optic nerve. To determine if non-neuronal cells in optic nerve and sciatic nerve cells express netrin-1, we prepared northern blots with mRNA extracted from intact sciatic and optic nerves. The *netrin-1* cDNA probe recognized a band at ~6 kb, characteristic of *netrin-1* (Serafini *et al.*, 1996), in both nerve mRNA samples (Fig. 7) showing that *netrin-1* is expressed by non-neuronal cells in both sciatic and optic nerves.

To examine the distribution of netrin protein expression in adult optic nerve, we performed immunohistochemistry on transverse and longitudinal cryostat sections. Netrin immunostaining was detected in cells with a stellate morphology in transverse sections of nerve (Fig. 8A). In longitudinal sections, staining was observed on round cell bodies



*Figure 6.* Western blot showing expression of netrin in homegenates of normal and injured optic nerve (ON), normal sciatic nerve (SN) and P3 rat brain. The detection of bands of different mobilities by the anti-netrin antibody may be due to differential glycosylation. Molecular weight markers in kDa are on the left



*Figure 7.* Non-neuronal cells in adult optic and sciatic nerves express netrin-1 mRNA. Northern blot showing detection of a 6 kb RNA band. A netrin-1 cDNA was used to probe adult optic and sciatic nerve poly (A)+ RNA extracts. ON, optic nerve; SN, sciatic nerve.



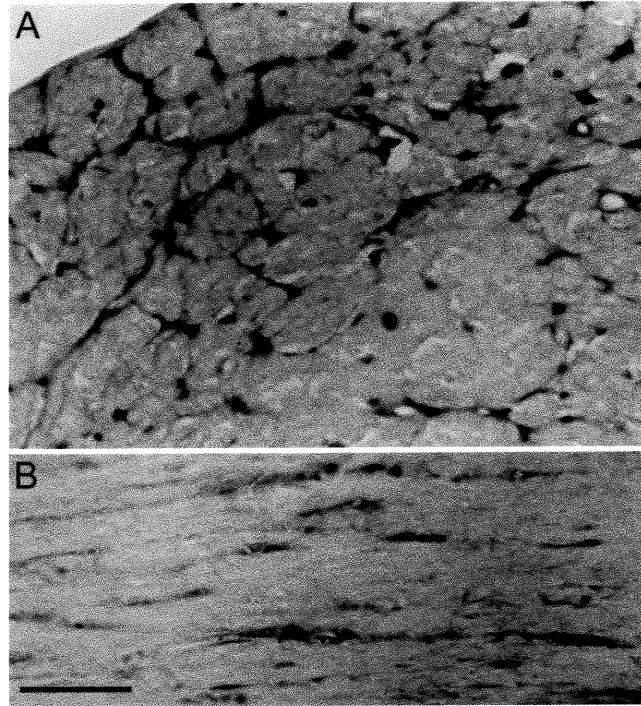
aligned along the longitudinal axis (Fig. 8B), consistent with expression of netrin-1 by glial cells in the optic nerve.

## 2.5 DISCUSSION

Here we show that netrin and its receptors DCC and UNC5H2, are constitutively expressed in the adult rat visual system. In the retina, immunohistochemistry as well as *in situ* hybridization has allowed us to detect constitutive DCC and UNC5H2 expression in RGCs and also in displaced amacrine cells of the ganglion cell layer and in cells of the INL. Interestingly, in both mouse and rat RGCs and INL cells, most likely the amacrine cells, we have also detected expression of netrin. These data add to the emerging pattern of ligand-receptor co-expression in RGCs that has been observed for other axonal guidance molecules, such as ephrinA-EphA (Hornberger *et al.*, 1999), BDNF-trkB (Cohen-Cory et Fraser, 1994), and slit2-robo (Niclou *et al.*, 2000).

Here we show by northern analysis that *netrin-1* is expressed in adult optic nerve glia, and the presence of the protein was confirmed by both western blot and immunohistochemistry. Recent studies in spinal cord (Manitt and Kennedy, in preparation) also indicate that mature oligodendroglia express netrin. Moreover, we have confirmed by northern analysis earlier reports suggesting that adult sciatic nerve glia express *netrin-1* (Madison *et al.*, 2000). Netrin expression has previously been detected by northern blot analysis in both neural and non-neural adult tissues (Kennedy *et al.*, 1994; Livesey et Hunt, 1997; Meyerhardt *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999).

In a search for a possible role of netrin in promoting adult RGC regeneration, we have examined netrin receptor expression in adult rats after optic nerve injury and during



*Figure 8.* Netrin immunoreactivity in adult optic nerve is localized to glial cells. (A) Transverse section of optic nerve showing immunoreactive cells. (B) Longitudinal section of optic nerve showing immunoreactive cell bodies aligned along the longitudinal axis. Scale bar, (A), 50  $\mu\text{m}$ ; (B), 63  $\mu\text{m}$ .

regeneration in PN grafts. Indeed, certain molecules important for neuronal development such as GAP-43 (Jacobson *et al.*, 1986), neurolin (Paschke *et al.*, 1992), extra-cellular matrix proteins fibronectin (Lefcort *et al.*, 1992) and tenascin (Mackie *et al.*, 1988), and transcription factors such as c-JUN (Herdegen *et al.*, 1993) are down-regulated after axons have developed, but are re-expressed during regeneration. We examined how mRNA levels of netrin receptors DCC and UNC5H2 are regulated during regeneration following injury or after injury alone. One month after axotomy, surviving RGCs had lower levels of *Dcc* and *Unc5h2* mRNA than contralateral uninjured controls. Axotomy-induced down-regulation has already been observed for other proteins such as neurofilaments (McKerracher *et al.*, 1993b), tubulin (McKerracher *et al.*, 1993b; Fournier et McKerracher, 1997), L1 (Jung *et al.*, 1997) and Bcl-2 (Isenmann et Bahr, 1997). However, RGC axotomy does not lead to widespread non-specific down-regulation of gene expression. Other genes, such as c-JUN (Isenmann et Bahr, 1997), GAP-43 (Tetzlaff *et al.*, 1991; Wouters *et al.*, 1998), Bax (Isenmann *et al.*, 1997), neuropeptides (Palkovits, 1995) and the recently identified metallopeptidase DINE (Kiryu-Seo *et al.*, 2000) are up-regulated after axon injury. Our results indicate that *Dcc* and *Unc5h2* can be added to the list of genes that are down-regulated in injured RGCs.

One month after axotomy, only 5% of RGCs survive, but if a PN graft is attached to the transected optic nerve, the RGC survival rate increases to 25% (Villegas-Perez *et al.*, 1988). In grafted rats, approximately one-fifth of the surviving RGCs regenerate an axon along the graft (Vidal-Sanz *et al.*, 1987). We observed a decrease in netrin receptor expression in both regenerating and non-regenerating RGCs that survive at 1 month. Typically, proteins associated with axon regeneration such as L1 (Zhang *et al.*, 1995),

GAP-43 (Wouters *et al.*, 1998) and tubulins (Fournier et McKerracher, 1997) are specifically up-regulated in those neurons that successfully regrow their axons in a PN graft. Since netrin-1 expression at the optic nerve head has been shown to be essential for the axons of developing RGCs to exit the retina and enter the optic nerve, and that this function of netrin is dependent on expression of DCC by RGCs (Deiner *et al.*, 1997), we expected that *Dcc* mRNA would be up-regulated in regenerating RGCs. In an environment rich in netrin, increasing DCC levels in injured RGCs may indeed promote regeneration. We failed to observe such an up-regulation, a result suggesting that netrin may not contribute to RGC axon regeneration induced by a PN graft.

Although there is netrin receptor regulation at the mRNA level, it is unclear how it reflects receptor expression on the reformed growth cones of injured RGC axons. In a recent developmental study, DCC was detected in developing RGC axons of mouse embryos, but became undetectable in the distal axonal segments of RGCs of post-natal animals, even though the cell bodies and proximal axons of the fibre layer were still immunopositive for DCC (Gad *et al.*, 2000). Thus, the biological effect of netrin on regeneration within the optic nerve will necessarily be dependent on receptor expression at the growth cone. Moreover, the potential contribution and level of expression of other netrin receptors, such as neogenin, known to be expressed in embryonic RGCs will also need to be considered.

The effect of netrin can also be modulated by endogenous levels of cAMP. When intracellular cAMP levels were reduced in *Xenopus* growth cones *in vitro*, attraction to netrin was switched to repulsion (Ming *et al.*, 1997). Recently, experiments in adult rat retina showed that cAMP levels decrease in RGCs following optic nerve transection

(Shen *et al.*, 1999), raising the possibility that injured RGCs could interpret netrin as a repulsive cue. Moreover, although some axonal growth in adult optic nerve has been made possible experimentally (Berry *et al.*, 1996; Lehmann *et al.*, 1999; Leon *et al.*, 2000), the netrin-rich adult optic nerve is not considered a growth-permissive environment (Campbell *et al.*, 1999). Within the retina, axonal branches formed by RGCs after axotomy initially grow toward the optic nerve head, but are deflected and make a hair-pin turns just before crossing it (Sawai *et al.*, 1996). And we also demonstrate that adult RGCs express both DCC and UNC5H2, which, *in vitro*, have been shown to collaborate in mediating chemorepulsion to netrin (Hong *et al.*, 1999). It appears then, that netrin, present in optic nerve, is found in an environment that is inhibitory for adult RGC regrowth, and that injured adult RGCs exhibit molecular characteristics that have been associated with chemorepulsion *in vitro*. Therefore, it is possible that netrin could contribute to inhibiting the regeneration of RGC axons in the optic nerve. However, the axonal response to netrin of adult neurons depends on a combination of factors that include netrin receptor expression, cAMP levels, as well as the presence or absence of laminin (see below) and other molecules that modulate responses to netrin.

Netrin is also expressed in sciatic nerve, which is a favourable environment for adult RGC regeneration. We do not know if the netrin expressed in the PN grafts used to promote regeneration of RGC axons would help or hinder their regeneration into the graft. Axons integrate signals from multiple environmental cues, and peripheral nerve grafts contain many different growth-promoting molecules, such as laminin. Laminin-1 has such strong growth promoting properties that it can override growth inhibition by the diverse growth inhibitory proteins present in myelin (David *et al.*, 1995). Yet, in recent

experiments with retinal neurons placed in tissue culture laminin-1 converted netrin-mediated attraction into repulsion (Hopker *et al.*, 1999). Therefore, the down-regulation of netrin receptors during the regeneration of RGCs into the laminin-rich environment of a PN graft might actually aid regeneration. However, further studies will be needed to test whether netrin does have an effect on injured adult RGCs, whether it is promoting or inhibiting their regeneration, and whether this is affected by the different extra-cellular components of the CNS and the PNS.

### 3 DEUXIÈME ARTICLE

« Selles-Navarro, I., Ellezam, B., Fajardo, R., Latour, M., et McKerracher, L. (2001) Retinal Ganglion Cell and Nonneuronal Cell Responses to a Microcrush Lesion of Adult Rat Optic Nerve. *Exp Neurol* **167**, 282-289. »

## **Retinal ganglion cell and non-neuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve.**

Inmaculada Sellés-Navarro,\*† Benjamin Ellezam,\*‡ Raul Fajardo,‡ Mathieu Latour,‡ and Lisa McKerracher‡

†*Laboratorio de Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Spain, and* ‡*Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal QC H3C 3J7, Canada*

\* I.S.-N. and B.E. have contributed equally

***Abbreviated Title : Microcrush lesion of optic nerve***

*Address correspondence to:*

Dr. Lisa McKerracher  
Département de pathologie et biologie cellulaire  
Université de Montréal  
C.P. 6128, succursale centre-ville  
Montréal, QC H3C 3J7  
Phone: (514) 343-7776  
Fax: (514) 343-5755  
Email: mckerral@ere.umontreal.ca

### **Acknowledgements**

We acknowledge support from MRC (Canada) and NSERC. We thank Charles Essagian for excellent technical assistance and Marcelino Alvez-Trigueros for help with computer graphics.



### 3.1 ABSTRACT

Injury of the optic nerve has served as an important model for the study of cell death and axon regeneration in the CNS. Analysis of axon sprouting and regeneration after injury by anatomical tracing are aided by lesion models that produce a well-defined injury site. We report here the characterization of a microcrush lesion of the optic nerve made with 10.0 sutures to completely transect RGC axons. Following microcrush lesion, 62% of RGCs remained alive one week later, and 28% of RGCs at two weeks. Optic nerve sections stained by hematoxylin-based methods showed a thin line of intensely stained cells that invaded the lesion site at 24 hr after microcrush lesion. The lesion site became increasingly disorganized by 2 weeks after injury, and both macrophages and blood vessels invaded the lesion site. The microcrush lesion was immunoreactive for chondroitin sulfate proteoglycans (CSPG), and an adjacent GFAP-negative zone developed early after the lesion, disappearing by one week. Luxol fast blue staining showed a myelin-free zone at the lesion site, and myelin remained distal to the lesion at 8 weeks. To study the axonal response to microcrush lesion, anterograde tracing was used. Within 6 hr after injury all RGC axons retracted back from the site of lesion. By one week after injury, axons regrew toward the lesion, but most stopped abruptly at the injury scar. The few axons that were able to cross the injury site did not extend further in the optic nerve white matter by 8 weeks post-lesion. Our observations suggest that both the CSPG positive scar and myelin-derived growth inhibitory proteins contribute to the failure of RGC regeneration after injury.

**Key words:** retinal ganglion cell, axotomy, myelin, chondroitin sulfate proteoglycans, cell death.

## 3.2 INTRODUCTION

Injury in the CNS causes permanent impairment because injured neurons do not regenerate their transected axons. Following injury in the CNS there are a number of changes in non-neuronal cells, including the formation of a glial scar by astrocytes and invasion of macrophages and microglia (Fawcett, 1999). Many different growth inhibitory proteins present in the CNS block axon growth. Both tenascin and chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) are expressed following injury to the CNS (Giftchristos et David, 1988; McKeon *et al.*, 1991; McKeon et Silver, 1995; Levine, 1998). Myelin-derived growth inhibitory proteins that remain distal to the injury are also important barriers to axon regeneration (McKerracher *et al.*, 1994; Mukhopadhyay *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000; Prinjha *et al.*, 2000). The relative contributions of myelin and the glial scar to blocking regeneration is controversial (Davies *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1999). Nonetheless, many *in vivo* studies clearly indicate that both myelin proteins and glial scar proteoglycans contribute to regeneration failure in adult mammals (Keirstead *et al.*, 1992; Schwab *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1999).

The extent of necrosis at the site of lesion is affected by both ischemia and the inflammatory response following trauma. The type of injury or lesion can greatly affect the amount of secondary damage that follows axonal transection in the CNS. Anatomical studies of axon regeneration are aided by lesion models that reduce necrosis and cavitation so that the distances of axonal growth can be accurately followed. Recently, it was shown that the glial scar is greatly reduced by the formation of a small focal lesion at the site of neuronal microtransplantation (Davies *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1999).

Transplanted neurons extended axons across the lesion site into the distal white matter when scar-associated proteoglycan immunoreactivity was reduced. In animals with greater proteoglycan expression at the scar, axons were not able to cross the lesion (Davies *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1999).

The optic nerve has served as an important model for the study of the non-neuronal response to injury, and to study axon regeneration in the CNS (Vidal-Sanz *et al.*, 1987; Villegas-Perez *et al.*, 1988; Berry *et al.*, 1996; Fournier et McKerracher, 1997). Complete transection of the optic nerve results in ischemia and necrosis, and a large region of cavitation extends towards the optic nerve head (Graftstein et Ingoglia, 1982; Giftochristos et David, 1988). Crush lesions cause less damage, and cell survival is better compared to transection injury (Berkelaar *et al.*, 1994). However, after optic nerve crush, an area of cavitation develops in the central optic nerve that extends towards the optic nerve head (Berkelaar *et al.*, 1994). The lack of a clear and defined injury site and the variable extent of retrograde axon degeneration after crush lesion obscure the ability to assess axon regeneration after injury. Here we report studies on a microcrush lesion of the optic nerve, which creates a well-defined injury site. We show that within 24 hr after injury all RGC axons retract back from the site of lesion. By one week, axons sprout back to stop abruptly at the injury scar. We further document the morphological changes in the scar from 6 hr to 8 weeks after lesion, and show that most axons that are able to cross the scar do not extend for long distances in the white matter of the optic nerve.

### 3.3 METHODS

#### **3.3.1 Surgical Procedures and RGC survival studies**

Female Sprague-Dawley rats weighing 180-200 g were anesthetized with intraperitoneal injections of 0.6 ml/kg hypnorm, 2.5 mg/kg diazepam and 35 mg/kg ketamine. The left optic nerve was exposed through a superior temporal approach, and the dural sheath was slit longitudinally, taking care to avoid the ophthalmic artery. Microcrush lesions were made with 10.0 sutures used to completely constrict the optic nerve by holding a tight knot for 60 seconds, then releasing the suture. The skin was closed with 4.0 silk sutures and the fundis oculi was examined to verify the integrity of the retinal blood circulation. Animals whose retinas showed ischemic damage were discarded. Animals were studied by anterograde labeling 6 hr (n=3), 24 hr (n=4), 1 week (n= 3), 2 weeks (n=6), and 8 weeks (n=2) after microcrush lesion. Additional animals without anterograde labeling were examined by histological and immunostaining methods at 1 week (n=2), 2 weeks (n=5) and 8 weeks (n=3).

To study RGC survival after the microcrush lesion, the RGCs were examined 1 week (n= 5 animals) and 2 weeks (n= 4 animals) after lesion, and the right eye was used for controls. RGCs were retrogradely labeled by applying 2% FluoroGold (Fluorochrome, Englewood, CO) in 10% dimethylsulfoxide, 0.9% NaCl bilaterally to the superior colliculi and dorsal lateral geniculate nuclei after removing the overlying pia (Vidal-Sanz *et al.*, 1988; Villegas-Perez *et al.*, 1993). Animals were fixed by perfusion with 4% paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer, the retinas of both eyes were removed and prepared as flattened whole mounts to examine by epifluorescence. The mean densities of

Fluorogold-labeled RGCs were estimated as described (Villegas-Perez *et al.*, 1993; Selles-Navarro *et al.*, 1996). Briefly, RGCs were counted on 12 standard areas (0.45 X 0.35 mm each) located beside the optic nerve head, and at 1.35 and 2.7 mm from the optic disc in each of the retinal quadrants. In another group of animals (n=3) the RGCs were retrogradely labeled from the superior colliculus with Fluorogold immediately after the microcrush lesion to verify the completeness of the lesion. In this case, the Fluorogold does not pass the lesion site to label the retina when axons are transected.

### **3.3.2 Anterograde labeling**

To identify RGC axons in the optic nerve by anterograde labeling, 5  $\mu$ l 1% cholera toxin  $\beta$  subunit (CTB) (List Biological Labs, Campbell, CA) was injected into the vitreous with a Hamilton syringe. Animals were fixed by perfusion with 4% paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer, 4 hr after CTB injection in the eye. The eyes with attached optic nerves were removed, post-fixed in 4% paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer, and cryoprotected in 30% sucrose overnight. Longitudinal cryostat sections of retina with attached optic nerve were mounted on gelatin-coated slides and stored at 4°C before use.

To detect CTB in RGC axons, slides were blocked with 5% normal rabbit serum, 0.2% Triton X 100. They were incubated overnight with goat anti-cholera toxin antibody (1:5,000 List Biological Labs, Campbell, CA), washed, and incubated with biotinylated rabbit anti-goat antibody (1:200, Vector Lab, Burlingame, CA), followed by DTAF-conjugated streptavidin (1:500, Jackson Immunoresearch Labs, West Grove, PA). In

some experiments a horseradish peroxidase (HRP)-linked second antibody and enzymatic color reaction was used to detect CTB (Lehmann *et al.*, 1999).

### **3.3.3 Histological and immunostaining procedures**

Fixed optic nerves were embedded in paraffin and cut in longitudinal sections at 4 to 6  $\mu\text{m}$ . The lesion site was followed by staining sections with two different hematoxylin-containing stains: hematoxylin/phloxine B/safran (HPS) stain (Luna, 1992) or Masson's trichrome (Thompson, 1966). Additional sections were stained using the Luxol fast blue method to reveal myelin (Luna, 1992). All slides were mounted using an automatic system and coverslipping film (TissueTek, Somagen Diagnostics, Edmonton, AB).

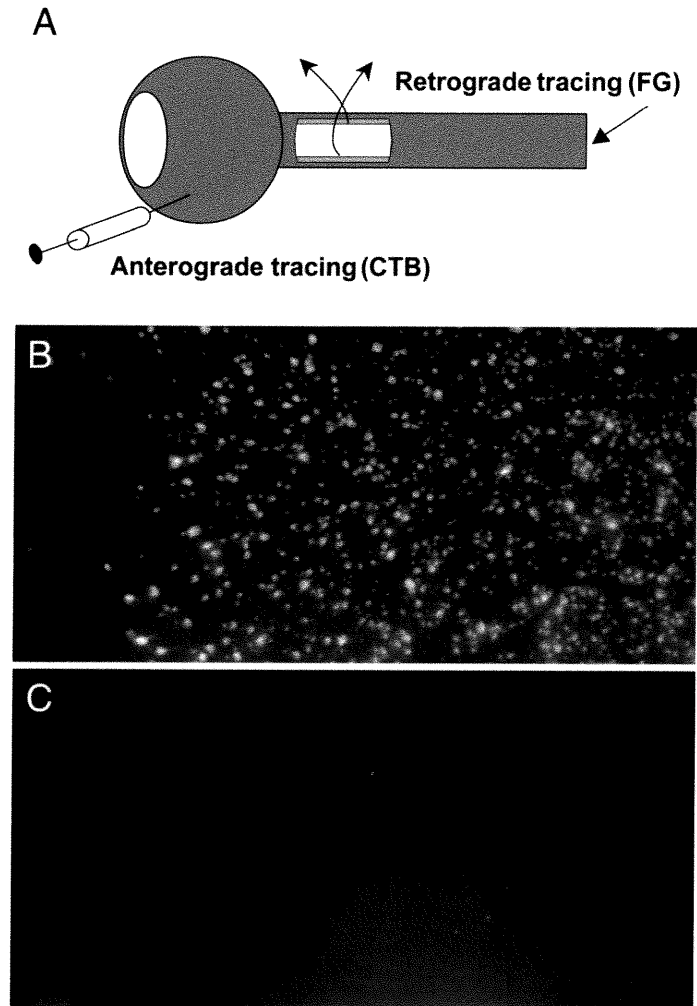
Immunohistochemical localization of GFAP and CSPG was performed on freshly cut cryostat sections with an anti-GFAP polyclonal antibody (1:250, Sigma, St-Louis, MO) and the CS56 mouse IgM anti-CSPG antibody (1:100, Sigma, St-Louis, MO), respectively. A FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:40, Promega, Madison, WI) was used to reveal GFAP staining, and a biotinylated rabbit anti-mouse IgM antibody (1:100, Chemicon, Temecula, CA) followed by DTAF-conjugated streptavidin (1:500, Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA) for CSPG staining. Immunostaining of laminin to localize blood vessels was performed with a monoclonal antibody (1:200, Sigma, St-Louis, MO) followed by an FITC-conjugated anti-mouse antibody (1:100, Promega, Madison, WI).

## 3.4 RESULTS

### **3.4.1 Microcrush lesions of the optic nerve and RGC survival**

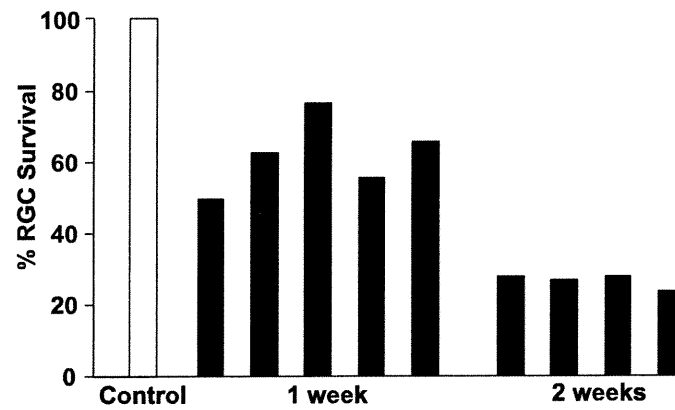
Microcrush lesions of optic nerve were used to transect RGC axons and minimize the amount of secondary damage. The optic nerve crush was made with fine 10.0 sutures, tied and held for 60 seconds (Fig. 1A). To confirm that these lesions completely transected RGC axons, we used both anterograde and retrograde tracing techniques. Retrograde tracers were applied to the superior colliculus at the same time as microcrush lesion to determine if all RGC axons were transected (n=3 animals). One week later, the retinas were examined for the presence of typical intensely labeled RGCs. Control retinas where the nerve was not injured showed Fluorogold labeling (Fig. 1B). After optic nerve transection, none of the RGCs appeared labeled, demonstrating that all axons were transected (Fig. 1C). The anterograde labeling studies (Fig. 3F, see below) also confirmed that all RGC axons were transected by a microcrush lesion.

To better characterize these lesions we then examined the neuronal response to injury. RGCs begin to die several days after axon transection, and the extent of RGC cell death is dependent on the method used to produce axotomy of the optic nerve, such as crush or cut, and the distance of the lesion from the eye (Villegas-Perez *et al.*, 1993; Berkelaar *et al.*, 1994). We determined the pattern of RGC cell survival after microcrush lesion. Seven days after lesion 62% of RGCs remained alive, and this number dropped to 28% by 2 weeks, compared with contralateral controls (Fig. 2). This pattern of cell survival is similar to that reported for intraorbital nerve section (Villegas-Perez *et al.*, 1993)



*Figure 1.* The microcrush lesion transects all RGC axons. (A) Illustration of the technique used to make a microcrush lesion. (B, C) Retrograde tracing experiment to show normal labeling in control (B) compared to the absence of labeling after microcrush lesion (C). FG, Fluorogold; CTB, cholera toxin b subunit.





*Figure 2.* RGC cell survival after microcrush lesion. RGCs were counted and compared to the control value from the contralateral retinas, taken to be 100% (white bar). Five retinas were examined 1 week after lesion, with an average value for cell survival of 62%. Fourteen days after lesion 4 retinas were examined, with an average value of 28% RGCs remaining.

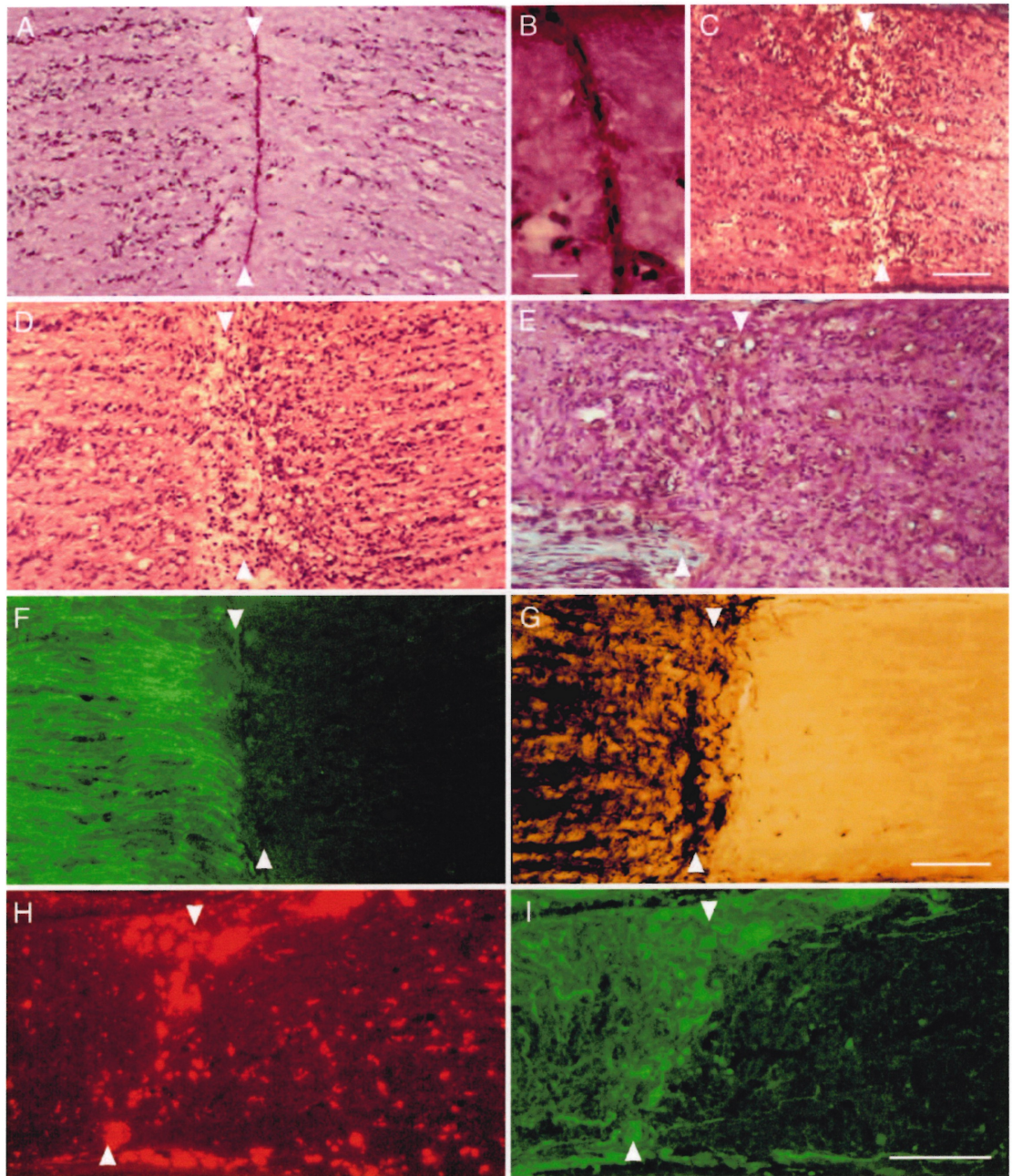
### **3.4.2 Cellular response to microcrush lesions**

By hematoxylin-based staining methods we were able to visualize the tissue morphology of the optic nerve after microcrush lesion. At 24 hr, the lesion site was clearly demarcated as a thin, intensely-stained line (Fig. 3A). This darkly stained region of focal injury contained spindle-shaped nuclei and blood cells within a highly stained matrix (Fig. 3B). Immediately adjacent to this line of focal injury, there were fewer nuclei and the staining was less intense than the surrounding optic nerve.

By one week the line of focal lesion was less clearly demarcated, and the less intensely stained region immediately adjacent to the lesion was not apparent (Fig. 3C). At two weeks the crush site appeared as a disorganized region with stained nuclei interspersed among gaps of lighter staining (Figs. 3D and 6B). The focal region of the crush was identified by the increased cellularity at the crush, which was a result of macrophage invasion. The presence of macrophages was confirmed by immunostaining with the marker ED-1. ED-1 immunoreactivity was well-developed 2 weeks after injury (not shown), becoming less intense by 8 weeks (Fig. 3H), with most macrophages concentrated just at the lesion site.

At 8 weeks post-injury, in the hematoxylin-stained sections the lesion site remained less well defined than at 24 hr (Figs. 3E and 6C). At this time point the lesion site was identified by the presence of blood vessels that had invaded to fill the focal region of microlesion (Fig. 3E) and by the thin band of macrophages (Fig. 3H).

The invasion of new blood vessels into the lesion area was further studied by anti-laminin immunohistochemistry. By 2 weeks the network of new blood vessels in the



*Figure 3.* The optic nerve 24 hr to 8 weeks after microcrush lesion. (A) HPS staining of the optic nerve 24 hr after microcrush lesion shows a thin line of nuclei form at the site of lesion. (B) Higher magnification view of the crush at 24hr. (C, D, E) Masson's trichrome staining at 1 week (C) and 2 weeks (D) and HPS staining at 8 weeks (E) shows increased nuclear disorganization at the crush zone. (F) Anterograde labeling with CTB shows that the fluorescently labeled RGC axons retract back from the site of the crush 24 hr after lesion. (G) CTB staining revealed by HRP immunohistochemistry 2 weeks after microcrush lesion. Axons have grown back to the lesion site

lesion site was well developed, with some branches extending distal and proximal to the focal lesion (Fig. 4B). Laminin staining of uninjured optic nerve was used as control (Fig. 4A). This new vascularization formed a dense network that appeared to contribute to the development of the lesion scar. The blood vessels remained concentrated at the site of lesion 8 weeks after injury (Fig. 3E).

### 3.4.3 Anterograde tracing studies

Injection of CTB into the eye allows RGC axons in the optic nerve to be specifically identified by anti-CTB immunohistochemistry. By anterograde transport of CTB, the distribution of RGC axons in the optic nerve was followed at 6 hr, 24 hr, 1 week, 2 weeks and 8 weeks after lesion. At 6 hr, most axons retracted back from the lesion (not shown). Axons remained retracted back from the lesion site at 24 hr (Fig. 3F). We estimated that most axons retracted from 30 to 200  $\mu\text{m}$  from the lesion. By 1 week after injury RGC axons had sprouted to grow back to the lesion site, and some axons had extended short distances past the scar (Fig. 3G). By 2 weeks after lesion most of the axons remained proximal to the lesion, and few axons, mostly near the periphery of the optic nerve, grew past the lesion for about 100  $\mu\text{m}$ , with fewer axons at greater distances (Lehmann *et al.*, 1999). No obvious co-localization between axon growth and laminin positive blood vessels was noted. Axons distal to the lesion were also observed 8 weeks

---

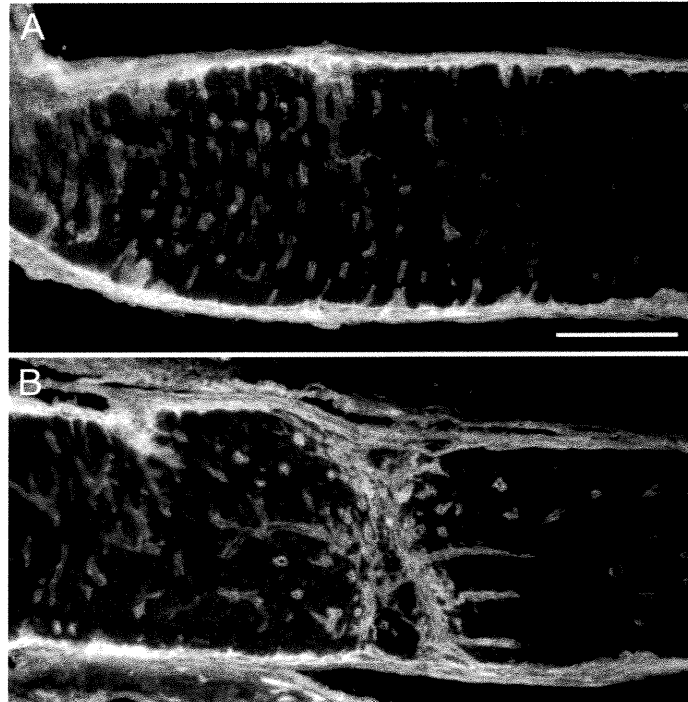
and a few axons are able to extend beyond the crush. (H, I) Immunofluorescent labeling of ED-1 (H) and CTB (I) 8 weeks after crush. Most axons able to extend beyond the crush are located at the peripheral region of the optic nerve. Arrowheads show the crush sites in each micrograph. All optic nerves are shown with the proximal segment toward the eye on the left, and the distal segment toward the chiasma on the right. (A, C), scale bar, 100  $\mu\text{m}$ ; (B), scale bar, 20  $\mu\text{m}$ ; (D, E, F, G), scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . (H, I), scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .

after lesion (Fig. 3I). In general, the number of axons able to cross the lesion was small at all time points, and axons were not able to extend long distances in the in the myelin-rich center of the nerve.

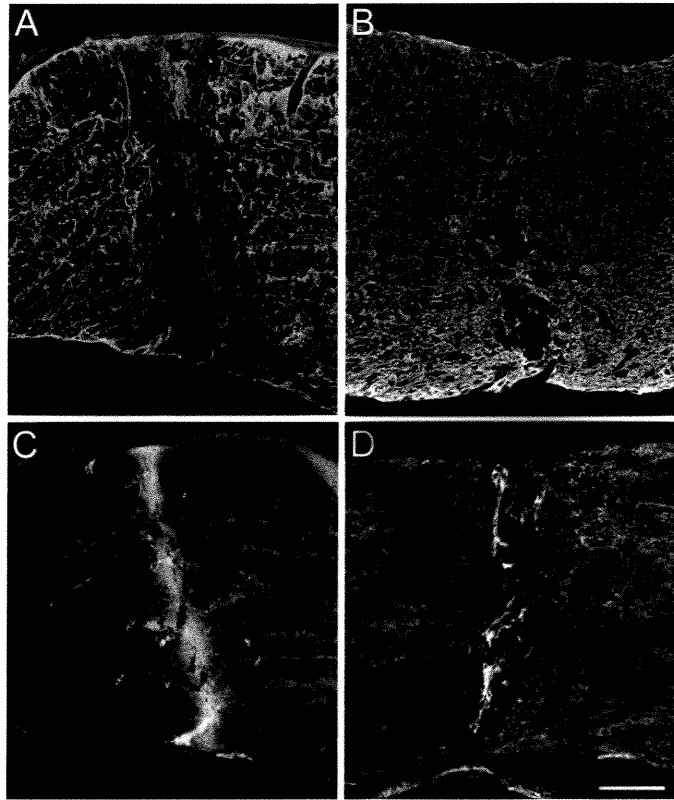
#### ***3.4.4 GFAP and CSPG immunoreactivity and myelin staining after optic nerve lesion***

To better characterize the glial response to microcrush lesion we followed GFAP and CSPG immunoreactivity at the lesion site. By 24 hr after lesion, a GFAP-negative zone extended out on both sides of the lesion site (Fig. 5A). This GFAP negative zone corresponded in approximate thickness to the pale region adjacent to the optic nerve lesion at 24 hr observed with hematoxylin-based stains and suggests that early after injury astrocytes disappear from this region. A thin line of light GFAP immunoreactivity was observed at the center of the GFAP negative region, the site where the 10.0 suture made the axonal transection. By two weeks, GFAP immunoreactivity had refilled much of the lesion site (Fig. 5B), an observation consistent with the changes in sections stained by hematoxylin-based methods. By 8 weeks, GFAP staining was almost uniform across the region near the lesion site (not shown).

The CSPGs were studied with the CS56 antibody, which recognizes the chondroitin sulfate carbohydrate moiety. A thin line of CS56 positive immunoreactivity was present in the immediate lesion area (Fig. 5C). This line of immunoreactivity appeared to parallel the hematoxylin-positive line of staining at the lesion site at 24 hr (Fig. 3A). By 2 weeks, the intensity of CSPG immunoreaction was reduced (Fig. 5D).



*Figure 4.* Laminin immunoreactivity reveals blood vessel invasion into injured optic nerve. (A) Laminin immunoreactivity in an uninjured control. (B) Two weeks after microcrush lesion blood vessels have grown into the injury site. Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ .



*Figure 5.* GFAP and CSPG immunoreactivity in the injured optic nerve. (A) GFAP immunoreactivity 24 hr after microcrush lesion shows a GFAP negative region adjacent to the crush site. (B) The GFAP-negative region fills in by 2 weeks after crush. (C) The CS56 immunoreactivity 24 hr after lesion is restricted to a thin line immediately in the crush region. (D) Two weeks after lesion the region of CSPG staining is reduced. Scale bar, 100  $\mu$ m

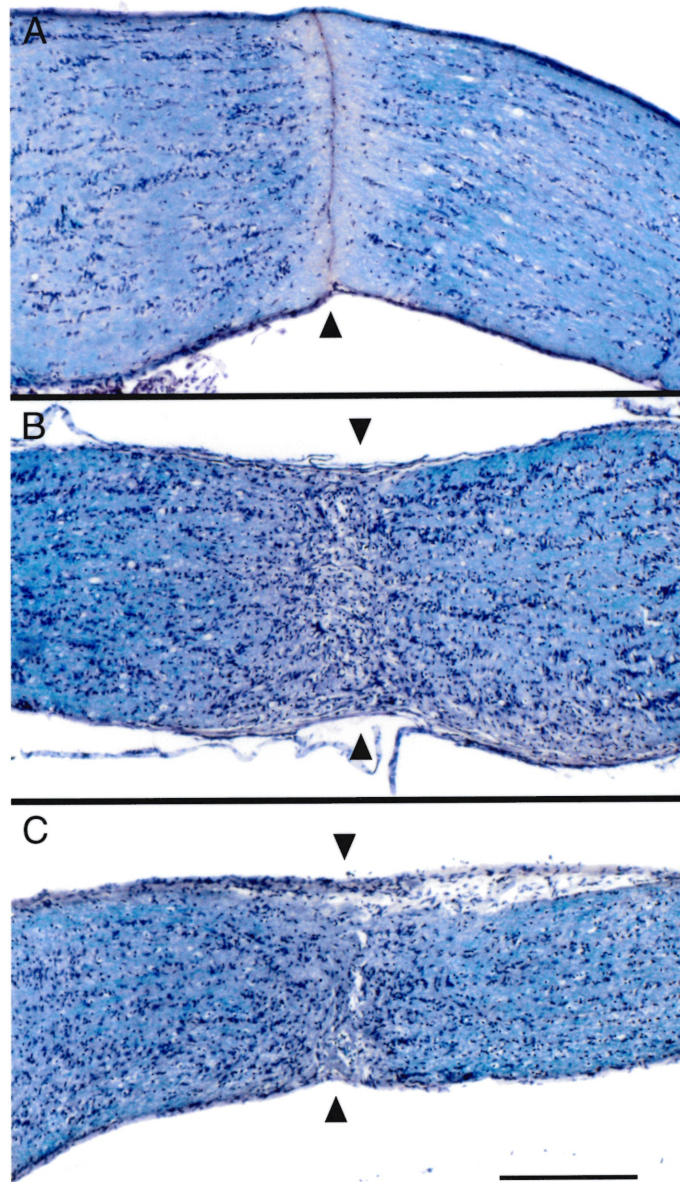
Luxol fast blue staining was used to determine if a myelin-free zone developed after microcrush lesion. After lesion, a myelin-free zone that appeared as lighter blue region, developed at the site of lesion and extended approximately 100  $\mu\text{m}$  on each side of the lesion (Figs. 6A-6C). This myelin-free zone remained at the lesion site for the 8-week period of observation. Also, at all time points myelin staining remained distal to the lesion, confirming the absence of myelin clearance for long periods after axonal injury.

### 3.5 DISCUSSION

We report here a microcrush lesion of the optic nerve that completely transects all RGC axons. This microcrush lesion permits studies of axon regeneration in the optic nerve better than typical cut or crush lesions because there is little cavity formation adjacent to the lesion site. Moreover, the site of lesion is sharply defined, which allows accurate measurements of the distance of axon growth past the lesion site. Typical cut or crush injuries of optic nerve result in large regions of cavitation (Graftstein et Ingoglia, 1982; Giftochristos et David, 1988), similar to that seen after contusion injury of spinal cord (Beattie, 1997). Moreover, regeneration cannot be studied after optic nerve cut because the two ends of the nerve separate leaving no matrix for regrowth. The microcrush lesion of the optic nerve we report here is an excellent model to study strategies designed to promote axon regeneration in the inhibitory white matter environment.

The microcrush lesion produced a small, focal lesion that is lined with spindle-shaped nuclei. This focal lesion is CS56 positive, and the nuclei may represent leptomeningeal cells that migrate into the lesion. It was previously reported that





*Figure 6.* Luxol fast blue staining for myelin. (A) A myelin-free area that appears as less intense blue staining develops at the lesion site 24 hr after crush. (B, C) Two weeks (B) and eight weeks (C) after microcrush lesion myelin remains in the distal optic nerve. Arrowheads indicate the crush. Scale bar, 250  $\mu\text{m}$ .

meningeal cells are non-permissive for axon growth, and that astrocytes in association with leptomeningeal cells show strong CS56 immunoreactivity (Ness, 1997; Hirsch, 1999). Therefore, we speculate that the thin line observed in sections stained by hematoxylin-based methods is composed of both leptomeningeal cells and CS56 positive astrocytes, and that together these cells form the lesion scar after microcrush injury.

After microcrush lesion of the optic nerve, the lesion site is a small, defined region. Early after injury we noted a decrease in GFAP immunoreactivity and decrease in number of nuclei immediately adjacent to the lesion, observations that are consistent with reports of a GFAP negative region after optic nerve crush (Blaugrund, 1993; Frank et Wolburg, 1996; Solomon *et al.*, 1996). By contrast, injury of cortex, often used to study glial scars, results in an increase in GFAP immunoreactivity that persists for several weeks (McKeon *et al.*, 1991). Therefore, the glial reaction in optic nerve differs from that observed in brain cortical gray matter. Also, we noted an extensive in-growth of blood vessels into the injury region that contribute to the injury scar. Invasion of blood vessels has been observed after injury of the spinal cord (Imperato-Kalmar, 1997), and experiments on anti-angiogenic agents given after spinal cord injury show that they reduce the area of damage (Wamil *et al.*, 1998). It is unlikely that growing axons can easily penetrate through the dense meshwork of blood vessels that develops by two weeks after microcrush lesion. We suggest that blood vessels that invade the injury site contribute to the formation of a mechanical scar that blocks axon regeneration.

RGC axons transected in the optic nerve retract back from the lesion site by 6 hr after optic nerve injury. Transected RGC axons retract back towards the eye for a variable distance of approximately 30 to 200  $\mu\text{m}$ , and they remained retracted at 24 hr. It has been

shown that extracellular calcium that enters axons at the cut end causes depolymerization of the cytoskeleton (Meller, 1987; LoPachin et Lehning, 1997) and, therefore, the axon retraction that we observed is likely an immediate consequence of the injury. We observed that by 1 week the axons grew back to the site of microlesion, a finding consistent with previous reports of abortive sprouting of injured RGC axons (Richardson *et al.*, 1982a; Giftchristos et David, 1988), and the observation that at early times this growth is quite vigorous (Zeng *et al.*, 1994). Cut axons elaborate growth cones early after injury in response to transient, intracellular proteolytic activity (Ziv, 1998). Our results show that most if not all RGC axons do grow after injury, but that regrowth is arrested when they reach the injury scar. Therefore, early after injury the failed regeneration may not so much be due to an aborted growth response, but because the barrier of the scar blocks further axon extension. At later times, changes in the intrinsic growth properties of RGCs (Cohen *et al.*, 1986; Bates et Meyer, 1997) may contribute to regeneration failure. The network of blood vessels at the scar in the optic nerve suggests that for RGC axons the scar may be a physical barrier in addition to that formed by CSPGs.

By seven days after lesion, some axons were able to extend across the lesion, as previously reported (Richardson *et al.*, 1982a; Giftchristos et David, 1988; Lehmann *et al.*, 1999). A very few axons (one or two per nerve) extended long distances in the distal optic nerve, over 1 mm, and these generally were localized adjacent to the optic nerve sheath. However, such growth was rare, even at 8 weeks after injury, and the number of axons in the central optic nerve just distal to the line of injury was similar at 8 weeks and two weeks (Figs. 3G and 3I). At 4 to 16 months, only rarely has a long axon over 5 mm been detected (Campbell *et al.*, 1999). Therefore, most axons that are able to cross the

lesion do not continue to grow long distances. A contributing factor to this failed long distance regeneration is the cell death that follows axon transection. Our observations at 2 weeks, when 28% of RGCs are still alive, provide evidence that myelin-derived inhibitors also contribute importantly to failed axon regeneration. Experiments with transplanted sensory neurons have suggested that the myelinated environment distal to a lesion can be permissive for axon regrowth and that the glial scar is the barrier to regeneration (Davies *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1999). Our observations suggest that both the CS56 positive scar and myelin-derived growth inhibitory proteins contribute to the failure of RGC regeneration after injury.

## **4 TROISIÈME ARTICLE**

« Article soumis »

## **Vaccination to Stimulate Retinal Ganglion Cell Regeneration in the Adult Optic Nerve: Lack of Evidence that Antibodies Block Growth-inhibitory Proteins**

Benjamin Ellezam, Johanne Bertrand, Pauline Dergham and Lisa McKerracher

*Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.*

Abbreviated Title : Vaccine for axon regeneration in the optic nerve

*Address correspondence to:*

Dr. Lisa McKerracher

Département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

C.P. 6128, succursale centre-ville

Montréal, QC H3C 3J7

Phone: (514) 343-7776

Fax: (514) 343-5755

Email: mckerral@ere.umontreal.ca

### **Acknowledgements**

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

## 4.1 ABSTRACT

Vaccination with homogenized spinal cord or myelin stimulates regeneration in the adult mouse CNS (Huang et al. 1999. Neuron 24:639). Here, we examine by anterograde labeling whether vaccination of adult rats with spinal cord homogenate (SCH) can promote regeneration of retinal ganglion cell (RGC) axons after microcrush lesion of the optic nerve. Two weeks after injury, animals vaccinated with SCH showed axon growth across the lesion site into the distal optic nerve and such regeneration was not observed in controls vaccinated with a liver homogenate (LH). This regenerative effect was not a consequence of neuroprotection since our vaccine did not protect RGCs from axotomy-induced cell death. Vaccination with either SCH and LH led to antibody penetration in the lesioned optic nerve. Serum of vaccinated animals were tested by western blot and ELISA against growth-inhibitory proteins associated with myelin or the glial scar. Neither myelin-associated glycoprotein (MAG), NogoA, Nogo-66 receptor (NgR), nor chondroitin sulphate proteoglycans (CSPG) were detected by serum IgG or IgM from SCH-vaccinated animals, however, antibodies specific to myelin basic protein (MBP) were detected. We examined the ability of serum from SCH vaccinated animals to override growth inhibition by myelin or by CSPG substrates in cell culture. Serum from SCH-vaccinated animals promoted growth on myelin but not on CSPG. Our results suggest that the growth promoting effect of the SCH vaccine is not mediated by antibody blocking of growth-inhibitory proteins, but by antibodies to major myelin proteins.

**Key words:** *growth-inhibitory proteins, optic nerve crush, regeneration, cell survival, immune response, axotomy.*

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

Different strategies have been reported to limit growth inhibition and stimulate regeneration in the adult optic nerve. One successful approach has been to replace the environment with a peripheral nerve (PN) graft (Vidal-Sanz *et al.*, 1987; Keirstead *et al.*, 1989; Whiteley *et al.*, 1998; Sauve *et al.*, 2001) or artificial Schwann cell grafts (Negishi *et al.*, 2001). Ideally, however, a strategy should allow axons to grow directly through the CNS terrain. In the optic nerve, this was achieved by puncturing the lens (Fischer *et al.*, 2000; Leon *et al.*, 2000) or placing PN implants in the vitreous (Berry *et al.*, 1996; Berry *et al.*, 1999), with both methods acting on RGCs at the cell body level. Regeneration of RGCs has also been stimulated by methods aimed directly at the lesion site, such as application of C3 to inhibit Rho signaling (Lehmann *et al.*, 1999), transplantation of macrophages to speed up myelin removal (Lazarov-Spiegler *et al.*, 1996), or treatment with antibodies against myelin inhibitors (Weibel *et al.*, 1994).

We have previously reported the use of a myelin-based vaccine to encourage antibody production and stimulate axon regeneration in the adult mouse spinal cord (Huang *et al.*, 1999). It is known that immunizations with CNS constituents can be associated with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of



multiple sclerosis (Owens et Sriram, 1995); however, EAE is only induced when strains of susceptible animals are injected with CNS constituents emulsified in mycobacteria-containing adjuvants (Levine et Wenk, 1961). In fact, when spinal cord homogenate (SCH) is mixed in mycobacteria-free adjuvant, and administered repetitively during a number of weeks, it desensitizes the T-cell response to spinal cord proteins and constitutes an effective method to prevent or suppress EAE (Alvord *et al.*, 1965). Interestingly, this injection regimen also leads to elevated antibody titers (Alvord *et al.*, 1965; Lisak *et al.*, 1970) and more recent studies have shown that antibodies obtained through this regimen promote remyelination in animals with chronic EAE (Raine et Traugott, 1983) or virus-induced demyelination (Rodriguez *et al.*, 1987; Rodriguez et Lennon, 1990; Miller *et al.*, 1994). This vaccine regimen, when applied to adult mice, stimulated spinal cord regeneration (Huang *et al.*, 1999), and sera from immunized mice were able to block myelin-derived growth inhibition *in vitro*, supporting the idea that antibodies mediate this effect. Additional support for an antibody-based response comes from an earlier report that described increased regeneration in rats treated with sera from rabbits immunized with injured rat brain (Geisert et Alley, 1985).

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

(that stimulate T-cells) have been shown to promote survival of injured RGCs (Moalem *et al.*, 1999; Fisher *et al.*, 2001).

## 4.2 MATERIALS AND METHODS

### 4.2.1 Immunization and surgery

Spinal cord homogenates and control liver homogenates (LH) used for immunization from were prepared by homogenizing 0.5 g adult Sprague-Dawley rat spinal cord or liver, respectively, in 30 ml phosphate buffered saline (PBS) and diluting to a protein concentration of 1 mg/ml. Adult female Sprague-Dawley rats (n=39) were immunized twice weekly with 100 µg of either of these preparations, or with PBS, emulsified with an equal volume of incomplete Freund's adjuvant (IFA; GIBCO BRL, Burlington, ON) by a subcutaneous injection behind the neck. Optic nerve microcrush lesion was performed 3 weeks after initial immunization as described previously (Selles-Navarro *et al.*, 2001). Briefly, rats were anesthetized with isoflurane (Janssen, Toronto) and the left optic nerve was exposed through a supraorbital approach. The nerve was crushed 1 mm from the globe by holding a tight knot made with a 10-0 suture for 60 sec. Rats were given one dose of 0.015 mg/kg buprenorphine (Reckitt & Colman, Richmond, VA) immediately after surgery for analgesia. The two weekly immunizations were continued for another two weeks and rats were killed by an overdose injection of chloral hydrate and perfused with 4% paraformaldehyde (PFA).

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

For qualitative observations on RGC regeneration after vaccination, rats were immunized with either SCH ( $n=6$ ) or PBS ( $n=3$ ) mixed with incomplete Freund's adjuvant. For quantification of regenerated RGC axons, rats were immunized with either SCH ( $n=5$ ) or LH ( $n=5$ ) as control. All rats received an intravitreal injection of 5  $\mu$ l 1% cholera toxin  $\beta$  subunit (CTB; List Biological Labs., Campbell, CA) 24 hr before perfusion with PFA. Eyes were dissected, post-fixed 1 hr in PFA, cryoprotected overnight in 30% sucrose and frozen at  $-70^{\circ}$  C in OCT (Canlab, Montreal). Longitudinal cryostat sections of optic nerves were cut at 14  $\mu$ m and mounted on Superfrost Plus slides (Fisher, Montreal). Retinal ganglion cell axons were labeled by immunohistochemistry for CTB using a goat anti-cholera toxin (List Biological Labs.), a biotinylated rabbit anti-goat (Vector Labs., Burlingame, CA) and DTAF-conjugated streptavidin (Jackson Labs., West Grove, PA) as described previously (Selles-Navarro et al., 2001). Eight to ten sections per animal were examined under fluorescence, photographs were taken with a video camera (Princeton Instruments, Trenton, NJ) and regeneration was quantified by counting the number of axons crossing a line parallel to the lesion site at distances of 50  $\mu$ m, 100  $\mu$ m, 250  $\mu$ m or 500  $\mu$ m. The average number of axons per section was determined for each animal at each distance. The longest axon was also recorded for each animal. Statistical significances were established using Student's *t*-test.

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

In 15 rats, either untreated ( $n=5$ ) or immunized with SCH ( $n=5$ ) or LH ( $n=5$ ) RGCs were labeled by applying 2% Fluorogold (FG; Fluorochrome, Englewood, CO) to the

superior colliculi 7-8 d before optic nerve injury as described previously (Peinado-Ramon et al., 1996). Two weeks after injury, rats were perfused with PFA and the retinas of both eyes were removed and prepared as flattened whole mounts. Mean densities of FG-labeled RGCs were estimated as described (Villegas-Perez et al., 1993). Briefly, RGCs were counted on 12 standard areas located at 1, 2 and 3 mm from the optic disc in each experimental and control retina. To calculate the density of RGCs per mm<sup>2</sup> the total number of cells counted on the 12 regions was divided by the total area. Densities for each animal were expressed as percent RGC survival relative to contralateral unoperated retina.

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

Blood samples were taken twice weekly from 5 rats undergoing SCH immunization. Serum was isolated and stored at -80 °C. Serum IgG and IgM concentrations were measured by sandwich ELISA using a standard protocol with a rat immunoglobulin (Ig) quantitation kit (Bethyl Labs., Montgomery, TX). Briefly, 96-well plates (Maxi-Sorp; Nalge Nunc Intl., Rochester, NY) were coated with a 1/100 dilution of provided anti-rat IgG or IgM, incubated with sera from vaccinated rats diluted to fall in the range of the supplied standards (1:60,000 for IgG; 1:2,000 for IgM) and antibody binding was detected with an HRP-conjugated secondary antibody and a TMB color reaction system (Kirkegaard & Perry Labs., Gaithersburg, MD). Immunoglobulin concentration in test sera were measured in duplicates and expressed as a percentage of Ig concentration in pre-immune sera.

#### **4.2.5 Immunohistochemistry for immunoglobulins**

Optic nerve cryostat sections (*cf.* above) of two-week injured rats immunized with SCH ( $n=5$ ) or LH ( $n=3$ ) were either incubated 1 hr at room temperature (RT) with an RITC-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson Labs.) or overnight at 4 °C with a goat anti-rat IgM (Bethyl Labs.) followed by 1 hr at RT with a biotinylated rabbit anti-goat (Vector Labs.) and 1 hr at RT with DTAF-conjugated streptavidin (Jackson Labs.).

#### **4.2.6 Western blot analysis**

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

Temecula, CA) that includes neurocan, versican, aggrecan and phosphocan, was digested for 1 hr at 37 °C with 0.3 U/mg chondroitinase ABC (Sigma, Oakville, ON) and 4 µg were loaded in each well. Proper digestion of CSPG was detected by coomassie blue staining. For non-denaturing PAGE (ND-PAGE), proteins prepared in sample buffer lacking β-mercaptoethanol and SDS were separated in SDS-free running buffer at 4 °C. After incubation with vaccinated animal sera (diluted 1:150-8,000), rat IgG and IgM were detected with either biotinylated or HRP conjugated secondary antibodies. Several different secondary antibodies were tested for each experiment: an HRP-conjugated goat anti-rat IgM (1:10,000-20,000; Bethyl Labs.), an HRP-conjugated rabbit anti-rat IgG-Fc (1:10,000; Bethyl Labs.), an HRP-conjugated Affinipure rabbit anti-rat IgG+IgM (H+L) (1:10,000-20,000; Jackson Labs.), a biotinylated goat anti-rat IgG+IgM (H+L) (1:5000; Jackson Labs.), a biotinylated polyclonal mouse anti-rat IgG (H+L) (1:5,000-15,000; Zymed Labs., San Francisco), and a biotinylated mouse anti-rat IgM (µ chain) (1:1,000-10,000; Zymed Labs.). Biotin was detected with HRP-conjugated streptavidin (1:5,000-30,000; Zymed Labs.). For SDS or ND-PAGE, MAG was detected with monoclonal antibodies Gens3 (Nobile-Orazio et al., 1984) or 513 (2 ng/ml; MAB1567; Chemicon), respectively, followed by an HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:100,000-300,000; Jackson Labs.). NogoA was detected with a polyclonal antibody (1 µg/ml; Chemicon) followed by an HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10,000; Jackson Labs.). MBP was detected with a rat monoclonal antibody provided by Dr. P. Braun (Dept. Biochemistry, McGill) (1:50,000; Groome et al., 1986) followed by an HRP-conjugated Affinipure rabbit anti-rat IgG+IgM (H+L) (1:10,000; Jackson Labs.). Antibody binding was revealed with a chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL). Non-specific

binding of secondary antibodies was closely followed in all experiments, and all blots were submitted to a wide range (1 s to 1 hr) of exposure times.

#### **4.2.7 ELISA for antigen specific immunoglobulins**

Serum was collected from SCH ( $n=5$ ) or LH ( $n=4$ ) immunized rats at the time of perfusion, 2 weeks after optic nerve injury. Pre-immune serum was also used as control. Antigen specific immunoglobulins in sera were detected by indirect ELISA. Briefly, 96-well plates (Maxi-Sorp; Nalge Nunc Intl.) were coated overnight at room temperature with PBS solutions containing either 12  $\mu\text{g/ml}$  spinal cord protein, 5  $\mu\text{g/ml}$  bovine MBP (Sigma), 5  $\mu\text{g/ml}$  CSPG (Chemicon), 5  $\mu\text{g/ml}$  purified native MAG (see above), or 1:25 NogoA transfected COS-7 cell lysate (see above). Wells were blocked with 3% bovine serum albumin (Roche Diagnostics, Laval, QC), incubated for 2 hr at 37 °C with test sera undiluted or diluted 1:5, 1:25, or 1:100, followed by 1 hr at room temperature with an HRP-conjugated Affinipure rabbit anti-rat IgG+IgM (H+L) (1:5000; Jackson Labs.). Antibody binding was detected as described above.

#### **4.2.8 Cell culture**

Primary retinal neurons were isolated from P0-P3 rats as described previously (Lehmann et al., 1999). Test substrates were prepared by coating 8-well plastic chamber slides (Nalge Nunc Intl.) with 25  $\mu\text{g/ml}$  poly-L-lysine (Sigma) 2 hr at 37 °C, followed by either 4  $\mu\text{g/chamber}$  purified bovine brain myelin dried overnight at room temperature or 0.25  $\mu\text{g/ml}$  mixed proteoglycans (Chemicon) incubated overnight at 37 °C. Slides were incubated with test sera, diluted 1:100 in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), for 5 hr at 37 °C. After washing the slides with serum-free DMEM, dissociated cells were

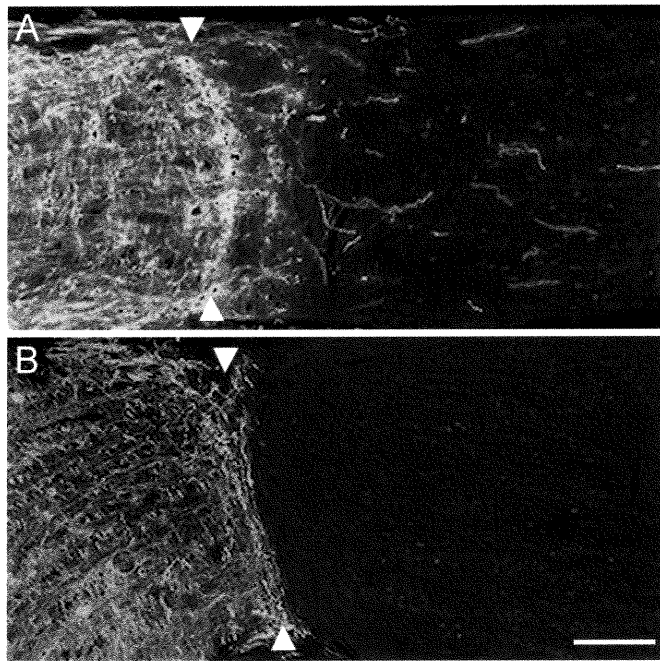
plated and incubated at 37 °C. In a separate experiment, dissociated cells were incubated with sera (1:100 in DMEM) for 1½ hr, washed with serum-free DMEM, and plated on untreated myelin coated chamber slides. In both experiments, slides were fixed 2 d after plating, with 4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde, and neurons were identified by immunocytochemistry using a  $\beta$ III tubulin antibody (Sigma). The longest neurite per neuron was measured (Northern Eclipse, Empix Imaging, Mississauga, ON).

## 4.3 RESULTS

### ***4.3.1 Regeneration of RGC Axons after Optic Nerve Microcrush***

In a previous study, we have shown that optic nerve injury by microcrush lesion effectively axotomizes all RGC axons and provides a well-defined lesion site that allows precise measurements of anterogradely labeled axons (Selles-Navarro et al., 2001). Here, we have used the microcrush model to examine the potential of a vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult optic nerve. We immunized Sprague-Dawley rats, a strain with very low susceptibility to EAE (Levine and Wenk, 1961), with a regimen of multiple injections known to stimulate polyreactive antibody production, desensitize T-cells reactive to spinal cord self-antigens, and suppress EAE (Alvord et al., 1965; Miller et al., 1994; Asakura et al., 1996). Therefore, we injected rats twice a week for three weeks before injuring the optic nerve. We then continued immunizations for another two weeks, at which time we analyzed optic nerves for axon regeneration. Intravitreal injection of the anterograde tracer CTB, 24 h before perfusion, allowed injured axons to be identified by immunofluorescence. Anterogradely transported CTB does not label spared RGC axons (Ellezam et al., 2002), presumably because it accumulates at





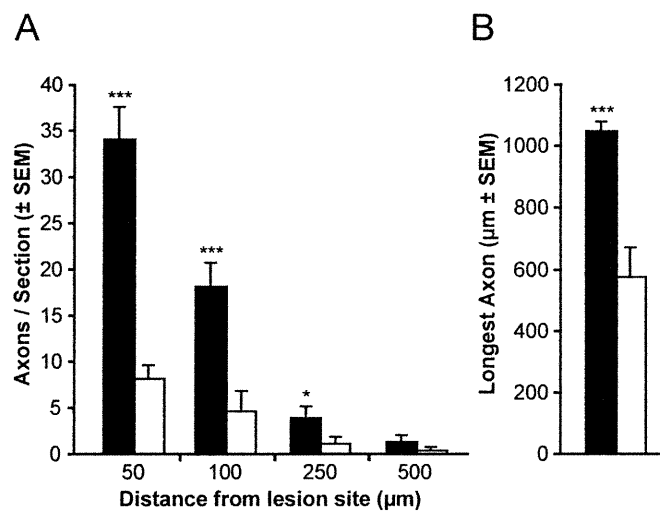
*Figure 1.* Vaccination with SCH stimulates axon regeneration in the adult rat optic nerve. A, Longitudinal section of optic nerve from a SCH-treated rat, showing microcrush lesion site (arrowheads) and anterogradely labeled axons regenerating across the lesion and into white matter. B, Section from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

nerve terminals in the brain. We only detected few or no axons past the lesion site in animals immunized with the control vaccine (Fig. 1B). In contrast, we detected many axons across the lesion site and into the white matter in animals immunized with the SCH vaccine (Fig. 1A). We counted the number of axons that grew different distances past the lesion site and determined that SCH vaccination significantly enhanced regeneration for distances up to 250  $\mu\text{m}$  (Fig. 2A). We also measured the length of the longest regenerated axon in each animal. Axons that had regenerated long distances had grown significantly farther in animals vaccinated with SCH as compared to LH controls (Fig. 2B).

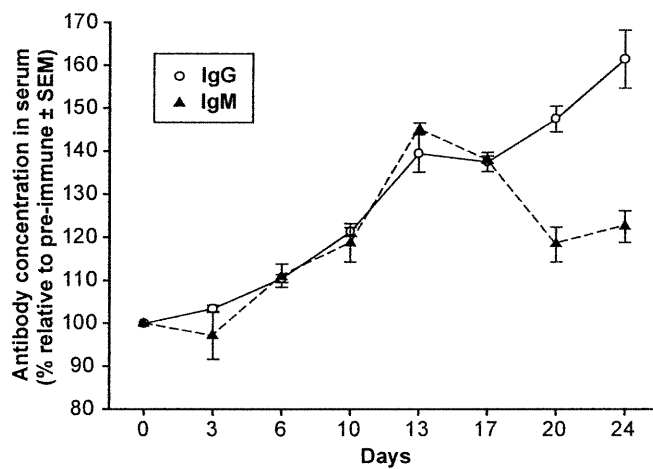
### **4.3.2 Antibody Reaction Following Vaccination**

#### *4.3.2.1 Time-course of IgG and IgM production*

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



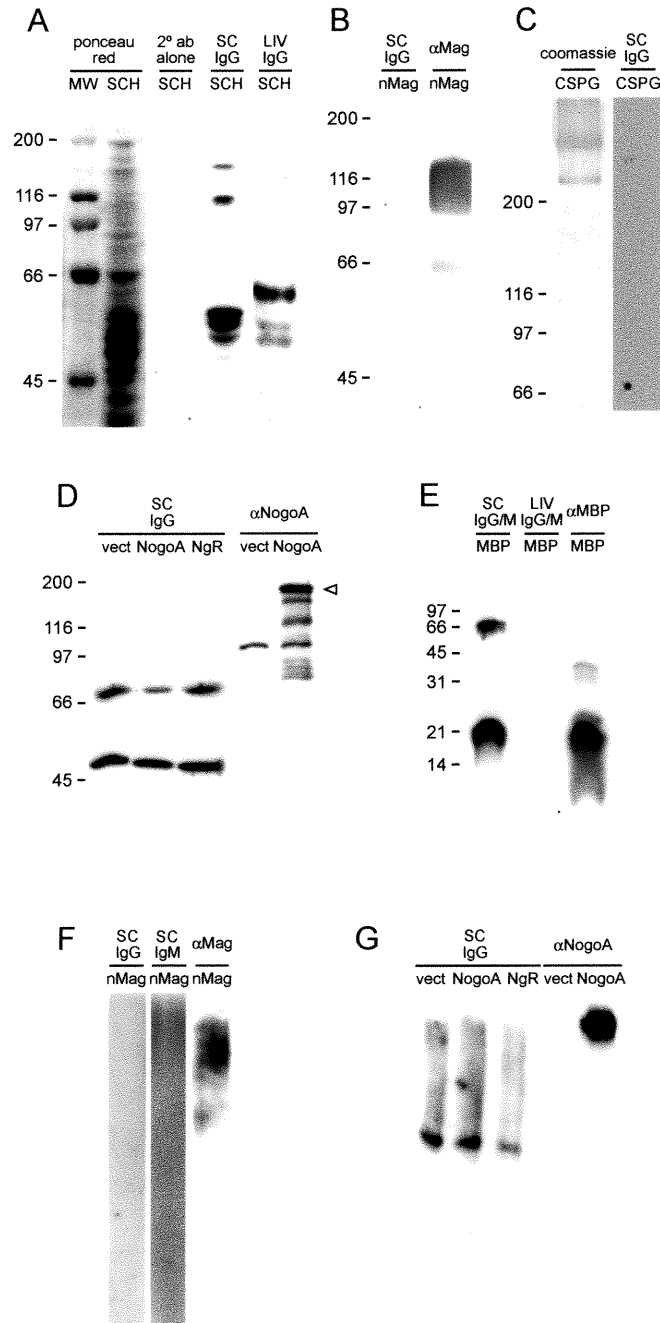
*Figure 2.* The SCH vaccine significantly enhances extent of regeneration. A, Average number of axons crossing a virtual line at different distances from the microcrush site on optic nerve sections from rats immunized with (black) SCH or (white) LH. Stars indicate statistically significant differences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



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

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

We have previously reported that sera from immunized mice can bind to spinal cord proteins on western blots (Huang et al., 1999), but the immunoreactive proteins were not identified. To further characterize this immune reaction, we have examined if antibodies in the sera of vaccinated animals can bind to various known growth-inhibitory proteins in denaturing or non-denaturing conditions. We verified the presence or absence of specific antibodies in the sera with secondary antibodies against rat IgG or IgM. To confirm results, experiments were repeated with secondary antibodies from a number of sources. By SDS-PAGE, we have tested MAG, recombinant NogoA, CSPG, MBP, and full SCH. While serum IgG (Fig. 4A) and IgM (data not shown) bound to several spinal cord proteins, they did not bind to MAG (Fig. 4B) nor CSPG (Fig. 4C). Moreover, serum IgG (Fig. 4D) or IgM (data not shown) detected two major bands in extracts of COS-7 cells used to produce NogoA but did not detect a ~180 kDa band characteristic of NogoA (GrandPre et al., 2000). In contrast, the sera of some SCH-treated animals contained high amounts of antibodies against MBP (Figs. 4E and 5), whereas no such antibodies were detected in LH-treated controls. In sera of LH-treated controls, some IgG (Fig. 4A) and IgM (data not shown) bound to spinal cord proteins but they showed different binding patterns than sera from SCH-vaccinated animal. Since SCH-vaccinated animals were immunized with full SCH, which contains neuronal antigens, we also tested for the presence of antibodies against NgR. In cell lysates containing recombinant NgR, two COS-7 proteins were detected by IgG from the sera of SCH-treated rats but no band was detected at ~70 kDa, the reported molecular weight of NgR (Fournier et al., 2001).



*Figure 4.* Antibodies against known growth-inhibitory proteins are not detected in animals vaccinated with SCH. A, Western blot showing, from left to right, molecular weight markers, full SCH stained with ponceau red, and full SCH incubated with an HRP-conjugated anti-rat IgG either without serum, as control, or with serum from a rat vaccinated with SCH or LH, respectively. B, Western blot of purified native MAG after incubation with (left lane) serum from a SCH-treated rat (1:1000) and an anti-rat IgG or with (right lane) MAG monoclonal antibody Gens3. C, (left) Coomassie blue staining of a chondroitinase-digested CSPG mix following SDS-PAGE, and (right) western blot of transferred CSPG after incubation with serum from a SCH-treated rat (1:1000) and

Since the polyclonal antibodies produced by our immunization protocol might not bind to certain protein epitopes after denaturation and separation by SDS-PAGE, we also tested the sera on MAG, NogoA and NgR in non-denaturing electrophoresis conditions. On non-denaturing western blots, MAG was detected with the 513 MAG antibody (Fig. 4F). However, a similar band could not be detected by either rat IgG or IgM specific secondary antibodies after incubation with sera of SCH-treated animals (Fig. 4F). On non-denaturing preparations of cell lysates containing either recombinant NogoA, NgR, or the vector alone, all band patterns were similar, suggesting unspecific binding of serum antibodies to the COS-7 cell preparation (Fig. 4G). The band obtained after incubation with a polyclonal NogoA antibody (Fig. 4G) could not be detected in blots incubated with sera.

To confirm our analysis of serum antibodies we measured binding of IgG and IgM to full SCH or more specifically to CSPG, MAG, NogoA, NgR, and MBP by indirect ELISA. Not surprisingly, sera from SCH-treated animals contained more antibodies binding to full SCH than sera from LH-treated animals or pre-immune serum (Fig. 5). As for specific antigens, serum from 3 of the 5 SCH-treated animals analyzed contained

---

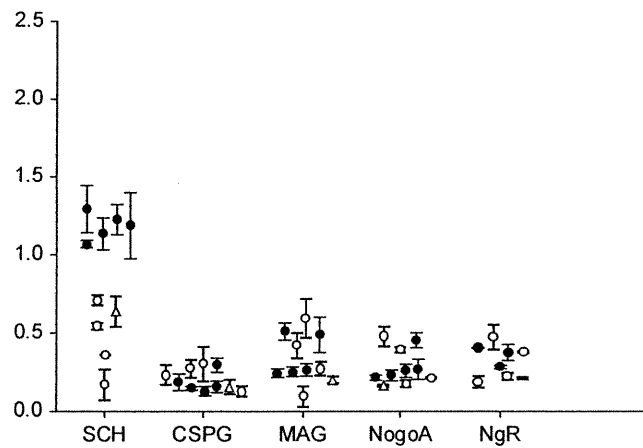
an anti-rat IgG. D, (left-hand blot) Western blot of CHO cell lysates containing (left) vector alone, (middle) recombinant NogoA, and (right) recombinant NgR, after incubation with serum from a SCH-treated rat (1:1000) and an anti-rat IgG. Right-hand blot shows (left) vector alone and (right) recombinant NogoA, after incubation with a NogoA antibody. NogoA migrates as a ~180 kDa band (GrandPre et al., 2000) and NgR as a doublet at 70 kDa (Fournier et al., 2001). E, Western blot of bovine MBP after incubation with serum from a rat treated with (left) SCH or (middle) LH, followed by an anti-rat IgG+IgM, or with (right) an MBP antibody. F, Western blot of purified native MAG following ND-PAGE, after incubation with (left and middle) serum from a SCH-treated rat (1:500) and either an anti-rat (left) IgG or (middle) IgM, or with (right) MAG antibody 513. G, (left-hand blot) Western blot following ND-PAGE of COS-7 cell lysates containing (left) vector alone, (middle) recombinant NogoA, and (right) recombinant NgR, shown after incubation with serum from a SCH-treated rat (1:500) and an anti-rat IgG. Right-hand blot shows (left) vector alone and (right) recombinant NogoA, after incubation with a NogoA antibody. Molecular weight standards (MW) in kDa are on the left. SC IgG, serum IgG from SCH-treated rats; SC IgM, serum IgM from SCH-treated rats; LIV IgG, serum IgG from LH-treated rats; nMAG, purified native MAG; aMAG, MAG antibody; vect, vector; exp, ECL exposure time.

highly increased concentrations of MBP antibodies compared to control sera. In contrast, serum concentrations of antibodies to CSPG, MAG, NogoA, and NgR were not increased after treatment with SCH. These results show that the vaccination protocol does not lead to the production of significant amounts of antibodies against known growth-inhibitory proteins of myelin or the glial scar, although antibodies against MBP, one of the major myelin proteins, were detected.

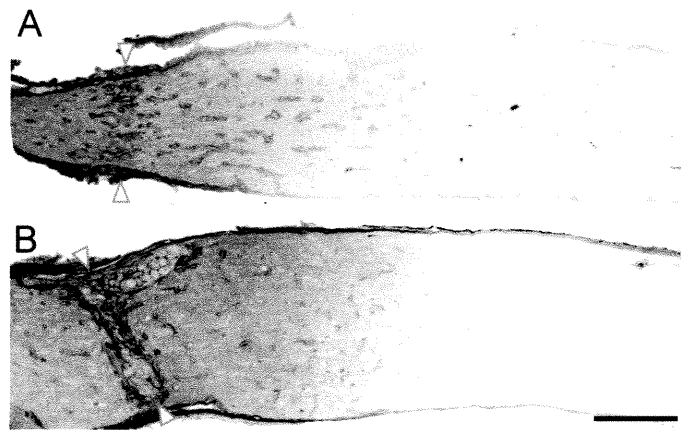
#### 4.3.2.3 *Antibody binding in the optic nerve*

We have previously reported the detection of more intense Ig binding in the spinal cord of injured mice vaccinated with SCH compared to that in injured mice treated with adjuvant alone (Huang et al., 1999). To determine the extent of antibody penetration in the microcrushed optic nerve, and to examine whether vaccination with SCH caused more antibodies to bind to the optic nerve matrix than control vaccinations with LH, we processed optic nerve sections for immunofluorescent detection of IgG and IgM. We found that penetration and binding of IgG in optic nerve was similar in SCH-vaccinated (Fig. 6A) and LH-vaccinated rats (Fig. 6B). The same was true for IgM (data not shown). Antibody penetration and binding appeared to decrease with distance from the lesion site, with no significant binding being detected after ~1mm (Fig. 6, A and B). Although both SCH and LH antibodies bind to the optic nerve, only vaccination with SCH stimulates RGC regeneration (Figs. 1 and 2). Therefore, antibodies that bind to myelin, such as MBP, are likely to be important in promoting regeneration.





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



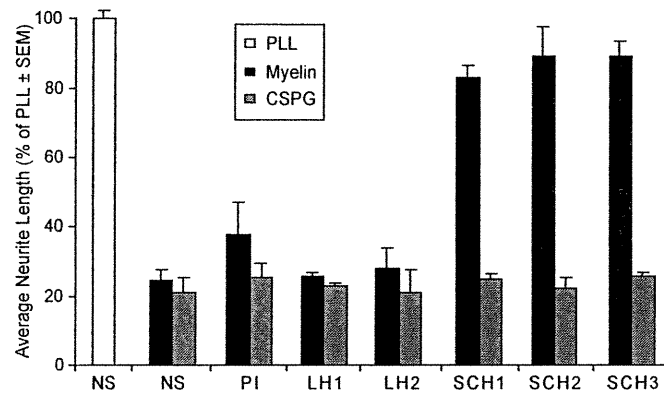
*Figure 6.* Vaccinating with either SCH or LH does not lead to significantly different patterns of antibody binding in the injured optic nerve. A and B, Longitudinal section of optic nerve immunostained for IgGs, two weeks after microcrush and immunization with (A) SCH or (B) LH. Antibody binding is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

### **4.3.3 Effect of SCH antiserum on RGC Neurite Outgrowth**

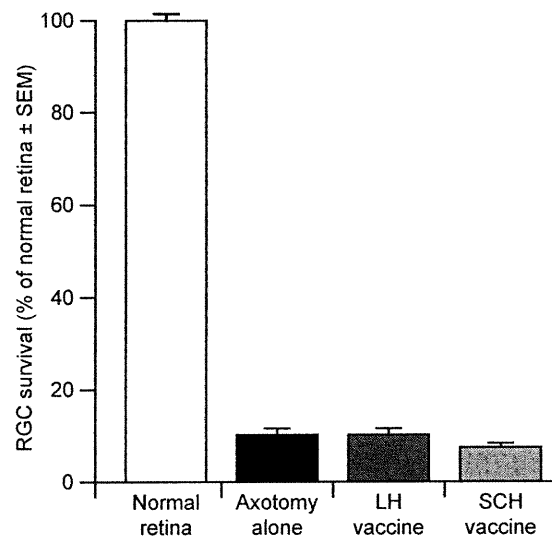
We have previously shown that serum from SCH-treated mice promotes neurite outgrowth on myelin substrates *in vitro*, and that this effect is lost when antibodies are depleted from the serum (Huang et al., 1999). To determine if antibodies from SCH-treated rats promote RGC neurite outgrowth on inhibitory substrates *in vitro*, and to further understand how antibodies exert that effect, we examined how SCH antiserum affects neurite outgrowth on different inhibitory substrates. Thus, before plating RGCs, we pre-incubated myelin or CSPG substrates with either SCH antiserum or control sera. Consistent with our previous results (Huang et al., 1999), pre-treatment of myelin substrates with SCH antiserum blocked growth inhibition while control sera had no effect (Fig. 7). Surprisingly, however, pre-treatment of CSPG substrates with the same SCH antisera did not block growth inhibition, suggesting that interaction of antibodies with myelin components was necessary to stimulate neurite outgrowth. To examine whether a direct interaction of serum antibodies with neurons could precede binding to myelin components and stimulate growth we incubated RGCs with SCH antiserum, washed away the antiserum with media and plated cells on myelin or CSPG substrates (data not shown). This treatment did not block growth inhibition. These results suggest that antibody binding of myelin components is necessary to promote growth.

### **4.3.4 RGC Survival after Optic Nerve Microcrush**

Previous studies have shown that, in susceptible strains of mice or rats, a classical active immunization protocol (i.e. an initial injection plus a booster 1 week later), with CNS constituents emulsified in a mycobacteria-supplemented adjuvant, can increase RGC



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



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

survival after severe (Fisher et al., 2001) optic nerve crush. This led us to test whether survival of RGCs, after complete axotomy by optic nerve microcrush, is also increased in animals vaccinated following our protocol. In animals undergoing vaccination, we retrogradely labeled RGCs by applying FG to the superior colliculi, and a week later performed an optic nerve microcrush lesion. We examined the retinas two weeks after optic nerve crush. Cell counting in both the left, operated retina, and right, control retina allowed us to express survival of injured RGC as a percentage of cell density in the contralateral uninjured eye (Fig. 8). Two weeks after crush alone, only 10% ( $\pm 1\%$ ) RGC survived.\* Similarly, in animals that were vaccinated the average survival rate was 10% ( $\pm 1\%$ ) for LH controls and 8% ( $\pm 1\%$ ) for rats treated with SCH. The slightly inferior average survival rate in SCH-treated animals was not statistically significant ( $P>0.5$ ). This demonstrates that immunization with SCH following our vaccination protocol does not lead to increased cell survival after axotomy.

#### 4.4 DISCUSSION

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

\* Cette survie moyenne de 10% diffère sensiblement du 28% rapporté dans le 2<sup>e</sup> article. La quantification avait alors été effectuée par Inmaculada Selles-Navarro ici au laboratoire. Nous faisons maintenant quantifier les rétines par des techniciens spécialisés, et cette moyenne de 10% a été confirmée, de façon indépendante, par une autre équipe.

We have previously reported the use of a SCH vaccine to stimulate regeneration of the corticospinal tract in adult mice (Huang et al., 1999). In those experiments, immunized animals had elevated serum levels of IgG and IgM, and a higher concentration of circulating myelin-reactive antibodies compared to controls; results consistent with the sustained elevation in antibody titers described in the original studies on this vaccination protocol and its EAE-suppressing properties (Alvord et al., 1965; Lisak et al., 1970). Here, we show that immunizing rats with SCH leads to a gradual increase in both IgG and IgM, with IgM levels peaking at two weeks and IgG levels still increasing after three weeks, and show that those antibodies bind spinal cord extract both on western blot and by ELISA. We have shown previously (Huang et al., 1999) and support here that antibodies obtained through this protocol also bind to white matter *in vivo* and overcome growth inhibition on myelin *in vitro*, indicating that the effect on regeneration is antibody-mediated.

Because we initially hypothesized that the effect of vaccination on regeneration was mediated by antibodies against growth-inhibitory proteins, and because sera from SCH immunized mice blocked myelin-derived growth inhibition *in vitro*, we tested the sera of SCH rats for the presence of antibodies against myelin inhibitors. Surprisingly, neither IgG nor IgM from these rats could bind purified MAG, or recombinant Nogo-A, either on western blot or by ELISA. To test whether antibodies were directed at inhibitors associated with the glial scar, we examined the serum of SCH-treated rats for antibodies against CSPG. It is known that some CSPG are expressed at basal levels in the adult spinal cord (Pindzola et al., 1993; Wang et al., 1997), and therefore immunizing

with full SCH could stimulate the production of antibodies against CSPG. Nevertheless, antibodies against CSPG were not detected in the serum of SCH-treated rats.

How then can we explain the better regeneration seen in rats vaccinated with SCH, and the better neurite outgrowth on myelin substrates pre-treated with SCH antiserum? Since SCH also includes many neuronal antigens, the effect of the SCH vaccine could be mediated by antibodies against neuronal epitopes, such as receptors for growth-inhibitory molecules. Glycosylated extracellular portions of receptor molecules are known to be very immunogenic. Antibodies might stimulate axonal growth by acting as ligands or by helping dimerize receptor tyrosine kinases. Application of antibody IN-1 was recently shown to induce sprouting in uninjured adult central neurons (Buffo et al., 2000), supporting the concept that antibodies may stimulate growth by acting on neurons directly. Yet, our results show no detectable amounts of NgR antibodies in the serum of immunized rats. Moreover, pre-incubating RGCs with SCH antiserum before plating them on myelin did not affect growth inhibition, which suggests that antibodies act by binding first to myelin. And while pre-incubating substrate with SCH antiserum blocked growth inhibition on myelin it had no effect on purified CSPG. If antibodies acted directly on neurons SCH antiserum would have been expected to overcome growth inhibition similarly on the two different substrates.

While immunization with SCH did not lead to detectable levels of antibodies against known growth inhibitors, it did lead in some rats to high titers of antibodies against MBP. This is actually not surprising since MBP constitutes 35% of CNS myelin (Quarles et al., 1997), while MAG and NogoA are minor components. Thus, it is likely that antibodies produced to the most abundant myelin proteins are critical to the



regenerative response. Anti-myelin antibodies might first bind myelin and then interact with neurons through membrane receptors to stimulate growth. Alternatively, antibodies bound to myelin proteins could simply provide an artificial growth-permissive substrate. However, we have shown here that regardless of the treatment, similarly large quantities of serum IgG and IgM leak from the compromised blood brain barrier and are retained in lesioned optic nerve, potentially acting as substrate. Therefore, a general substrate modification caused by an overall increase in antibody binding to the optic nerve is not likely to account for the different regenerative outcomes observed in SCH and LH-treated rats. This overall similar antibody penetration in SCH and LH-treated rats contrasts with the increased penetration of antibodies in mice vaccinated with SCH compared to adjuvant alone (Huang et al., 1999). However, it is consistent with the recent demonstration that similar amounts of T-cells accumulate in the lesioned optic nerve, whether animals are immunized with myelin peptides or with control proteins (Fisher et al., 2001).

Although vaccination with SCH stimulated significant regeneration across the lesion site, few axons regenerated long distances in the optic nerve white matter. This is consistent with a previous study that showed a given regenerative strategy can lead to axon growth distances almost one order of magnitude longer in the spinal cord compared to optic nerve (Bartsch et al., 1995). Interestingly, the longest regenerated axon in SCH-treated rats was detected at ~1 mm from the lesion site, a distance that corresponds to the range of Ig infiltration in the optic nerve. Therefore, the limited permeability of the optic nerve far from the lesion site might hinder the penetration of reactive antibodies, and thus limit their effect. Moreover, it is known that in all optic nerve lesion paradigms the

number of RGCs available for growth-promoting treatment falls very quickly after axotomy (Villegas-Perez et al., 1993). Here, we have shown that a microcrush lesion of the optic nerve leads to the death of ~90% RGCs by two weeks, and the cell death was not prevented by vaccination with SCH.

Schwartz and colleagues have shown that a vaccination with myelin-derived peptides can lead to neuroprotection of axotomized RGCs (Fisher et al., 2001). They used a conventional immunization protocol, with mycobacteria-containing complete Freund's adjuvant, to sensitize T-cells reactive to CNS auto-antigens. Those sensitized T-cells were shown to mediate the vaccine's effect on RGC survival (Fisher et al., 2001), and are thought to exert their effect, in part, by the production of neurotrophins (Moalem et al., 2000). We show here that repetitive vaccination with SCH in a mycobacteria-free adjuvant, in contrast, does not stimulate RGC survival. This was not surprising since this vaccination protocol was, in contrast to that of Schwartz and colleagues, designed to desensitize T-cells reactive to CNS proteins (Alvord et al., 1965). Another difference between the two vaccination protocols is their different influence on regeneration. While we reported previously (Huang et al., 1999), and confirm here, that our repeated vaccination protocol stimulates regeneration, the protocol used by Schwartz and colleagues was not reported to affect fiber regeneration, but rather has neuroprotective effects.

The relationship between neuronal regeneration and survival is not fully understood (Goldberg and Barres, 2000). The fact that axotomy near the cell body generally causes more severe cell death yet triggers more regeneration (Aguayo et al., 1991) is still very puzzling. To date, some studies have attempted to demonstrate a

connection between RGC survival and regeneration. Some of the studies have shown that supporting survival alone is not sufficient to promote axon regeneration. For example, in mice over-expressing the anti-apoptotic bcl-2, RGC survival after axotomy is remarkable, yet spontaneous axon regeneration does not occur (Chierzi et al., 1999). Results from intraocular neurotrophin injection are less clear. Studies have shown that BDNF-induced RGC survival does not increase axon regeneration in PN grafts (Mansour-Robaey et al., 1994; Klocker et al., 2001), but since intravitreal injections stimulate intraretinal growth (Sawai et al., 1996) it perhaps becomes disadvantageous for axons to exit the retina. Other methods to release diverse growth factors, such as puncturing the lens (Fischer et al., 2000; Leon et al., 2000) or placing PN implants in the vitreous (Berry et al., 1996; Berry et al., 1999) do lead to RGC growth in the optic nerve. Intravitreal implants also stimulate RGC regeneration in a distally-attached PN graft (Lau et al., 1994), where regeneration normally does not occur (Richardson et al., 1982). On the other hand, whether stimulating regeneration at the level of the cut axon is sufficient to promote cell survival in the retina has not been carefully studied. Our results show that stimulating regeneration of cut axons by vaccination is not sufficient to promote RGC survival. Thus, the limited regeneration we observed following vaccination might be enhanced by combining the vaccine with neuroprotective agents. In the future, it will also be important to determine how compounds, including antibodies or inhibitors of intracellular targets, can stimulate growth signaling pathways when applied directly to the lesion site. Resolving this issue is contingent on deeper knowledge of the cross-talk between the signaling pathways associated with apoptosis and axon growth (Goldberg and Barres,

2000), and a better understanding of growth-promoting signaling pathways independent of cell survival (Benowitz et al., 1998).

In summary, we show that repeated vaccination with SCH can be used to stimulate axon regeneration in the adult optic nerve. Although sensitizing myelin-reactive T-cells was recently shown to have a neuroprotective effect on injured RGCs (Moalem et al., 1999; Moalem et al., 2000; Fisher et al., 2001; Kipnis et al., 2001; Yoles et al., 2001), our pro-regenerative vaccination protocol did not diminish cell death. Our results suggest that antibodies against major myelin proteins are important for the regenerative effect of the vaccine, and that against expectations, the importance of antibodies against growth-inhibitory proteins seems limited.

## **5 DISCUSSION GÉNÉRALE**

### 5.1 Nétrine-1 et ses récepteurs dans le système visuel adulte : rôle possible dans la modulation des capacités régénératives des cellules ganglionnaires de la rétine

Nos travaux montrent qu'une molécule de guidage axonal importante pour le développement du nerf optique, nétrine-1, reste exprimée dans le système visuel adulte. Chez le rat adulte, nous avons détecté nétrine-1 tant dans la rétine que dans le nerf optique. Quant à DCC et UNC5H2, deux récepteurs de nétrine-1, nous les avons détectés dans les cellules ganglionnaires. Nous nous sommes aussi intéressés à l'influence des lésions axonales sur les niveaux d'expression de nétrine-1 et de ses récepteurs. Nous avons montré qu'après axotomie, l'expression de DCC et UNC5H2 est régulée à la baisse. Le niveau d'expression de nétrine-1 dans la glie du nerf optique, quant à lui, n'est pas modifié après lésion.

Nous nous sommes aussi penchés sur le rôle possible de nétrine-1 dans la régénération des cellules ganglionnaires vers un greffon de nerf périphérique. D'abord, nous avons montré que nétrine-1 est exprimée dans le nerf sciatique, celui qu'on utilise comme greffon. Ensuite, nous avons montré, qu'après axotomie suivie d'une greffe de nerf périphérique, les cellules ganglionnaires régulent encore DCC et UNC5H2 à la baisse, peu importe qu'elles parviennent ou non à régénérer un axone. Ensemble, ces résultats suggèrent non seulement un rôle des nétrines dans le fonctionnement de la rétine adulte, mais aussi dans la modulation des capacités régénératives des cellules ganglionnaires après lésion du nerf optique.

### **5.1.1 Expression constitutive de nétrine-1 et de ses récepteurs chez l'adulte : rôles possibles**

Nétrine-1 est exprimée dans plusieurs sites-clés durant le développement du système visuel (Kennedy *et al.*, 1994; Serafini *et al.*, 1996; de la Torre *et al.*, 1997; Deiner *et al.*, 1997; Livesey et Hunt, 1997; MacLennan *et al.*, 1997). Son importance a été particulièrement bien démontrée dans l'ontogenèse du nerf optique (Deiner *et al.*, 1997). Toutefois, l'expression de nétrine-1 dans la rétine elle-même, durant la migration initiale des cellules ganglionnaires, suggère qu'elle joue aussi un rôle dans l'organisation interne de la rétine (MacLennan *et al.*, 1997). Nous avons montré ici l'expression de nétrine-1 dans les couches internes de la rétine adulte. Cette expression a été détectée non seulement au niveau des cellules de la couche ganglionnaire, mais aussi dans les cellules de la couche granulaire interne, laquelle regroupe les cellules bipolaires, les cellules horizontales, les cellules amacrines et les somas des cellules de Müller. De plus, une immunoréactivité diffuse a été détectée dans la couche plexiforme externe, où se trouvent les synapses entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires, et dans la couche plexiforme interne, où sont les synapses entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. Nous avons obtenu ces données chez le rat et chez la souris *netrin-1*<sup>+/-</sup>. Les données immunohistochimiques obtenues chez le rat renseignent sur la localisation de la protéine, tandis que, chez la souris, la visualisation du produit d'expression du gène *β-gal* (cf. 2.4.1) renseigne vraiment sur la source de production de nétrine-1. Nous avons détecté, avec ces deux types de marquage, un patron d'expression similaire, ce qui apporte un soutien important à notre démonstration. Quant aux récepteurs DCC et UNC5H2, ils ont été détectés dans les cellules ganglionnaires et dans certaines cellules de

la couche plexiforme interne. En somme, donc, nous avons démontré que nétrine-1 et deux de ses récepteurs sont exprimés dans la rétine adulte.

Il est intéressant de constater que nétrine-1 et ses récepteurs sont tous deux exprimés dans les cellules ganglionnaires. Une telle coexpression du couple ligand-récepteur est un phénomène qui semble courant dans les cellules nerveuses, notamment dans les cellules ganglionnaires. La première démonstration a été faite pour le couple BDNF/TrkB (Cohen-Cory et Fraser, 1994; Herzog *et al.*, 1994). L'expression de BDNF par les cellules ganglionnaires laisse croire à son action de type autocrine dans la rétine. D'ailleurs, chez le poussin, la majorité du BDNF de la rétine provient de la rétine elle-même, et non des terminaisons tectales (Herzog *et al.*, 1998; *et cf.* 1.2.3). Les éphrinesA sont aussi coexprimées avec leur récepteurs EphA dans les cellules ganglionnaires et l'on suppose que c'est grâce à cette colocalisation que la sensibilité aux éphrines peut être modulée au niveau de la cible (Hornberger *et al.*, 1999). Enfin, nous avons déjà mentionné que le récepteur Robo est exprimé par les cellules ganglionnaires en développement et que le ligand Slit est exprimé, pour sa part, par les cellules du nerf optique et de la papille (*cf.* 1.2.1). Comme les éphrinesA, Slit est aussi exprimé dans les cellules ganglionnaires (Niclou *et al.*, 2000). Cette observation a conduit Niclou *et al.* (2000) à proposer que Slit puisse aussi, de façon autocrine, moduler la sensibilité des axones à son récepteur Robo. Un mécanisme autocrine a été démontré pour l'homologue UNC-6 de nétrine-1 chez *C. elegans* (Wadsworth *et al.*, 1996). Durant l'embryogenèse du nématode, certains neurones pionniers attirés par une source de nétrine/UNC-6 se mettent par la suite à exprimer eux mêmes UNC-6 ; ici encore, c'est croit-on pour influencer la croissance ou le guidage des axones qui suivront.



Quel rôle pourrait avoir nétrine-1 dans la rétine adulte? Sa localisation aux couches plexiformes suggère un rôle dans le maintien, ou la plasticité des réseaux synaptiques. Une fonction similaire des nétrines a été bien documentée au cours du développement de synapses musculaires chez la drosophile (Mitchell *et al.*, 1996; Winberg *et al.*, 1998). Dans ce système, une homologue de nétrine-1, exprimée par certains muscles, ne semble pas attirer les axones à distance, mais plutôt exercer une action rapprochée en signalant à des axones spécifiques de venir faire synapse. Un tel rôle dans la formation de synapses serait envisageable pour la rétine adulte, lors du remaniement synaptique qui s'opère après axotomie des cellules ganglionnaires (Thanos, 1988; Tabata et Fukuda, 1992; Watanabe *et al.*, 1995), ou encore après exposition prolongée à la lumière (Jansen et Sanyal, 1987) ou détachement de la rétine (Lewis *et al.*, 1998). L'expression de nétrine-1 que nous avons détectée dans les couches plexiformes rappelle celle de la neuroplastine, une molécule d'adhésion cellulaire probablement importante pour la synaptogenèse chez l'embryon et qui est nécessaire à la restructuration des synapses chez l'adulte (Murase et Schuman, 1999; Kreutz *et al.*, 2001). Dans le même ordre d'idée, Kennedy a observé que, dans l'hippocampe du rat adulte, un traitement à la pilocarpine pouvait entraîner une augmentation d'expression de nétrine-1; dans ce modèle animal d'épilepsie, où l'on observe un important réarrangement synaptique, nétrine-1 pourrait contribuer au guidage à courte distance des nouveaux bourgeons axonaux (T. Kennedy, communication personnelle). Dans la rétine adulte normale, la plasticité neuronale a été décrite comme un mécanisme d'adaptation à la lumière chez des vertébrés inférieurs comme le poisson rouge (Raynauld *et al.*, 1979; Wagner, 1980; Yazulla et

Studholme, 1992). L'existence d'un tel mécanisme chez le mammifère, auquel nétrine-1 pourrait éventuellement participer, n'a pas encore été démontrée.

Dans la rétine adulte normale, nétrine-1 pourrait aussi exercer un rôle dans la survie cellulaire. En effet, des résultats obtenus par Mehlen *et al.* (1998) suggèrent que le récepteur DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*), en plus d'intervenir dans le guidage axonal, puisse agir comme récepteur de dépendance. Tout comme le récepteur p75 des neurotrophines, DCC maintiendrait la cellule qui l'exprime en état de dépendance par rapport à son ligand. Ainsi, en l'absence de nétrine-1, DCC induirait l'apoptose. Ce rôle proposé de DCC concorde avec son rôle présumé de gène suppresseur, inactivé, comme son nom l'indique, dans les cancers du colon (pour revue, *cf.* Fearon et Pierceall, 1995). De plus, une étude récente montre que les récepteurs de type UNC5H agissent aussi comme récepteurs de dépendance, et que, comme DCC, ils constituent un substrat pour les caspases (Llambi *et al.*, 2001). Selon le mécanisme proposé, ces récepteurs pourraient, en l'absence de nétrine-1, agir comme amplificateurs de caspases en exposant, après protéolyse, un site pro-apoptotique. Cette hypothèse demeure cependant controversée (Manitt et Kennedy, 2002), et il n'est toujours pas démontré, qu'*in vivo*, les cellules qui expriment les récepteurs de nétrine-1 meurent en l'absence du ligand. Si toutefois nétrine-1 agit réellement comme facteur de survie partout où les récepteurs DCC ou UNC5H sont exprimés, on pourrait alors envisager, dans la rétine adulte, que nétrine-1 soit nécessaire à la survie des cellules ganglionnaires et des cellules de la couche granulaire interne.

Enfin, nous avons montré que nétrine-1 est constitutivement exprimée par la glie du nerf optique adulte. Des études récentes ont montré que nétrine-1 est aussi exprimée dans la moelle épinière adulte, particulièrement par les oligodendrocytes (Manitt *et al.*,

2001). Les analyses biochimiques ont indiqué que nétrine-1 est associée à la myéline périaxonale, au même endroit où sont exprimées les protéines inhibitrices MAG (Bartsch *et al.*, 1989) et Nogo (Chen *et al.*, 2000). Il se pourrait donc que nétrine-1, exprimée dans le nerf optique adulte, y restreigne le bourgeonnement axonal spontané, ou encore, inhibe la régénération.

### **5.1.2 Modulations d'expression après lésion et lors de la régénération : les nétrines inhibitrices de la croissance axonale dans le système visuel adulte?**

Au cours de ce même travail, nous avons constaté que l'expression génique des récepteurs de nétrine-1 est régulée à la baisse dans les cellules ganglionnaires après lésion du nerf optique; des résultats maintenant confirmés par un autre laboratoire (Petrausch *et al.*, 2000a). Différents types de gènes ont été étudiés dans les cellules ganglionnaires lésées : les gènes très précoces, qui encodent des facteurs de transcription, les gènes encodant des molécules du cytosquelette ou des molécules d'adhésion cellulaire, et les gènes associés à l'apoptose. La régulation de ces gènes après axotomie varie énormément. Par exemple, le gène marqueur d'apoptose, *bax*, est rapidement régulé à la hausse (Isenmann *et al.*, 1997), tandis que le gène anti-apoptotique *bcl-2* est rapidement régulé à la baisse (Isenmann *et al.*, 1997). Certains gènes contribuant au cytosquelette sont initialement régulés à la hausse, puis ensuite régulés à la baisse (ex. McKerracher *et al.*, 1993b). Enfin, d'autres gènes sont régulés à la baisse après axotomie, mais recouvrent leur expression d'origine dans les cellules ganglionnaires qui régénèrent (Robinson, 1996). Nos résultats ont indiqué que peu importe si les cellules ganglionnaires

parviennent ou non à régénérer leur axone lésé, DCC et UNC5H2 sont tous les deux régulés à la baisse

On ignore toujours pour quelle raison l'expression de ces récepteurs est régulée à la baisse dans les cellules ganglionnaires axotomisées. Peut-être des cellules dont la mort est imminente régulent-elles à la baisse toute protéine jugée non nécessaire? Cependant, nous avons mesuré les niveaux d'expression un mois après lésion, c'est-à-dire après la phase rapide de mort cellulaire (Villegas-Perez *et al.*, 1993; Berkelaar *et al.*, 1994). Une majorité des 5% de cellules qui ont survécu à ce stade continuent de survivre plusieurs semaines (Villegas-Perez *et al.*, 1993). Et ceci est encore plus vrai après une greffe de nerf périphérique, qui prolonge la survie à long terme des cellules ganglionnaires (Villegas-Perez *et al.*, 1988). Il semble donc que cette régulation à la baisse ne soit pas une régulation non spécifique reliée à la mort prochaine du neurone.

Peut-être une telle régulation vient-elle moduler les capacités régénératives des cellules ganglionnaires? Nous avons montré que, chez l'adulte, nétrine-1 est présente non-seulement dans la couche ganglionnaire mais aussi dans le nerf optique et que son expression, dans le nerf optique, subsiste après lésion. Dans les essais de croissance axonale *in vitro*, les neurones spinaux de *Xenopus*, qui expriment DCC, ont une forte tendance à orienter leur neurite vers une source de nétrine-1 (de la Torre *et al.*, 1997); et cette tendance est renversée si l'on coexprime UNC5H2 dans ces neurones, les neurites sont alors repoussés par nétrine-1 (Hong *et al.*, 1999). Durant l'embryogenèse, le système visuel de *Xenopus* et celui des mammifères expriment nétrine-1 de façon similaire (de la Torre *et al.*, 1997; Deiner *et al.*, 1997). Ainsi, DCC est exprimé par les axones des cellules ganglionnaires chez les deux espèces, et chez la souris, les mutants *dcc*<sup>-/-</sup> ou

*netrin-1*<sup>-/-</sup> présentent d'importantes malformations du nerf optique (Deiner *et al.*, 1997). Pour ces raisons, on suppose que c'est DCC qui intervient dans l'effet de nétrine-1 au cours du développement. Malheureusement, il n'existe toujours pas d'anticorps pour les récepteurs de type UNC5H, et il n'a donc pas été possible d'étudier en détail son expression durant le développement des axones des cellules ganglionnaires. De plus, aucun mutant *unc5h*<sup>-/-</sup> n'est disponible. Si les récepteurs UNC5H n'apparaissent qu'à l'issue de l'embryogenèse, dans les cellules ganglionnaires, on pourrait croire qu'il s'opère, à ce stade, un renversement de la réponse de ces cellules à nétrine-1 : attirés par nétrine-1 chez l'embryon, les axones s'en éloigneraient chez l'adulte. Dans ce contexte, on notera qu'une étude récente menée chez la lamproie, un vertébré qui récupère spontanément certaines fonctions motrices après lésion de la moelle épinière (Cohen *et al.*, 1988), rapporte une corrélation entre le faible potentiel régénératif de certains neurones et leur expression d'UNC-5 (Shifman et Selzer, 2000). De plus, il semblerait que dans la moelle épinière du rat, les récepteurs UNC5H soient exprimés plus fortement chez l'adulte que chez l'embryon (Manitt et Kennedy, 2002). Enfin, nous l'avons montré, nétrine-1 est exprimée dans le nerf sciatique adulte. Par conséquent, les axones des cellules ganglionnaires régénérant dans un greffon de nerf périphérique seront exposées à un environnement riche en nétrine-1. Or, le nerf sciatique est aussi riche en laminine (Cornbrooks *et al.*, 1983) et l'on sait que la laminine peut changer l'attraction à nétrine-1 en répulsion (Hopker *et al.*, 1999). Il se pourrait donc que le greffon ne soit que partiellement permissif. Si tel est le cas, la régulation à la baisse des récepteurs de nétrine-1 pourrait contribuer à limiter l'ampleur de cette inhibition.

D'autres données militent en faveur d'un rôle inhibiteur de nétrine-1 lors de la régénération des cellules ganglionnaires adultes. Dans les essais de croissance axonale avec neurones de *Xenopus*, la réponse à nétrine-1, tout comme celles à BDNF ou à MAG, dépend de la concentration intracellulaire d'AMPC (Song *et al.*, 1998). En effet, en baissant artificiellement le niveau d'AMPC, l'attraction à nétrine-1 se transforme en répulsion. Or, un autre groupe a montré que les niveaux d'AMPC diminuent dans les cellules ganglionnaires axotomisées (Shen *et al.*, 1999). De plus, on croit que dans les cellules ganglionnaires, comme dans les cellules des ganglions rachidiens, les niveaux d'AMPC sont plus bas chez l'adulte que chez l'embryon (Cai *et al.*, 2001). Ces données suggèrent donc qu'après lésion, les axones des cellules ganglionnaires adultes, pauvres en AMPC, puissent recevoir nétrine-1 comme un signal répulsif.

Un autre argument fait entrer en ligne de compte l'activité électrique des cellules ganglionnaires lésées. En effet, dans le même modèle *in vitro*, avec neurones de *Xenopus*, une étude récente démontre que la sensibilité des axones à une source de nétrine-1 peut être modulée par l'activité électrique du neurone (Ming *et al.*, 2001). La stimulation électrique du neurone réduit la quantité minimale de nétrine-1 nécessaire pour attirer son neurite. Le même courant électrique peut aussi stimuler les neurites à s'orienter vers une source de MAG, alors que celle-ci les repousse normalement. Nétrine-1 pourrait donc avoir un effet répulsif sur les cellules ganglionnaires dont l'activité électrique est réduite. Reste à savoir, cependant, si l'axotomie de ces cellules entraîne une réduction de leur activité électrique. L'électrorétinogramme ne révèle pas de différences significatives d'activité une semaine après section du nerf optique (Berardi *et al.*, 1990). Toutefois, cette technique qui évalue comment l'ensemble des cellules ganglionnaires répondent à

un stimulus visuel n'exclut pas une réduction d'activité électrique qui affecterait certaines cellules seulement.

Un autre facteur à considérer est la présence de récepteur de nétrine-1 au niveau du cône de croissance. Nous avons constaté ici que les cellules ganglionnaires expriment les ARNm de *Dcc* et d'*unc5h2*. Quant à la protéine DCC, sa présence dans les cellules ganglionnaires a été détectée au niveau des corps cellulaires et dans leur tronçon axonal proximal, c'est-à-dire celui situé dans la couche fibreuse. Cependant, nous n'avons pu détecter la protéine DCC dans les axones du nerf optique. Deux autres laboratoires se sont intéressés à l'expression axonale de DCC dans les cellules ganglionnaires. On y a démontré qu'à l'issue du stade embryonnaire où les axones sortent de la rétine pour former le nerf optique, DCC est régulé à la baisse dans le segment axonal distal alors que son expression persiste dans le segment proximal (Gad *et al.*, 2000; Petrusch *et al.*, 2000a). Ainsi, ces auteurs ont proposé que le mécanisme de guidage impliquant le couple nétrine-1/DCC pourrait, dans le système visuel adulte, être mis en veilleuse.

### **5.1.3 D'autres molécules de guidage axonal exprimées chez l'adulte?**

Le rôle des CSPG dans l'inhibition de la régénération chez l'adulte suscite actuellement beaucoup d'intérêt. On l'a vu, les CSPG sont des molécules de guidage axonale importantes durant l'embryogenèse. Leur rôle a été particulièrement bien établi au cours du développement du système visuel (Brittis *et al.*, 1992). Outre les CSPG, d'autres molécules de guidage identifiées chez l'embryon sont aujourd'hui étudiées dans le système nerveux adulte.

Les éphrines sont connues pour leur importance dans le guidage des axones rétiniens vers leur cible appropriée dans les collicules supérieurs (pour revue, *cf.* O'Leary et Wilkinson, 1999). Durant l'embryogenèse, elles exercent un effet répulsif sur les axones qui expriment des récepteurs Eph à leur surface (pour revue, *cf.* Flanagan et Vanderhaeghen, 1998). Des données récentes indiquent que les gradients d'expression d'éphrine-A4, bien démontrés chez l'embryon, sont conservés dans les collicules supérieurs de la souris adulte, même après lésion du nerf optique (Knoll *et al.*, 2001). Ces données suggèrent qu'éphrine-A4 pourrait maintenir sa capacité de guidage des axones rétiniens après lésion chez l'adulte, d'autant plus que ceux-ci expriment le récepteur EphA4 (Knoll *et al.*, 2001). La rétinotopie récemment observée par Sauvé *et al.* (2001) dans les connexions rétino-colliculaires régénérées par suite d'une greffe de nerf périphérique apporte un soutien additionnel à cette hypothèse.

Un autre groupe a rapporté la réexpression du récepteur EphB3 dans la moelle épinière lésée (Miranda *et al.*, 1999). Comme nétrine-1, EphB3 est exprimé et par la glie et par les neurones. Après lésion, EphB3 est exprimé dans les neurones moteurs de la corne ventrale et les astrocytes de la matière blanche. Cette hausse d'Eph B3 contribue peut-être à l'environnement inhibiteur de la moelle épinière après lésion. Par ailleurs, Dalva *et al.* (2000) ont récemment montré qu'en culture de neurones les récepteurs EphB interagissent avec les récepteur NMDA et régulent la formation de synapses. De plus, ils ont constaté que les synapses de l'hippocampe adulte sont munies de récepteurs EphB. Ils ont donc proposé un rôle possible des éphrines dans la plasticité synaptique chez l'adulte.

Les sémaphorines – une autre famille de molécule importante dans le guidage axonal chez l'embryon – ont été également étudiées récemment chez l'adulte. Ce sont,



comme les nétrines, des molécules bifonctionnelles : soit attractives, soit répulsives (pour revue, cf. Kolodkin, 1998; Nakamura *et al.*, 2000). Dans le système nerveux central adulte, la sémaphorine Sema3A est fortement exprimée après lésion (Pasterkamp *et al.*, 1999). Elle est produite par les fibroblastes méningés qui forment le noyau fibrotique de la cicatrice gliale (Pasterkamp *et al.*, 1999). Puisque Sema3A peut s'avérer répulsive pour les axones, on peut imaginer qu'elle contribue à l'environnement inhibiteur de la cicatrice gliale. Cependant, son effet inhibiteur dépend de la présence du complexe récepteur plexine/neuropiline-1 à la surface des axones (Takahashi *et al.*, 1999; Tamagnone *et al.*, 1999; Rohm *et al.*, 2000). Or jusqu'à maintenant, avec les anticorps disponibles, le récepteur neuropiline-1 n'a été détecté chez l'adulte que dans les axones olfactifs (Pasterkamp *et al.*, 1998a). Il se pourrait donc que, dans la moelle épinière, à l'instar de nétrine-1, les sémaphorines ne participent pas au guidage axonal, faute de récepteur.

On peut dresser un autre parallèle intéressant entre les nétrines et les sémaphorines; l'une comme l'autre famille de molécule semble impliquée dans un mécanisme d'autocrinie. En effet, dans la moelle épinière adulte, certains neurones expriment à la fois Sema3A et neuropiline-1 (Pasterkamp *et al.*, 1998b). Pasterkamp et Verhaagen (2001) ont donc proposé que Sema3A pourrait, comme les éphrines (Hornberger *et al.*, 1999), être transportée le long de l'axone et moduler la sensibilité des récepteurs situés dans les terminaisons axonales. Selon cette hypothèse une section de l'axone devrait alors entraîner une libération de Sema3A au niveau du site de lésion, et possiblement contribuer ainsi à l'inhibition de la croissance. De plus, ces auteurs ont montré que la période régénérative qui suit l'axotomie d'un nerf périphérique coïncide avec une régulation à la baisse de Sema3A dans les motoneurones (Pasterkamp *et al.*,

1998b), suggérant l'existence d'un mécanisme de suppression de l'inhibition dans le système nerveux périphérique. Dans le système nerveux central, en revanche, il semble que les lésions entraînent une régulation à la hausse de la Sema3A neuronale (Pasterkamp et Verhaagen, 2001).

#### **5.1.4 Perspectives d'avenir**

L'étude des molécules de guidage axonal dans le contexte des lésions du système nerveux fait aujourd'hui l'objet d'un nombre grandissant de travaux. Ainsi, plusieurs nouvelles données devraient voir le jour dans les prochaines années dans ce nouveau champ de recherche que l'on commence à peine à défricher. Il sera particulièrement intéressant de clarifier le rôle que joue nétrine-1 dans la rétine adulte et de savoir si elle agit véritablement comme facteur de survie. Il faudra alors déterminer si les niveaux de nétrine-1 sont régulés à la baisse dans les cellules ganglionnaires axotomisées. Dans ce cas, l'injection intra-oculaire de nétrine-1 recombinante pourrait contribuer à diminuer l'apoptose après axotomie.

Quant au rôle potentiel de nétrine-1 comme inhibiteur de la croissance des cellules ganglionnaires adultes *in vivo*, différentes expériences devront être effectuées. L'analyse des capacités régénératives des cellules ganglionnaires chez les souris *Dcc*<sup>-/-</sup> ou *netrin-1*<sup>-/-</sup> est malheureusement impossible puisque ces mutants meurent très tôt après la naissance (Serafini *et al.*, 1996; Fazeli *et al.*, 1997). L'utilisation de souris *netrin-1*<sup>+/-</sup> pourrait cependant s'avérer utile : on pourrait y examiner le potentiel de régénération spontanée après écrasement du nerf optique. La greffe de nerf périphérique est difficilement praticable chez la souris, vu la taille de ce rongeur, mais l'avancement constant des

techniques de microchirurgie laisse espérer qu'elle puisse le devenir bientôt. Il sera alors intéressant de déterminer si les cellules ganglionnaires régénèrent leur axone avec plus de succès chez les souris *netrin-1*<sup>+/-</sup> que chez les souris sauvages.

Chez le rat, des expériences *in vitro* pourraient être effectuées pour savoir si les cellules ganglionnaires adultes sont toujours sensibles à nétrine-1. Des explants de rétine adulte pourraient être mis en culture avec des cellules COS exprimant de la nétrine-1 recombinante. De telles cultures sur gels de collagène devraient permettre de déterminer si les axones s'orientent ou non vers une source de nétrine – ou encore s'ils s'en éloignent. *In vivo*, on pourrait tester l'effet d'une l'injection intraoculaire de nétrine-1 sur la croissance axonale intrarétinienne induite par l'injection de BDNF après lésion du nerf optique (Sawai *et al.*, 1996). De façon similaire, l'application de nétrine-1 au site d'une microlésion du nerf optique combinée à une stratégie stimulatrice de la régénération pourrait mettre en évidence un effet inhibiteur de nétrine-1.

## 5.2 La microlésion du nerf optique : un modèle de choix pour l'étude de la régénération en milieu inhibiteur

Nos travaux montrent que la lésion du nerf optique par écrasement peut être effectuée à l'aide d'un fil à suture. En resserrant celui-ci autour du nerf pendant une minute, toutes les cellules ganglionnaires sont axotomisées, et le site lésionnel qui en résulte est fin et bien délimité. Cette « microlésion » du nerf optique limite la formation du kyste qui résulte habituellement des lésions effectuées avec des pinces, ce qui permet d'observer la réponse neuronale et non-neuronale à l'axotomie dans un environnement où l'œdème est minimal. Ainsi, nous avons pu produire une description histologique

détaillée de l'évolution d'un site de « microécrasement » du nerf optique dans les premières 24 heures et jusqu'à 2 mois après la lésion. D'autre part, la clarté du site de lésion nous a permis de démontrer pour la première fois par marquage antérograde la « rétraction » des axones lésés dans le nerf optique et leur régénération jusqu'à la cicatrice gliale. Cette étude nous a renseigné sur le développement de la cicatrice gliale, mais aussi sur les causes possibles de l'échec régénératif dans le nerf optique adulte.

### **5.2.1 Conclusions sur les composantes cellulaires et moléculaires du site de lésion**

Le modèle le mieux étudié de cicatrice gliale dans le système nerveux central est la lésion pénétrante (Maxwell *et al.*, 1990). Une des caractéristiques de ce modèle, est la disparition rapide des astrocytes à l'épicentre de la lésion. On observe aussi ce déclin après lésion du nerf optique : Berry *et al.* (1988) ont d'abord montré une région GFAP-négative à l'extrémité du tronçon proximal par suite de section, et d'autres groupes ont ensuite décrit une zone GFAP-négative par suite d'écrasement (Blaugrund *et al.*, 1992; Frank et Wolburg, 1996). Frank et Wolburg (1996) ont constaté en microscopie électronique que, dès 7 h après un écrasement, aucun astrocyte intact ne se retrouve au cœur de la lésion. L'apparition graduelle de prolongements astrocytaires au site de lésion, pour former une limitante gliale, n'est détectée qu'à partir du jour 6 (Frank et Wolburg, 1996). Il semble donc clair qu'il n'y a pas d'astrocytes viables à l'épicentre du site de lésion dans les premiers jours suivant un écrasement du nerf optique.

Nous avons confirmé ici l'absence de cellules GFAP-positives 24 h après une lésion par microécrasement. De plus, nous avons montré que la ligne de démarcation du site de lésion est immunopositive pour les CSPG, des molécules qu'on associe

généralement aux astrocytes (McKeon *et al.*, 1991). Si l'on se fie au marquage GFAP, et que cette zone est effectivement dépourvue d'astrocytes, quelle est donc l'origine de ces CSPG? Dans l'article présenté au chapitre 3, nous avons supposé que des astrocytes CSPG-positifs étaient conservés à l'épicentre du site de lésion 24 h après le microécrasement. Selon notre hypothèse d'alors, ces astrocytes, épargnés par l'écrasement, auraient été responsables de la sécrétion de CSPG tout en demeurant GFAP-négatifs. Cependant, il nous apparaît maintenant improbable que des astrocytes situés à l'épicentre de la lésion par écrasement soient les seuls à être épargnés, compte tenu de l'absence de cellules GFAP-positives ou CSPG-positives dans l'espace adjacent à l'épicentre. Quelles sont alors ces cellules que nous avons détectées le long de la ligne marquant le site de lésion sur les coupes colorées à l'hématoxyline? Nous soumettons que l'alignement quasi parfait des cellules détectées le long de la ligne de démarcation indique qu'elles s'y sont rendues par migration. Il pourrait donc s'agir de cellules d'origine sanguine ou méningée. On sait cependant que, dans les modèles de lésions tranchante du cerveau, les fibroblastes méningés – et le dépôt de collagène qui les caractérise – n'apparaissent pas avant le 4<sup>e</sup> jour post-lésion (Berry *et al.*, 1983; Maxwell *et al.*, 1990) alors que l'infiltration des astrocytes ne précède pas l'arrivée de ces fibroblastes (Berry *et al.*, 1983). On suppose en effet que la réaction aiguë à ce type de lésion n'est initialement le fait que des cellules d'origine sanguine (Berry *et al.*, 1983). Si le mécanisme est conservé dans le nerf optique, il faut donc supposer que les cellules alignées vis-à-vis le site de lésion à 24 h soient d'origine sanguine – érythrocytes, neutrophiles, monocytes. La surprise serait alors que ces cellules expriment les CSPG. L'hypothèse alternative que nous envisageons est que les CSPG détectés au site de lésion

proviennent en fait des astrocytes directement touchés par l'écrasement. Quelques heures après un écrasement par pince, des débris d'astrocytes sont détectés à l'épicentre du site de lésion, et en microscopie électronique certains de ces débris conservent leur immunoréactivité à l'égard de la protéine S-100 ou de la vimentine (Frank et Wolburg, 1996). Il est donc possible que les astrocytes directement touchés par l'écrasement soient effectivement détruits, mais libèrent des CSPG au moment de leur destruction, lesquels se lieraient à la matrice extracellulaire (McKeon *et al.*, 1991; Seidenbecher *et al.*, 1995; Asher *et al.*, 2001) et conserveraient ainsi leur immunoréactivité malgré la disparition des astrocytes.

Nous avons montré aussi qu'à deux semaines après la lésion, au moment où les astrocytes GFAP-positifs ont regagné le site de lésion et enveloppé le tissu fibrotique d'une limitante gliale, il subsiste une certaine immunoréactivité aux CSPG, qui semble border l'espace fibrotique le long de la limitante gliale. Ici, l'immunoréactivité pourrait représenter des CSPG déposés activement par les astrocytes de cette limitante gliale, ou encore des CSPG libérés lors de la lésion et associés à la matrice extracellulaire contenus entre la limitante gliale et le tissu fibrotique.

À ce stade post-lésion, le site de microécrasement s'est considérablement désorganisé, comme en témoignent les coupes colorées à l'hématoxyline ou au luxol. Cependant, l'espace occupé par les phagocytes et les fibroblastes reste minimal, si on le compare à celui laissé par une lésion par pincés (Blaugrund *et al.*, 1992; Weibel *et al.*, 1994; Berry *et al.*, 1996; Frank et Wolburg, 1996). Cette comparaison avec les lésions traditionnelles souligne d'ailleurs un détail intéressant : la dimension finale du site de lésion correspond assez fidèlement à celle de la zone GFAP-négative détectée dans les

heures qui suivent la lésion. C'est dans l'espace délimité par cette zone GFAP-négative que pénètrent les phagocytes, ED-1 positifs, puis les fibroblastes méningés, et c'est là où se réalise la néovascularisation. En limitant la largeur de cette zone GFAP-négative initiale on limite donc la dimension finale du site de lésion et de son noyau fibrotique. Or, un site de lésion circonscrit facilite l'étude anatomique des axones et de leur comportement régénératif.

### **5.2.2 Réponse axonale initiale et échec régénératif**

Grâce au marquage antérograde, nous avons suivi la réaction des axones des cellules ganglionnaires après axotomie par microécrasement. Nous avons vu que l'extrémité des axones coupés dégénère rapidement sur une distance de 30 à 200  $\mu\text{m}$ , puis repousse vers la fine ligne marquant le site de lésion. En moins d'une semaine, les axones ont atteint le site de lésion – qui commence à se désorganiser – mais la presque totalité des axones ne parvient pas à pousser plus loin. À huit semaines, seuls quelques axones ont franchi le site lésion. Pour la plupart, ces axones ne repoussent pas dans le cœur du nerf optique, mais plutôt en périphérie, le long de la pie-mère.

Comment expliquer cet échec régénératif des cellules ganglionnaires? Nous avons montré qu'en moins de 24 h des CSPG sont déposés le long de la ligne marquant le site de lésion. À ce stade, les barrières physiques que constitueront la glie limitante, le tissu fibrotique mésenchymateux et les vaisseaux sanguins, ne sont pas encore formées. Quant à la myéline, on ne la détecte pas, au luxol, à moins de 100  $\mu\text{m}$  du site de lésion. Or, les axones, à 24 h, sont clairement arrêtés à la ligne marquant le site de lésion, vis-à-vis une

bande bien définie de CSPG. Il semble donc fort probable que les CSPG jouent un rôle-clé, à ce stade, dans l'arrêt des axones en régénération.

Les axones stagnent ainsi au site de lésion alors que la phase de mort cellulaire n'est pas encore amorcée. Ce n'est donc pas la mort cellulaire qui, initialement, limite la régénération. (Peut-être cette stagnation des axones au contact des CSPG contribue-t-elle au déclenchement de l'apoptose des cellules ganglionnaires?) Enfin, une semaine après la lésion, au moins la moitié des cellules ganglionnaires sont encore vivantes et la presque totalité des axones n'a toujours pas progressé plus loin. Nos colorations au trichrome de Masson, qui mettent en évidence le tissu cicatriciel, et les données des études précédentes après écrasement traditionnel (Frank et Wolburg, 1996) ou lésion pénétrante (Kiernan, 1985; Maxwell *et al.*, 1990; Zeng *et al.*, 1994), montrent qu'à ce stade les phagocytes et les fibroblastes méningés ont déjà envahi le site de lésion et que celui-ci commence donc à se « solidifier ». La majorité des axones est alors sans doute empêtrée dans cette matrice en formation. On voit par contre quelques axones dépasser le site de lésion et avancer dans le nerf. Ceux-ci ne parcourent toutefois pas de longues distances dans la zone où la myéline est encore présente, ce qui souligne le caractère non-permissif de la myéline, et suggère que les molécules inhibitrices associées à la myéline contribuent aussi en partie à l'échec régénératif.

Après deux semaines, la barrière physique est assez bien établie ; le noyau fibrotique, les macrophages, la limitante gliale, les vaisseaux sanguins ont formé un ensemble serré et compact. De plus, la myéline n'a toujours pas été éliminée, même 8 semaines après lésion. Quant aux CSPG, ils ont largement disparus. Ceci contraste avec



les lésions pénétrantes de la moelle épinière, où, 3 mois après lésion, on détecte toujours une importante quantité de CSPG (Davies *et al.*, 1999).

### **5.2.3 Perspectives d'avenir**

Pour résoudre des questions encore ouvertes, comme l'identité des cellules s'alignant le long du site de lésion à 24 h, des études additionnelles seront nécessaires. Il faudra entre autres soumettre des coupes à plusieurs doubles marquages immunohistochimiques, pour permettre de bien distinguer l'origine de toutes les cellules présentes sur le site de microlésion. Un examen encore plus détaillé de l'évolution du site de lésion devrait permettre une meilleure compréhension de la chronologie des événements après une lésion par microécrasement. Par exemple, l'ordre précis d'apparition des différents types de cellules qui contribuent à la formation de la cicatrice. Ou le rapport précis entre les axones en bourgeonnement et la zone CSPG positive durant les premières heures suivant la lésion, et tout au long de la première semaine. Il y aurait également lieu d'identifier les produits de dégradation de la myéline, particulièrement NogoA ou MAG, qui sont peut-être libérés au cœur du site de lésion, malgré l'absence de par le luxol qui suggère une disparition de la myéline.

L'étude morphologique détaillée de la réponse non-neuronale, en situation où une stratégie régénérative est appliquée, serait aussi intéressante. Berry (1996) a suggéré que la formation du noyau fibrotique et de la cicatrice en général est considérablement réduite lorsque les axones des cellules ganglionnaires parviennent à régénérer en grand nombre. L'utilisation de notre modèle pourrait faciliter l'étude de cette question, vu le caractère circonscrit du site de lésion et l'absence de kyste.

### 5.3 Un vaccin pour contrecarrer l'échec régénératif dans le nerf optique : mécanismes possibles

Nos travaux ont montré qu'il est possible de stimuler, à l'aide d'un vaccin, la régénération axonale dans le nerf optique adulte. En effet, nous avons démontré, par marquage antérograde des axones, que l'injection répétée d'homogénat de moelle épinière (HME) encourage la régénération des cellules ganglionnaires après microlésion du nerf optique. Nous avons, au départ, émis l'hypothèse que l'efficacité de ce vaccin reposait sur la production d'anticorps dirigés contre les protéines inhibitrices de la croissance. Or, nos travaux ont montrés que, malgré la hausse générale d'anticorps sériques remarquée chez les animaux vaccinés, aucun anticorps contre des protéines inhibitrices connues n'avaient été produit. Nous avons cependant détecté des anticorps contre la protéine basique de la myéline (MBP), une des protéines principales de la myéline. De plus, nos expériences en culture de cellules ont montré que les anticorps sériques des animaux vaccinés doivent se lier à la myéline pour stimuler la croissance neuritique. Nos résultats suggèrent donc que ce ne sont pas des anticorps contre les protéines inhibitrices qui sont responsables de l'effet positif du vaccin sur la régénération, mais plutôt des anticorps contre les protéines myéliniques plus abondantes.

Schwartz et collaborateurs ont montré récemment qu'un vaccin à base de peptides dérivés de la myéline favorisait la survie des cellules ganglionnaires après lésion du nerf optique (Fisher *et al.*, 2001), et que cet effet mettait en jeu les lymphocytes T (LT). Le protocole de vaccination que nous avons choisi a cependant été développé à l'origine pour désensibiliser les LT réactifs aux molécules de la moelle épinière (Alvord *et al.*,

1965). De plus, nous avons montré que notre vaccin ne stimule pas la survie des cellules ganglionnaires axotomisées. L'effet que nous observons sur la régénération n'est donc pas la conséquence d'une plus grande survie cellulaire dans la rétine, même si l'influence des LT demeure envisageable. La distinction entre les deux types d'effet nous a amené à réfléchir sur la relation entre la survie cellulaire et la régénération axonale.

### **5.3.1 Efficacité d'une approche par vaccin pour stimuler la régénération axonale : rôle des anticorps**

Nous avons vu que deux semaines après lésion, les animaux vaccinés avec HME avaient régénéré de nombreux axones au-delà du site de lésion. Une telle régénération n'était pas observée chez les rats témoins, vaccinés avec un homogénat de foie (HF). L'analyse quantitative de la régénération, effectuée par comptage du nombre d'axones présents à différentes distances au-delà du site de lésion, a montré un effet significatif du vaccin avec HME avec une repousse axonale s'étendant jusqu'à 250  $\mu\text{m}$ . La mesure du plus long axone marqué chez chaque animal, a révélé que ces axones avaient, en moyenne, régénéré presque deux fois plus loin chez les animaux HME que chez les HF.

Comment explique-t-on l'effet du vaccin d'HME sur la régénération axonale des cellules ganglionnaires? L'hypothèse de départ voulait que le traitement à l'HME, connu pour stimuler la production d'anticorps polyréactifs remyélinisants (Miller *et al.*, 1994; Asakura *et al.*, 1996), puisse aussi générer la production d'anticorps capables d'inactiver les protéines inhibitrices de la croissance. Il était déjà reconnu que l'utilisation d'anticorps pour stimuler la régénération était une approche valable : IN-1 avait été utilisé pour stimuler la régénération tant dans le nerf optique que dans la moelle épinière (pour revue, *cf.* Huber et Schwab, 2000). L'évaluation initiale d'une approche par vaccin avait

montré chez la souris (Huang *et al.*, 1999) qu'un vaccin d'HME pouvait promouvoir la régénération après lésion de la moelle épinière. Le vaccin semblait entraîner une élévation des niveaux d'anticorps pouvant se lier, *in vitro* et *in vivo*, aux protéines de la myéline, et des neurones corticaux mis en culture sur un substrat inhibiteur constitué de myéline, parvenaient à élaborer des neurites lorsque le substrat était d'abord incubé avec le sérum d'animaux vaccinés – un effet que nous avons confirmé ici chez les cellules ganglionnaires. C'est ce qui laisse croire que l'effet du vaccin sur la régénération est dû à la production d'anticorps dirigés contre les protéines inhibitrices. Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par des résultats antérieurs ayant montré une réponse régénérative accrue après section du fornix chez des rats traités avec des anticorps polyclonaux de lapins produits contre un homogénat de cerveau de rat lésé (Geisert et Alley, 1985).

Les travaux que nous présentons ici ont tenté de vérifier cette hypothèse. À cette fin, nous avons d'abord déterminé si la vaccination avec HME provoquait chez le rat une hausse de concentration sérique d'IgG et d'IgM. Des prélèvements sanguins effectués chez un groupe de rat tout au cours du régime d'immunisation, ont permis de constater par ELISA, que les niveaux d'immunoglobulines augmentaient graduellement. Nous avons alors entrepris de tester si le sérum de ces rats vaccinés contenait des anticorps dirigés contre des molécules inhibitrices connues. Ainsi, nous avons fait migrer sur gel d'acrylamide des préparations purifiées de MAG, de NogoA et de CSPG, ou encore un extrait de moelle épinière complète et après transfert sur nitrocellulose, nous les avons incubé avec des sérums de rats vaccinés. Au moyen d'anticorps secondaires dirigés contre les IgG ou les IgM de rat, nous pouvions détecter les anticorps des sérums qui se seraient liés aux molécules inhibitrices. Or, même si certains anticorps se sont liés à des protéines

des extraits de moelle épinière complète, nous n'avons dans aucun cas détecté des anticorps se liant à MAG, NogoA ou aux CSPG. Puisque les IgG et les IgM polyclonales, générées par notre régime de vaccination auraient pu ne pas se lier à certains épitopes lorsque ceux-ci sont soumis à l'électrophorèse en conditions dénaturantes, nous avons testé les sérums avec les molécules inhibitrices en conditions non-dénaturantes/non-réductrices, soit par électrophorèse sans SDS ni  $\beta$ -mercaptoéthanol, soit par ELISA. Dans ce cas encore, aucun anticorps, ni IgG ni IgM, ne s'est lié aux molécules inhibitrices. Bien que nous ne puissions exclure que le vaccin agisse sur d'autres molécules inhibitrices non encore caractérisées, ces résultats suggèrent que l'effet du vaccin sur la régénération axonale n'est pas attribuable à la production d'anticorps dirigés contre les molécules inhibitrices de la croissance axonale.

Comment les anticorps pourraient-ils alors stimuler la régénération? Puisque l'HME que nous avons utilisé pour le vaccin ne contient pas uniquement de la myéline mais aussi des neurones, il est possible que des anticorps aient été produits contre les récepteurs des molécules inhibitrices. Seule la structure du récepteur de NogoA, NgR, est connue jusqu'à maintenant. Lorsque nous avons examiné le sérum des rats vaccinés tant en conditions dénaturantes que non-dénaturantes, aucun anticorps contre NgR n'y a été détecté. Peut-être le vaccin n'agit-il pas en bloquant les médiateurs de l'inhibition, mais plutôt en stimulant la croissance directement au niveau de l'axone? Les récepteurs neuronaux sont souvent glycosylés, et donc très immunogènes. Un vaccin élaboré à partir de tissu neuronal pourrait ainsi stimuler la production d'anticorps agissant comme ligands. Ces anticorps pourraient, par exemple, encourager la dimérisation de récepteurs à tyrosine kinase et stimuler ainsi la croissance axonale. Des études récentes ont montré que

l'application d'anticorps IN-1 pouvait induire l'expression de gènes associés à la croissance dans des neurones adultes dont l'axone est intact (Zagrebelsky *et al.*, 1998). Dans ces même neurones non-lésés, l'application d'IN-1 stimulait aussi le bourgeonnement de petites collatérales (Buffo *et al.*, 2000), ce qui suggère que les anticorps peuvent agir directement sur les axones pour stimuler leur croissance. Cependant, nos travaux *in vitro* ont montré que le fait de pré-incuber les cellules ganglionnaires avec le sérum d'animaux vaccinés n'est pas suffisant pour stimuler la croissance neuritique sur un substrat de myéline. Il semble donc que les anticorps doivent se lier à la myéline avant de se lier aux neurones. De plus, nous avons montré qu'en exposant le substrat aux sérums avant d'y déposer les cellules, on contrecarre l'effet inhibiteur de la myéline mais pas celui des CSPG. Or, si les anticorps agissaient directement sur les neurones, on se serait attendu à ce que le sérum des animaux vaccinés bloque l'inhibition de façon analogue sur les deux types de substrat.

Bien que le vaccin d'HME n'ait pas stimulé la production d'anticorps contre les protéines inhibitrices, il a stimulé chez certains rats la production d'anticorps contre MBP. Ce qui s'explique facilement, du fait que dans la myéline, cette protéine est beaucoup plus abondante que Nogo ou MAG. Il est donc possible que ce soit plutôt les anticorps dirigés contre les protéines principales de la myéline qui stimulent la régénération. Ces anticorps pourraient se lier à la myéline pour ensuite agir sur les neurones via des récepteurs membranaires et stimuler activement la croissance. Autrement, les anticorps liés à la myéline pourraient simplement créer un substrat artificiel plus permissif que l'environnement natif. Toutefois, nous avons constaté que, chez les animaux vaccinés avec HF, autant d'immunoglobulines étaient détectées dans la

matrice du nerf optique que chez les animaux vaccinés avec HME. En effet, peu importe le traitement, une grande quantité d'anticorps pénètre le nerf optique lésé, et y est retenue. On ne peut donc invoquer une modification globale du substrat pour expliquer le plus grand succès régénératif chez les animaux traités avec HME.

Nous avons montré qu'un vaccin d'HME favorise la croissance axonale au-delà du site de lésion mais que seulement quelques axones se sont régénérés sur de longues distances. La longueur moyenne de ces axones, chez les animaux traités à l'HME, est d'environ 1 mm, une distance qui correspond à l'étendue de l'infiltration d'immunoglobuline que nous avons détectée. Ce pourrait être la faible perméabilité des vaisseaux du nerf optique, loin de l'épicentre du site de lésion, qui, en limitant l'exsudation des anticorps, limite aussi la portée de leurs effets. Par contre, au cours de ce travail, nous avons aussi mesuré la régénération axonale deux semaines après lésion, à un stade où la barrière est encore perméable. Or, il est connu que la perméabilité du nerf optique après lésion ne persiste que durant quelques semaines et se résorbe graduellement entre la 2<sup>e</sup> et la 4<sup>e</sup> semaine (Kiernan, 1985). Il serait intéressant de tester le vaccin en combinaison avec à un traitement visant à perméabiliser plus longtemps, localement, la barrière hématoencéphalique.

Le succès limité de la régénération axonale stimulée par notre vaccin peut aussi s'expliquer par le faible nombre des cellules ganglionnaires soumises au traitement. En effet, nous avons montré que, deux semaines après microlésion du nerf optique, seul 10% des neurones sont encore en vie, et que cette mort cellulaire n'est pas réduite par notre vaccin.

### **5.3.2 Comparaison des méthodes de vaccination : lymphocytes T et survie cellulaire**

L'idée qu'un vaccin d'HME puisse avoir des effets neuroprotecteurs, donc favoriser la survie des cellules ganglionnaires après lésion du nerf optique, vient des travaux du groupe de Schwartz. Depuis plusieurs années, ces auteurs se sont penchés sur le rôle potentiellement bénéfique d'une réaction auto-immune après lésion dans le système nerveux central, particulièrement dans le nerf optique (pour revue, *cf.* Schwartz et Moalem, 2001). En activant *in vitro* des LT réactifs à la protéine basique de la myéline (MBP) injecté ensuite chez des animaux ayant subi une lésion partielle du nerf optique, ils ont constaté que, malgré leur potentiel encéphalitique, ces LT pouvaient limiter la dégénérescence secondaire, c'est-à-dire restreindre la destruction graduelle des neurones et axones initialement épargnés (Moalem *et al.*, 1999). Les mêmes auteurs se sont intéressés à la survie des cellules ganglionnaires après axotomie complète. Cette fois, un protocole d'immunisation active classique (c'est-à-dire une injection et un rappel 1 semaine plus tard) avec des peptides myéliniques non-encéphalitogènes émulsifiés dans un adjuvant additionné de mycobactéries a permis d'améliorer, quoique légèrement, le taux de survie deux semaines après lésion (*cf.* Tableau I, p.30; Fisher *et al.*, 2001). Contrairement aux expériences n'impliquant que le transfert de LT – une méthode d'immunisation passive – l'immunisation active par injection de peptides myéliniques peut, en principe, affecter la survie cellulaire, soit par une réaction dite cellulaire, prise en charge par les LT, soit par une réaction humorale, prise en charge par les anticorps. Cependant, le fait que des LT MBP-spécifiques s'accumulent au site de lésion après immunisation passive ou active (Hirschberg *et al.*, 1998; Moalem *et al.*, 1999), et que le



transfert de LT soit neuroprotecteur en lui-même (Moalem *et al.*, 1999), suggèrent que l'effet observé après injection de peptides myéliniques est attribuable aux LT. D'autant plus que, dans des expériences effectuées dans la moelle épinière, l'effet neuroprotecteur de l'immunisation active avec MBP a pu être reproduit par transfert de LT MBP-spécifiques, mais non par transfert d'anticorps (Hauben *et al.*, 2000). Enfin, une autre étude récente a rapporté que, chez le rat thymectomisé à la naissance, donc dépourvu de LT matures, la survie des cellules ganglionnaires après lésion partielle du nerf optique est significativement plus faible que chez le rat normal. De plus, chez la souris surexprimant le récepteur de LT MBP-spécifique, la survie des cellules ganglionnaires est plus élevée que chez la souris sauvage (Yoles *et al.*, 2001). Toutes ces données suggèrent donc que les LT puissent contribuer à réduire la dégénérescence secondaire après lésion partielle, et vraisemblablement augmenter la survie neuronale après axotomie complète. Cependant, on ne comprend pas encore très bien par quel mécanisme les LT parviennent à réduire la dégénérescence des neurones lésés. Pour ce qui est de la survie neuronale, il a été proposé que les LT MBP-spécifiques exercent leur effet en diminuant temporairement l'activité électrique des neurones lésés (Moalem *et al.*, 1999), ou encore en sécrétant les neurotrophines NGF, NT-3, NT-4/5 et BDNF au contact de leur antigène (Moalem *et al.*, 2000).

Notre vaccin, en revanche, a été développé pour désensibiliser les LT spécifiques aux auto-antigènes de la myéline et du système nerveux central en général. En effet, Alvord *et al.* (1965) étaient parvenus à supprimer l'EAE par une méthode d'immunisation exposant les LT myéline-spécifiques à des doses massives d'antigène, grâce à l'injection répétée durant plusieurs semaines d'un extrait de moelle épinière complète, ou d'un

extrait de MBP, dans une émulsion d'adjuvant exempte de mycobactérie. Ces auteurs ont démontré que ce protocole de vaccination entraîne une hausse soutenue d'anticorps dans le sérum (Alvord *et al.*, 1965; Lisak *et al.*, 1970); cependant, ce ne sont pas les anticorps qui préviennent l'EAE (Lisak *et al.*, 1970; Coates *et al.*, 1974), mais bien la désensibilisation des LT (Marusic et Tonegawa, 1997). Le mécanisme de cette désensibilisation fait encore l'objet de nombreuses recherches aujourd'hui, vu ses implications possibles pour le traitement des maladies auto-immunes (pour revue, *cf.* Harrison et Hafler, 2000). Si, comme le suggèrent les travaux de Schwartz, l'effet neuroprotecteur des LT dépend au départ du même type d'activation que celui qui amène certains LT à causer l'EAE (Moalem *et al.*, 1999; Hauben *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2001), il n'est pas surprenant que notre vaccin, qui freine cette activation, ne favorise pas la survie neuronale.

On connaît mal la relation entre la survie neuronale et la régénération axonale (Goldberg et Barres, 2000). Cependant, plusieurs études suggèrent qu'il s'agit de phénomènes bien distincts. Assurer la survie du neurone ne semble pas suffisant pour stimuler la régénération axonale, alors qu'inversement, la régénération des axones ne favorise pas nécessairement la survie neuronale. Par exemple, chez la souris surexprimant le gène anti-apoptotique *bcl-2*, la remarquable survie des cellules ganglionnaires après axotomie n'améliore pas leurs capacités régénératives (Chierzi *et al.*, 1999). Par ailleurs, chez les rats dont la survie des cellules ganglionnaires est prolongée par des injections intraoculaires de BDNF, le nombre d'axones parvenant à régénérer dans un greffon de nerf périphérique n'est pas augmenté (Mansour-Robaey *et al.*, 1994; Klocker *et al.*, 2001). Dans ce dernier cas, cependant, on sait que l'injection de BDNF favorise la

croissance des axones à l'intérieur de la rétine (Sawai *et al.*, 1996). En conséquence, il pourrait ne pas être avantageux pour les axones de quitter l'œil vers le greffon. Ce résultat ne permet donc pas d'exclure qu'un traitement neuroprotecteur, qui n'encourage pas à lui seul la régénération, puisse néanmoins permettre à une stratégie purement régénérative d'augmenter son rendement. De telles approches « combinées » n'ont pas encore été bien étudiées. Il serait intéressant de déterminer si notre vaccin, qui à lui seul n'encourage pas la survie, pourrait stimuler la régénération d'un plus grand nombre de cellules ganglionnaires lorsque administré en combinaison avec des agents neuroprotecteurs.

### **5.3.3 Perspectives d'avenir**

L'ensemble des données que nous avons présentées au sujet du vaccin montrent que son effet pro-régénératif sur les axones n'est pas accompagné d'effet neuroprotecteur, ce qui suggère qu'il n'induit pas le même type d'activation des LT que celui de Schwartz (Moalem *et al.*, 1999, 2000; Fisher *et al.*, 2001). Il n'est pas exclu, cependant, qu'un autre type de réaction des LT ait un rôle à jouer dans l'effet régénératif. À cet égard, on pourrait chercher à savoir si l'effet du vaccin s'exerce sur les ganglions lymphatiques, en modulant la réaction humorale, où directement sur le nerf optique, après extravasation des LT dans les jours qui suivent la lésion. Quant aux anticorps, nos travaux suggèrent qu'ils jouent un rôle-clé dans l'effet pro-régénératif du vaccin puisqu'ils encouragent, *in vitro*, la croissance neuritique sur substrat inhibiteur. Cependant, ces anticorps ne semblent pas agir en inactivant directement les molécules inhibitrices de la croissance, mais plutôt en se liant aux protéines les plus abondantes de la myéline. Quant à la preuve directe de l'implication des anticorps *in vivo*, elle reste tributaire des expériences d'immunisation

passive, avec transfert de sérum, laquelle devra favoriser, à elle seule, la régénération des cellules ganglionnaires. Enfin, l'élucidation du mécanisme d'action de notre vaccin pro-régénératif pourrait mettre en évidence des molécules à cibler plus spécifiquement par un vaccin préventif ou par des d'anticorps injectés au site de lésion.

Par ailleurs, l'utilisation d'une double stratégie qui combinerait le vaccin à l'administration locale d'agents antiapoptotiques pourrait répondre à des questions intéressantes sur le lien entre survie cellulaire et régénération. Nous n'avons pu reproduire ici l'effet antiapoptotique de l'ATA rapporté par Heiduschka *et al.* (2000) (*cf.* Appendice I), mais notre vaccin pourrait être combiné à d'autres inhibiteurs de l'apoptose, comme les inhibiteurs de caspases ou de la MAP kinase p38 (*cf.* Tableau I, p.30). L'utilisation d'agents purement anti-apoptotiques, non-impliqués dans la signalisation de la croissance permettrait aussi de savoir si la survie des cellules ganglionnaires est suffisante pour favoriser la régénération axonale dans le nerf optique, ou si elle doit nécessairement être associée à une stratégie pro-régénérative. À cette fin, les inhibiteurs de p38 ne seraient peut-être pas les meilleurs outils; en effet, outre son rôle dans l'apoptose (Kikuchi *et al.*, 2000; Harper et LoGrasso, 2001), p38 a aussi été impliquée dans la différenciation neuronale et à la croissance neuritique (Morooka et Nishida, 1998; Iwasaki *et al.*, 1999). Cependant, plusieurs autres inhibiteurs d'apoptose ont été décrits (pour revue, *cf.* Ekert *et al.*, 1999; Leist et Jaattela, 2001), et leur efficacité *in vivo* sur les cellules ganglionnaires axotomisée ne demande qu'à être testée.

## 5.4 Conclusions générales

L'échec régénératif dans le système nerveux central a fait l'objet de nombreuses études depuis le début du siècle dernier. Toutefois, le développement d'approches prometteuses pour contrecarrer cet échec est tout récent. Ce nouvel essor est dû, en partie, à l'avènement des techniques modernes de la biologie moléculaire et cellulaire, mais surtout à l'avancement de nos connaissances sur l'ontogenèse du système nerveux. En effet, c'est grâce à une meilleure compréhension des facteurs impliqués dans le développement des neurones que la plupart des traitements actuels appliqués aux neurones adultes ont vu le jour. C'est dans cet esprit que nous avons entrepris les travaux réunis dans cette thèse. La découverte récente des nétrines, une famille de molécules permettant le guidage des axones en développement nous a incités à étudier leur rôle possible dans la régénération des axones adultes. Notre hypothèse de départ était que les nétrines puissent contribuer au guidage des axones rétiniens lors de leur régénération vers un greffon de nerf périphérique, en accord avec leur rôle présumé lors du développement du nerf optique. Nous avons pu montrer, au cours de ces travaux, que nétrine-1 et ses récepteurs Dcc et UNC5H2 sont en effet exprimés dans la rétine et le nerf optique adulte, suggérant que ces molécules continuent de jouer un rôle chez l'adulte. Cependant, l'étude de leur expression après axotomie et lors de la régénération nous laisse croire que nétrine-1 ne stimule pas la régénération des cellules ganglionnaires dans un greffon de nerf périphérique. En fait, il est même possible que nétrine-1 puisse agir comme inhibiteur de la régénération de ces cellules.

La deuxième étude présentée dans cette thèse a eu recours à un modèle de lésion du nerf optique différent de l'approche traditionnelle par écrasement avec des pinces. Il était connu que les lésions par écrasement entraînent la formation d'un important noyau fibrotique qui ne permet pas d'évaluer avec précision la distance parcourue par des axones en régénération. C'est pour cette raison que nous avons développé un nouveau modèle de « microécrasement » du nerf optique, à l'aide d'un fil à suture de microchirurgie, lequel axotomise tous les axones mais crée un site de lésion aux limites anatomiques bien définies. De cette manière, nous avons pu en savoir plus sur l'évolution de la cicatrice gliale au niveau du site de lésion, sur la réaction régénérative initiale des axones coupés, et sur les raisons probables de leur échec régénératif. Nous avons montré, notamment, que les inhibiteurs de type CSPG sont présents dès 24 h au site de lésion, avant même que le noyau fibrotique ne s'y développe et n'y constitue une barrière physique à la régénération. Assez tôt donc, pour être responsables de l'inhibition des axones qui semblent par ailleurs capables de régénération. Ces études soulignent l'importance de traitements qui seraient effectués très tôt après lésion.

Enfin, nous avons évalué une nouvelle approche régénérative dans le système nerveux central : un vaccin encourageant la régénération axonale via une réaction auto-immune. Cette réaction, bénéfique, n'est pas démyélinisante. Ce vaccin désensibilise les LT responsable de la démyélinisation et entraîne la production d'anticorps. Notre hypothèse initiale voulait que ce soit ces anticorps qui stimulent la régénération en bloquant les molécules inhibitrices de la croissance. Cependant, après analyse du sérum des animaux vaccinées, aucun anticorps contre des molécules inhibitrices connues n'a été détecté. Ce travail a permis de conclure qu'un mécanisme autre que l'inactivation directe

de ces molécules est responsable de la stimulation de la régénération par le vaccin, et que ce mécanisme dépend vraisemblablement d'une interaction entre les anticorps et la myéline.

Toutes ces études ont porté sur la rétine et le nerf optique en tant que modèle expérimental pour l'examen des capacités régénératives des neurones adultes dans le système nerveux central. Nos observations sur les réactions non-neurales après microlésion du nerf optique, et sur l'expression chez l'adulte du système nétrine-1/DCC/UNC5H2 ont contribué à une meilleure connaissance de ce modèle, et pourront servir de base à l'élaboration de nouvelles stratégies régénératives. Nous avons aussi montré l'efficacité d'une approche par vaccin pour stimuler la régénération des cellules ganglionnaires; les résultats obtenus constituent une importante preuve de principe et confirment le grand potentiel de ce type d'approche. Enfin, ce vaccin promet d'être un intéressant outil expérimental pour étudier les interactions – encore aujourd'hui mal comprises – entre survie cellulaire et régénération axonale.

## **6 BIBLIOGRAPHIE**



- Aguayo, A. J. (1985) Axonal regeneration from injured neurons in the adult mammalian central nervous system. In C. W. Cotman (Ed.), *Synaptic Plasticity*, pp. 457-484. Guilford Press, New York.
- Aguayo, A. J., Rasminsky, M., Bray, G. M., Carbonetto, S., McKerracher, L., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., et Carter, D. A. (1991) Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Phil Trans R Soc Lond B* **331**, 337-343.
- Ahmed, A. K., Guison, N. G., et Yamadori, T. (1996) A retrograde fluorescent-labeling study of direct relationship between the limbic (anterodorsal and anteroventral thalamic nuclei) and the visual system in the albino rat. *Brain Res* **729**, 119-23.
- Alvord, E. C., Shaw, C.-M., Hruby, S., et Kies, M. W. (1965) Encephalitogen-induced inhibition of experimental allergic encephalomyelitis: prevention, suppression and therapy. *Ann N Y Acad Sci* **122**, 333-345.
- Asakura, K., Pogulis, R. J., Pease, L. R., et Rodriguez, M. (1996) A monoclonal autoantibody which promotes central nervous system remyelination is highly polyreactive to multiple known and novel antigens. *J Neuroimmunol* **65**, 11-9.
- Asher, R. A., Morgenstern, D. A., Moon, L. D., et Fawcett, J. W. (2001) Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Prog Brain Res* **132**, 611-9.
- Aviles-Trigueros, M., Sauve, Y., Lund, R. D., et Vidal-Sanz, M. (2000) Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts in adult rats. *J Neurosci* **20**, 361-74.
- Bandtlow, C. E., et Loschinger, J. (1997) Developmental changes in neuronal responsiveness to the CNS myelin-associated neurite growth inhibitor NI-35/250. *Eur J Neurosci* **9**, 2743-52.
- Barnard, J. W., et Carpenter, W. (1950) Lack of regeneration in spinal cord of rat. *J Neurophysiol* **13**, 223-228.

- Barron, K. D., Dentinger, M. P., Krohel, G., Easton, S. K., et Mankes, R. (1986) Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer of rat after intraorbital optic nerve crush. *J Neurocytol* **15**, 345-62.
- Bartsch, U., Bandtlow, C. E., Schnell, L., Bartsch, S., Spillmann, A. A., Rubin, B. P., Hillenbrand, R., Montag, D., Schwab, M. E., et Schachner, M. (1995) Lack of evidence that myelin-associated glycoprotein is a major inhibitor of axonal regeneration in the CNS. *Neuron* **15**, 1375-1381.
- Bartsch, U., Kirchhoff, F., et Schachner, M. (1989) Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM, and MAG in the developing and adult optic nerve of mice. *J Comp Neurol* **284**, 451-62.
- Bastiani, M., Pearson, K. G., et Goodman, C. S. (1984) From embryonic fascicles to adult tracts: organization of neuropile from a developmental perspective. *J Exp Biol* **112**, 45-64.
- Bastiani, M. J., Harrelson, A. L., Snow, P. M., et Goodman, C. S. (1987) Expression of fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper. *Cell* **48**, 745-55.
- Bates, C. A., et Meyer, R. L. (1997) The neurite-promoting effect of laminin is mediated by different mechanisms in embryonic and adult regenerating mouse optic axons in vitro. *Dev Biol* **181**, 91-101.
- Batistatou, A., Volonte, C., et Greene, L. A. (1992) Nerve growth factor employs multiple pathways to induce primary response genes in PC12 cells. *Mol Biol Cell* **3**, 363-71.
- Beattie, M. S., Bresnahan, J.C., Komn, J., Tovar, C.A., Van Meter, M., Anderson, D.K., Faden, A.I., Hsu, C.Y., Noble, L.J., Salzman, S., Young, W. (1997) Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Expt Neurol* **148**, 453-463.
- Benfey, M., et Aguayo, A. J. (1982) Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. *Nature* **296**, 150-2.

- Benowitz, L. I., Goldberg, D. E., Madsen, J. R., Soni, D., et Irwin, N. (1999) Inosine stimulates extensive axon collateral growth in the rat corticospinal tract after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13486-90.
- Benowitz, L. I., Jing, Y., Tabibiazar, R., Jo, S. A., Petrausch, B., Stuermer, C. A., Rosenberg, P. A., et Irwin, N. (1998) Axon outgrowth is regulated by an intracellular purine-sensitive mechanism in retinal ganglion cells. *J Biol Chem* **273**, 29626-34.
- Benowitz, L. I., et Routtenberg, A. (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* **20**, 84-91.
- Berardi, N., Domenici, L., Gravina, A., et Maffei, L. (1990) Pattern ERG in rats following section of the optic nerve. *Exp Brain Res* **79**, 539-46.
- Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., et Aguayo, A. J. (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* **14**, 4368.
- Berry, M. (1982) Post-injury myelin-breakdown products inhibit axonal growth: an hypothesis to explain the failure of axonal regeneration in the mammalian nervous system. *Bibliotheca Anatomica* **23**, 1-11.
- Berry, M., Carlile, J., et 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**, 147-70.
- Berry, M., Carlile, J., Hunter, A., Tsang, W., Rosustrel, P., et Sievers, J. (1999) Optic nerve regeneration after intravitreal peripheral nerve implants: trajectories of axons regrowing through the optic chiasm into the optic tracts. *J Neurocytol* **28**, 721-41.
- Berry, M., Hall, S., Follows, R., Rees, L., Gregson, N., et Sievers, J. (1988) Response of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts. *Journal of Neurocytology* **17**, 727-744.

- Berry, M., Maxwell, W. L., Logan, A., Mathewson, A., McConnell, P., Ashhurst, D. E., et Thomas, G. H. (1983) Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochir Suppl* **32**, 31-53.
- Bisby, M. A., et Tetzlaff, W. (1992) Changes in cytoskeletal protein synthesis following axon injury and during axon regeneration. *Molecular Neurobiology* **6**, 107.
- Blaugrund, E., Cohen, L.I., Solomon, A., Schreyer, D.J., Schwartz, M. (1993) Axonal regeneration is associated with glial migration: comparison between the injured optic nerves of fish and rats. *J Comp Neurol* **330**, 105-112.
- Blaugrund, E., Duvdevani, R., Lavie, V., Solomon, A., et Schwartz, M. (1992) Disappearance of astrocytes and invasion of macrophages following crush injury of adult rodent optic nerves: implications for regeneration. *Exp Neurol* **118**, 105-15.
- Bray, G. M., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., et Aguayo, A. J. (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.
- Breasted, J. H. (1930) *The Edwin Surgical Papyrus*. University of Chicago Press, Chicago.
- Bregman, B., Kunkeel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H. N., Gao, D., et Schwab, M. E. (1995) Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* **378**, 498-501.
- Bregman, B. S., Kunkel-Bagden, E., Reier, P. J., Dai, H. N., McAtee, M., et Gao, D. (1993) Recovery of function after spinal cord injury: mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. *Exp Neurol* **123**, 3-16.
- Brittis, P. A., Canning, D. R., et Silver, J. (1992) Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science* **255**, 733-736.

- Brittis, P. A., et Silver, J. (1995) Multiple factors govern intraretinal axon guidance: a time-lapse study. *Mol Cell Neurosci* **6**, 413-32.
- Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., et Kidd, T. (1999) Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**, 795-806.
- Brown, J. O., et McCouch, G. P. (1947) Abortive regeneration of the transected spinal cord. *J Comp Neurol* **87**, 131-137.
- Brown, M. C., Lunn, E. R., et Perry, V. H. (1992) Consequences of slow Wallerian degeneration for regenerating motor and sensory axons. *J Neurobiol* **23**, 521-36.
- Buffo, A., Zagrebelsky, M., Huber, A. B., Skerra, A., Schwab, M. E., Strata, P., et Rossi, F. (2000) Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured purkinje cell axons. *J Neurosci* **20**, 2275-86.
- Bunt, A. H., Lund, R. D., et Lund, J. S. (1974) Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase by ganglion cells of the albino rat retina. *Brain Res* **73**, 215-28.
- Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B. S., et Filbin, M. T. (2001) Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci* **21**, 4731-9.
- Cai, D., Shen, Y., DeBellard, M. E., Tang, S., et Filbin, M. T. (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* **22**, 89-101.
- Campbell, G., Holt, J. K., Shotton, H. R., Anderson, P. N., Bavetta, S., et Lieberman, A. R. (1999) Spontaneous axonal regeneration after optic nerve injury in adult rat. *Neuroreport* **10**, 3955-60.
- Carmignoto, G., Maffei, L., Candeo, P., Canella, R., et Comelli, C. (1989) Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *Journal of Neuroscience* **9**, 1263.

- Caroni, P., et 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., et 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.
- Carpenter, P., Sefton, A. J., Dreher, B., et Lim, W. L. (1986) Role of target tissue in regulating the development of retinal ganglion cells in the albino rat: effects of kainate lesions in the superior colliculus. *J Comp Neurol* **251**, 240-59.
- Carter, B. D., Zirrgiebel, U., et Barde, Y. A. (1995) Differential regulation of p21ras activation in neurons by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* **270**, 21751-7.
- Carter, D. A., Bray, G. M., et Aguayo, A. J. (1989) Regenerated retinal ganglion cell axons can form well-differentiated synapses in the superior colliculus of adult hamsters. *J Neurosci* **9**, 4042-50.
- Cenni, M. C., Bonfanti, L., Martinou, J. C., Ratto, G. M., Strettoi, E., et Maffei, L. (1996) Long-term survival of retinal ganglion cells following optic nerve section in adult bcl-2 transgenic mice. *Eur J Neurosci* **8**, 1735-45.
- Chen, M. S., Huber, A. B., van der Haar, M. E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F., et Schwab, M. E. (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1 [see comments]. *Nature* **403**, 434-9.
- Chen, S., et Bisby, M. A. (1993) Impaired motor axon regeneration in the C57BL/Ola mouse. *J Comp Neurol* **333**, 449-54.
- Chierzi, S., Strettoi, E., Cenni, M. C., et Maffei, L. (1999) Optic nerve crush: axonal responses in wild-type and bcl-2 transgenic mice. *J Neurosci* **19**, 8367-76.
- Choi, D. W. (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* **23**, 1261-76.

- Clarke, D. B., Bray, G. M., et Aguayo, A. J. (1998) Prolonged administration of NT-4/5 fails to rescue most axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *Vision Res* **38**, 1517-24.
- Clemente, C. D. (1955) Structural regeneration in the mammalian nervous system and the role of neuroglia and connective tissue. In W. F. Windle (Ed.), *Regeneration in the central nervous system*, pp. 147-161. Thomas, Springfield, IL.
- Coates, A., Mackay, I. R., et Crawford, M. (1974) Immune protection against experimental autoimmune encephalomyelitis: optimal conditions and analysis of mechanism. *Cell Immunol* **12**, 370-81.
- Cohen, A. H., Mackler, S. A., et Selzer, M. E. (1988) Behavioral recovery following spinal transection: functional regeneration in the lamprey CNS. *Trends Neurosci* **11**, 227-31.
- Cohen, G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326**, 1-16.
- Cohen, J., Burne, J. F., Winter, J., et Bartlett, P. (1986) Retinal ganglion cells lose response to laminin with maturation. *Nature* **322**, 465-7.
- Cohen-Cory, S., et Fraser, S. E. (1994) BDNF in the development of the visual system of *Xenopus*. *Neuron* **12**, 747-761.
- Colamarino, S. A., et Tessier-Lavigne, M. (1995) The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* **81**, 621-9.
- Colavita, A., et Culotti, J. G. (1998) Suppressors of ectopic UNC-5 growth cone steering identify eight genes involved in axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **194**, 72-85.
- Cornbrooks, C. J., Carey, D. J., McDonald, J. A., Timpl, R., et Bunge, R. P. (1983) In vivo and in vitro observations on laminin production by Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 3850-4.

- Cui, Q., et Harvey, A. R. (1995) At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats. *J Neurosci* **15**, 8143-55.
- Cui, Q., Lu, Q., So, K. F., et Yip, H. K. (1999) CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 760-6.
- Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W., et Greenberg, M. E. (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* **103**, 945-56.
- David, S., et Aguayo, A. J. (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* **214**, 931-3.
- David, S., Braun, P. E., Jackson, J. L., Kottis, V., et McKerracher, L. (1995) Laminin overrides the inhibitory effects of PNS and CNS myelin-derived inhibitors of neurite growth. *J Neurosci Res* **42**, 594-602.
- David, S., et McKerracher, L. (2000) Inhibition of axon growth by myelin-associated glycoprotein. In N. A. Ingoglia and M. Murray (Eds.), *Axonal Regeneration in the Central Nervous System*, pp. 425-446. Marcel Dekker, New York.
- Davies, S. J., Field, P. M., et Raisman, G. (1993) Long fibre growth by axons of embryonic mouse hippocampal neurons microtransplanted into the adult rat fimbria. *Eur J Neurosci* **5**, 95-106.
- Davies, S. J. A., Field, P. M., et Raisman, G. (1994) Long interfascicular axon growth from embryonic neurons transplanted into adult myelinated tracts. *J Neurosci* **14**, 1596-1612.
- Davies, S. J. A., Fitch, M. T., Memberg, S. P., Hall, A. K., Raisman, G., et Silver, J. (1997) Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* **390**, 680-683.



- Davies, S. J. A., Goucher, D. R., Doller, C., et Silver, J. (1999) Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* **19**, 5810-5822.
- de la Torre, J. R., Hopker, V. H., Ming, G.-L., Poo, M.-M., Tessier-Lavigne, M., Hemmati-Brivanlou, A., et Holt, C. E. (1997) Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* **19**, 1211-1224.
- DeBellard, M. E., Tang, S., Mukhopadhyay, G., Shen, Y.-J., et Filbin, M. T. (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *MolecCell Neurosci* **7**, 89-101.
- Deiner, M. S., Kennedy, T. E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., et Stretavan, D. W. (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.
- Di Polo, A., Aigner, L. J., Dunn, R. J., Bray, G. M., et Aguayo, A. J. (1998) Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus- infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3978-83.
- Dodd, J., Morton, S. B., Karagogeos, D., Yamamoto, M., et Jessell, T. M. (1988) Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* **1**, 105-16.
- Dooley, J. M., et Aguayo, A. J. (1982) Axonal elongation from cerebellum into PNS grafts in the adult rat. *Ann Neurol* **12**, 221.
- Doster, S. K., Lozano, A. M., Aguayo, A. J., et Willard, M. B. (1991) Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury. *Neuron* **6**, 635-47.
- Ekert, P. G., Silke, J., et Vaux, D. L. (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* **6**, 1081-6.

- Ellezam, B., Dubreuil, C., Winton, M., Loy, L., Dergham, P., Selles-Navarro, I., et McKerracher, L. (2002) Inactivation of intracellular Rho to stimulate axon growth and regeneration. *Prog Brain Res* **In press**.
- Fagiolini, M., Caleo, M., Strettoi, E., et Maffei, L. (1997) Axonal transport blockade in the neonatal rat optic nerve induces limited retinal ganglion cell death. *J Neurosci* **17**, 7045-52.
- Fawcett, J. W., Asher, R.A. (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* **49**, 377-391.
- Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., Stoeckli, E. T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., Simons, J., Bronson, R. T., Gordon, J. I., Tessier-Lavigne, M., et Weinberg, R. A. (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* **386**, 796-804.
- Fearon, E. R., et Pierceall, W. E. (1995) The deleted in colorectal cancer (DCC) gene: a candidate tumour suppressor gene encoding a cell surface protein with similarity to neural cell adhesion molecules. *Cancer Surv* **24**, 3-17.
- Feigin, I., Geller, E. H., et Wolf, A. (1951) Absence of regeneration in the spinal cord of the young rat. *J Neuropathol Exp Neurol* **30**, 420-425.
- Fernandes, K. J., Fan, D. P., Tsui, B. J., Cassar, S. L., et Tetzlaff, W. (1999) Influence of the axotomy to cell body distance in rat rubrospinal and spinal motoneurons: differential regulation of GAP-43, tubulins, and neurofilament-M. *J Comp Neurol* **414**, 495-510.
- Fischer, D., Pavlidis, M., et 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**, 3943-54.

- Fisher, J., Levkovitch-Verbin, H., Schori, H., Yoles, E., Butovsky, O., Kaye, J. F., Ben-Nun, A., et Schwartz, M. (2001) Vaccination for neuroprotection in the mouse optic nerve: implications for optic neuropathies. *J Neurosci* **21**, 136-42.
- Flanagan, J. G., et Vanderhaeghen, P. (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* **21**, 309-45.
- Fournier, A. E., Beer, J., Arregui, C. O., Essagian, C., Aguayo, A. J., et McKerracher, L. (1997) Brain-derived neurotrophic factor modulates GAP-43 but not T alpha1 expression in injured retinal ganglion cells of adult rats. *J Neurosci Res* **47**, 561-72.
- Fournier, A. E., GrandPre, T., et Strittmatter, S. M. (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* **409**, 341-6.
- Fournier, A. E., et 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.
- Frank, M., et Wolburg, H. (1996) Cellular reactions at the lesion site after crushing of the rat optic nerve. *Glia* **16**, 227-40.
- Freeman, J. A., Bock, S., Deaton, M., McGuire, B., Norden, J. J., et Snipes, G. J. (1986) Axonal and glial proteins associated with development and response to injury in the rat and goldfish optic nerve. *Exp Brain Res (Suppl)* **13**, 34-47.
- Friedman, W. J., Olson, L., et Persson, H. (1991) Cells that express BDNF mRNA in the developing postnatal brain. *European Journal of Neuroscience* **3**, 688-697.
- Gad, J. M., Keeling, S. L., Shu, T., Richards, L. J., et Cooper, H. M. (2000) The spatial and temporal expression patterns of netrin receptors, DCC and neogenin, in the developing mouse retina. *Exp Eye Res* **70**, 711-22.
- Gao, H., Qiao, X., Hefti, F., Hollyfield, J. G., et Knusel, B. (1997) Elevated mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor in retinal ganglion cell layer after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**, 1840-7.

- Geisert, E. E., et Alley, C. D. (1985) Antiserum-induced growth of axons across lesions of the adult rat brain. *Brain Res Bull* **15**, 19-28.
- Giftchristos, N., et David, S. (1988) Laminin and heparin sulfate proteoglycan in the lesioned adult mammalian central nervous system and their possible relationship to axonal sprouting. *J Neurocytol* **17**, 385-397.
- Giordano, S., Laessing, U., Ankerhold, R., Lottspeich, F., et Stuermer, C. A. (1997) Molecular characterization of E587 antigen: an axonal recognition molecule expressed in the goldfish central nervous system. *J Comp Neurol* **377**, 286-97.
- Giulian, D., Li, J., Leara, B., et Keenen, C. (1994) Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. *Neurochem Int* **25**, 227-33.
- Giulian, D., Vaca, K., et Corpuz, M. (1993) Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J Neurosci* **13**, 29-37.
- Goldberg, J. L., et Barres, B. A. (2000) The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annu Rev Neurosci* **23**, 579-612.
- Graftstein, B., et Ingoglia, N. A. (1982) Intracranial transection of the optic nerve in adult mice: preliminary observations. *Exp Neurol* **76**, 318-330.
- GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T., et Strittmatter, S. M. (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* **403**, 439-44.
- Greene, L. A., Volonte, C., et Chalazonitis, A. (1990) Purine analogs inhibit nerve growth factor-promoted neurite outgrowth by sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci* **10**, 1479-85.
- Groome, N. P., Dawkes, A., Gales, M., Hruby, S., et Alvord, E. C., Jr. (1986) Region-specific immunoassays for human myelin basic protein. *J Neuroimmunol* **12**, 253-64.

- Grothe, C., Meisinger, C., Hertenstein, A., Kurz, H., et Wewetzer, K. (1997) Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor 1 messenger RNAs in spinal ganglia and sciatic nerve: regulation after peripheral nerve lesion. *Neuroscience* **76**, 123-35.
- Hall, D. E., Neugebauer, K. M., et Reichardt, L. F. (1987) Embryonic neural retinal cell response to extracellular matrix proteins: developmental changes and effects of the cell substratum attachment antibody (CSAT). *J Cell Biol* **104**, 623-34.
- Halliburton, W. D. (1907) The Oliver-Sharpey lectures on new facts in relation to the process of nervous degeneration and regeneration. Lecture II. *Br Med J* **1**, 1111-1118.
- Hamelin, M., Zhou, Y., Su, M. W., Scott, I. M., et Culotti, J. G. (1993) Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally. *Nature* **364**, 327-30.
- Harper, S. J., et LoGrasso, P. (2001) Signalling for survival and death in neurones: the role of stress- activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal* **13**, 299-310.
- Harris, W. A., et Holt, C. E. (1999) Neurobiology. Slit, the midline repellent. *Nature* **398**, 462-3.
- Harrison, L. C., et Hafler, D. A. (2000) Antigen-specific therapy for autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* **12**, 704-11.
- Hasan, S. J., Nelson, B. H., Valenzuela, J. I., Keirstead, H. S., Schull, S. E., Ethell, D. W., et Steeves, J. D. (1991) Functional repair of transected spinal cord in embryonic chick. *Rest Neurol Neurosci* **2**, 137-154.
- Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Leibowitz-Amit, R., Pevsner, E., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, I. R., et Schwartz, M. (2000) Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J Neurosci* **20**, 6421-30.

- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., et Hall, D. H. (1990) The UNC-5, UNC-6, and UNC-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* **2**, 61-85.
- Heiduschka, P., et Thanos, S. (2000) Aurintricarboxylic acid promotes survival and regeneration of axotomised retinal ganglion cells in vivo. *Neuropharmacology* **39**, 889-902.
- Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simmons, L., Moffet, B., Vandlen, R. A., Simpson, L. C., et et al. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* **266**, 1062-4.
- Hens, J. J., Benfenati, F., Nielander, H. B., Valtorta, F., Gispen, W. H., et De Graan, P. N. (1993) B-50/GAP-43 binds to actin filaments without affecting actin polymerization and filament organization. *J Neurochem* **61**, 1530-3.
- Herdegen, T., Bastmeyer, M., Bahr, M., Stuermer, C., Bravo, R., et Zimmermann, M. (1993) Expression of JUN, KROX, and CREB transcription factors in goldfish and rat retinal ganglion cells following optic nerve lesion is related to axonal sprouting. *J Neurobiol* **24**, 528-43.
- Herzog, K. H., Bailey, K., et Barde, Y. A. (1994) Expression of the BDNF gene in the developing visual system of the chick. *Development* **120**, 1643-9.
- Herzog, K. H., et von Bartheld, C. S. (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**, 2891-906.
- Hilarp, N. A., et Olivercrona, H. (1946) The role played by the axon and the Schwann cell in the degree of myelination of the peripheral nerve fibers. *Acta Anat (Basel)* **2**, 17-32.

- Hinds, J. W., et Hinds, P. L. (1974) Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: an electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Dev Biol* **37**, 381-416.
- Hirsch, S., Bahr, M. (1999) Immunocytochemical characterization of reactive optic nerve astrocytes and meningeal cells. *Glia* **26**, 36-46.
- Hirschberg, D. L., Moalem, G., He, J., Mor, F., Cohen, I. R., et Schwartz, M. (1998) Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma. *J Neuroimmunol* **89**, 88-96.
- Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M., et Stein, E. (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* **97**, 927-41.
- Hopker, V. H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., et Holt, C. (1999) Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* **401**, 69-73.
- Hornberger, M. R., Dutton, D., Ciossek, T., Yamada, T., Handwerker, C., Lang, S., Weth, F., Huf, J., Wessel, R., Logan, C., Tanaka, H., et Drescher, U. (1999) Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron* **22**, 731-42.
- Horvat, J.-C. (1966) Comparaison des réactions régénératives provoquées dans le cerveau et dans le cervelet par des greffes tissulaires intraraciales. *Bull Assoc Anat (Nancy)* **135**, 487-499.
- Huang, D. W., McKerracher, L., Braun, P. E., et David, S. (1999) A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* **24**, 639-47.

- Huber, A. B., et Schwab, M. E. (2000) Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem* **381**, 407-19.
- Hull, M., et Bahr, M. (1994) Regulation of immediate-early gene expression in rat retinal ganglion cells after axotomy and during regeneration through a peripheral nerve graft. *Journal of Neurobiology* **25**, 92.
- Imperato-Kalmar, E., McKinney, A., Schnell, L., Rubin, B. R., Schwab, M. E. (1997) Local changes in vascular architecture following partial spinal cord lesion in the rat. *Exp Neurol* **140**, 322-328.
- Isenmann, S., et Bahr, M. (1997) Expression of c-Jun protein in degenerating retinal ganglion cells after optic nerve lesion in the rat. *Exp Neurol* **147**, 28-36.
- Isenmann, S., Wahl, C., Krajewski, S., Reed, J. C., et 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**, 1763-72.
- Itaya, S. K. (1980) Retinal efferents from the pretectal area in the rat. *Brain Res* **201**, 436-41.
- Iwasaki, S., Iguchi, M., Watanabe, K., Hoshino, R., Tsujimoto, M., et Kohno, M. (1999) Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* **274**, 26503-10.
- Jacobson, R. D., Virag, I., et Skene, J. H. (1986) A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J Neurosci* **6**, 1843-55.
- Jalink, K., van Corven, E. J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S., et Moolenaar, W. H. (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol* **126**, 801-810.



- Jansen, H. G., et Sanyal, S. (1987) Synaptic changes in the terminals of rod photoreceptors of albino mice after partial visual cell loss induced by brief exposure to constant light. *Cell Tissue Res* **250**, 43-52.
- Johnson, J. E., Barde, Y. A., Schwab, M., et Thoenen, H. (1986) Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience* **6**, 3031-3038.
- Jung, M., Petrusch, B., et Stuermer, C. A. (1997) Axon-regenerating retinal ganglion cells in adult rats synthesize the cell adhesion molecule L1 but not TAG-1 or SC-1. *Mol Cell Neurosci* **9**, 116-31.
- Kalil, K., et Reh, T. (1979) Regrowth of severed axons in the neonatal central nervous system: establishment of normal connections. *Science* **205**, 1158-61.
- Kao, C. C., Chang, L. W., et Bloodworth, J. M. B. J. (1977) Axonal Regeneration across Transected Mammalian Spinal Cord: An Electron Microscopic Study of Delayed Microsurgical Nerve Grafting. *Exp Neurol* **54**, 591-615.
- Kapfhammer, J. P., et Schwab, M. E. (1994a) Increased expression of the growth-associated protein GAP-43 in the myelin-free rat spinal cord. *Eur J Neurosci* **6**, 403-11.
- Kapfhammer, J. P., et Schwab, M. E. (1994b) Inverse patterns of myelination and GAP-43 expression in the adult CNS: neurite growth inhibitors as regulators of neuronal plasticity? *J Comp Neurol* **340**, 194-206.
- Katoh, H., Aoki, J., Ichikawa, A., et Negishi, M. (1998) p160 RhoA-binding kinase ROK $\alpha$  induces neurite retraction. *J Biol Chem* **273**, 2489-2492.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E. D., Chan, S. S. Y., Culotti, J. G., et Tessier-Lavigne, M. (1996) Deleted in colorectal cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* **87**, 175-185.

- Keirstead, H. S., Hasan, S. J., Muir, G. D., et Steeves, J. D. (1992) Suppression of the onset of myelination extends the permissive period for the functional repair of embryonic spinal cord. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 11664-11668.
- Keirstead, S. A., Rasminsky, M., Fukuda, Y., Carter, D. A., Aguayo, A. J., et Vidal-Sanz, M. (1989) Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. *Science* **246**, 255-7.
- Keller, S. A., Jones, J. M., Boyle, A., Barrow, L. L., Killen, P. D., Green, D. G., Kapousta, N. V., Hitchcock, P. F., Swank, R. T., et Meisler, M. H. (1994) Kidney and retinal defects (Krd), a transgene-induced mutation with a deletion of mouse chromosome 19 that includes the Pax2 locus. *Genomics* **23**, 309-20.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R., et Tessier-Lavigne, M. (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78**, 425-35.
- Kermer, P., Klocker, N., et Bahr, M. (2001) Modulation of metabotropic glutamate receptors fails to prevent the loss of adult rat retinal ganglion cells following axotomy or N-methyl-D-aspartate lesion in vivo. *Neurosci Lett* **315**, 117-20.
- Kermer, P., Klocker, N., Labes, M., et Bahr, M. (1998) Inhibition of CPP32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary cell death in vivo. *J Neurosci* **18**, 4656-62.
- Kidd, T., Bland, K. S., et Goodman, C. S. (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* **96**, 785-94.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., et Tear, G. (1998a) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* **92**, 205-15.

- Kidd, T., Russell, C., Goodman, C. S., et Tear, G. (1998b) Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* **20**, 25-33.
- Kiernan, J. A. (1985) Axonal and vascular changes following injury to the rat's optic nerve. *J Anat* **141**, 139-54.
- Kikuchi, M., Tenneti, L., et Lipton, S. A. (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* **20**, 5037-44.
- Kipnis, J., Yoles, E., Schori, H., Hauben, E., Shaked, I., et Schwartz, M. (2001) Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci* **21**, 4564-71.
- Kiryu-Seo, S., Sasaki, M., Yokohama, H., Nakagomi, S., Hirayama, T., Aoki, S., Wada, K., et Kiyama, H. (2000) Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4345-50.
- Klocker, N., Braunling, F., Isenmann, S., et Bahr, M. (1997) In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells. *Neuroreport* **8**, 3439-42.
- Klocker, N., Jung, M., Stuermer, C. A., et Bahr, M. (2001) BDNF increases the number of axotomized rat retinal ganglion cells expressing GAP-43, L1, and TAG-1 mRNA--a supportive role for nitric oxide? *Neurobiol Dis* **8**, 103-13.
- Knoll, B., Isenmann, S., Kilic, E., Walkenhorst, J., Engel, S., Wehinger, J., Bahr, M., et Drescher, U. (2001) Graded expression patterns of ephrin-As in the superior colliculus after lesion of the adult mouse optic nerve. *Mech Dev* **106**, 119-27.
- Koeberle, P. D., et Ball, A. K. (1998) Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy. *Vision Research* **38**, 1505-1515.
- Koh, J. Y., Gwag, B. J., Lobner, D., et Choi, D. W. (1995) Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science* **268**, 573-5.

- Kolodkin, A. L. (1998) Semaphorin-mediated neuronal growth cone guidance. *Prog Brain Res* **117**, 115-32.
- Kreutz, M. R., Langnaese, K., Dieterich, D. C., Seidenbecher, C. I., Zuschratter, W., Beesley, P. W., et Gundelfinger, E. D. (2001) Distribution of transcript and protein isoforms of the synaptic glycoprotein neuroplastin in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1907-14.
- Kreutzberg, G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **19**, 312-8.
- Kyriakis, J. M., et Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* **271**, 24313-6.
- Lau, K. C., So, K. F., et Tay, D. (1994) Intravitreal transplantation of a segment of peripheral nerve enhances axonal regeneration of retinal ganglion cells following distal axotomy. *Exp Neurol* **128**, 211-5.
- Lazarov-Spiegler, O., Solomon, A., Zeev-Bran, A. B., Hirschberg, D. L., Lavie, V., et Schwartz, M. (1996) Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB J* **110**, 1296-1302.
- Le Gros Clark, W. E. (1942) The Problem of Neuronal Regeneration in the Central Nervous System. *J Anat* **77**, 20-51.
- Lefcort, F., Venstrom, K., McDonald, J. A., et Reichardt, L. F. (1992) Regulation of expression of fibronectin and its receptor, alpha 5 beta 1, during development and regeneration of peripheral nerve. *Development* **116**, 767-82.
- Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., et McKerracher, L. (1999) Inactivation of rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci* **19**, 7537-47.
- Leist, M., et Jaattela, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 589-98.

- Leon, S., Yin, Y., Nguyen, J., Irwin, N., et Benowitz, L. I. (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* **20**, 4615-26.
- Leonardo, E. D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S. L., et Tessier-Lavigne, M. (1997) Vertebrate homologs of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* **386**, 833-838.
- Leoz, O., et Arcuate, L. R. (1914) Procesos regenerativos del nervio optico y retina con ocasion de ingertos nerviosos. *Trab Lab Invest Biol* **11**, 239-254.
- Levine, J. (1998) Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci* **14**, 4716-4730.
- Levine, S., et Wenk, M. A. (1961) Studies on the Mechanism of Altered Susceptibility to Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Am J Pathol* **39**, 419-441.
- Lewis, G. P., Linberg, K. A., et Fisher, S. K. (1998) Neurite outgrowth from bipolar and horizontal cells after experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 424-34.
- Li, D., Field, P. M., et Raisman, G. (1995) Failure of axon regeneration in postnatal rat entorhinohippocampal slice coculture is due to maturation of the axon, not that of the pathway or target. *Eur J Neurosci* **7**, 1164-71.
- Li, M., Shibata, A., Li, C., Braun, P. E., McKerracher, L., Roder, J., Kater, S. B., et David, S. (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *J Neurosci Res* **46**, 404-414.
- Linden, R., et Perry, V. H. (1983) Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res* **272**, 145-9.
- Lisak, R. P., Falk, G. A., Heinze, R. G., Kies, M. W., et Alvord, E. C. (1970) Dissociation of antibody production from disease suppression in the inhibition of allergic encephalomyelitis by myelin basic protein. *J Immunol* **104**, 1435-46.

- Liu, H. M., Yang, L. H., et Yang, Y. J. (1995) Schwann cell properties: 3. C-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**, 487-96.
- Livesey, F. J., et Hunt, S. P. (1997) Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. *Mol Cell Neurosci* **8**, 417-429.
- Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., et Mehlen, P. (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *Embo J* **20**, 2715-22.
- LoPachin, R. M., et Lehning, E. J. (1997) Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. *Toxicol Appl Pharmacol* **143**, 233-44.
- Luna, L. G. (1992) *Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts*. Johnson Printers, Downers Grove, Il.
- Ma, Y. T., Hsieh, T., Forbes, M. E., Johnson, J. E., et Frost, D. O. (1998) BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. *J Neurosci* **18**, 2097-107.
- Macdonald, R., et Wilson, S. W. (1996) Pax proteins and eye development. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 49-56.
- Mackay, D. J. G., Nobes, C. D., et Hall, A. (1996) The Rho's progress: a potential role during neuritogenesis for the Rho family GTPases. *TINS* **18**, 496-501.
- Mackie, E. J., Halfter, W., et Liverani, D. (1988) Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol* **107**, 2757-67.
- MacLennan, A. J., McLaurin, D. L., Marks, L., Vinson, E. N., Pfeifer, M., Szulc, S. V., Heaton, M. B., et Lee, N. (1997) Immunohistochemical localization of netrin-1 in the embryonic chick nervous system. *J Neurosci* **17**, 5466-5479.
- Madison, R. D., Zomorodi, A., et Robinson, G. A. (2000) Netrin-1 and peripheral nerve regeneration in the adult rat. *Exp Neurol* **161**, 563-70.

- Maffei, L., Carmignoto, G., Perry, V. H., Candeo, P., et Ferrari, G. (1990) Schwann cells promote the survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve section. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1855-9.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R. F., Wiegand, S. J., Furth, M. E., Lindsay, R. M., et Yancopoulos, G. D. (1990) NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* **5**, 501-9.
- Manitt, C., Colicos, M. A., Thompson, K. M., Rousselle, E., Peterson, A. C., et Kennedy, T. E. (2001) Widespread expression of netrin-1 by neurons and oligodendrocytes in the adult mammalian spinal cord. *J Neurosci* **21**, 3911-22.
- Manitt, C., et Kennedy, T. E. (2002) Where the rubber meets the road: Netrin expression and function in the developing and adult nervous system. *Prog Brain Res* **Sous presse**.
- Mann, I. (1964) *The development of the human eye*, 3rd ed. Brit. Med. Association, London.
- Mansour-Robaey, S., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., et Aguayo, A. J. (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1632-6.
- Marusic, S., et Tonegawa, S. (1997) Tolerance induction and autoimmune encephalomyelitis amelioration after administration of myelin basic protein-derived peptide. *J Exp Med* **186**, 507-15.
- Maxwell, W. L., Follows, R., Ashurst, D. E., et Berry, M. (1990) The response of the cerebral hemisphere of the rat to injury. I. The mature rat. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **328**, 479-500.
- McConnell, P., et Berry, M. (1982) Regeneration of ganglion cell axons in the adult mouse retina. *Brain Res* **241**, 362-5.

- McGuire, C. B., Snipes, G. J., et Norden, J. J. (1988) Light-microscopic immunolocalization of the growth- and plasticity- associated protein GAP-43 in the developing rat brain. *Brain Res* **469**, 277-91.
- McIntire, S. L., Garriga, G., White, J., Jacobson, D., et Horvitz, H. R. (1992) Genes necessary for directed axonal elongation or fasciculation in *C. elegans*. *Neuron* **8**, 307-22.
- McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S., et Silver, J. (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *JNeurosci* **11**, 3398-3411.
- McKeon, R. J., et Silver, J. (1995) Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol* **136**, 32-43.
- McKerracher, L., David, S., Jackson, J. L., Kottis, V., Dunn, R., et Braun, P. E. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite outgrowth. *Neuron* **13**, 805-811.
- McKerracher, L., Essagian, C., et Aguayo, A. J. (1993a) Marked increase in beta-tubulin mRNA expression during regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult mammals. *JNeurosci* **13**, 5294-300.
- McKerracher, L., Essagian, C., et Aguayo, A. J. (1993b) Temporal changes in beta-tubulin and neurofilament mRNA levels after transection of adult rat retinal ganglion cell axons in the optic nerve. *JNeurosci* **13**, 2617-26.
- McQuarrie, I. G. (1978) The effect of a conditioning lesion on the regeneration of motor axons. *Brain Res* **152**, 597-602.
- Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S. J., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., et Bredesen, D. E. (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395**, 801-4.



- Meller, K. (1987) Early structural changes in the axoplasmic cytoskeleton after axotomy studies by cryofixation. *Cell Tis Res* **250**, 663-672.
- Mey, J., et Thanos, S. (1993) Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Research* **602**, 304-317.
- Meyer, M., Matsuoka, I., Wetmore, C., Olson, L., et Thoenen, H. (1992) Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol* **119**, 45-54.
- Meyer-Franke, A., Wilkinson, G. A., Kruttgen, A., Hu, M., Munro, E., Hanson, M. G., Reichardt, L. F., et Barres, B. A. (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* **21**, 681-93.
- Meyerhardt, J. A., Caca, K., Eckstrand, B. C., Hu, G., Lengauer, C., Banavali, S., Look, A. T., et Fearon, E. R. (1999) Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas. *Cell Growth Differ* **10**, 35-42.
- Miller, D. J., Sanborn, K. S., Katzmann, J. A., et Rodriguez, M. (1994) Monoclonal autoantibodies promote central nervous system repair in an animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci* **14**, 6230-8.
- Ming, G., Henley, J., Tessier-Lavigne, M., Song, H., et Poo, M. (2001) Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron* **29**, 441-52.
- Ming, G., Song, H., Berninger, B., Inagaki, N., Tessier-Lavigne, M., et Poo, M. (1999) Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance. *Neuron* **23**, 139-48.

- Ming, G.-l., Song, H.-j., Berninger, B., Holt, C. E., Tessier-Lavigne, M., et Poo, M.-m. (1997) cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* **19**, 1225-1235.
- Miranda, J. D., White, L. A., Marcillo, A. E., Willson, C. A., Jagid, J., et Whittemore, S. R. (1999) Induction of Eph B3 after spinal cord injury. *Exp Neurol* **156**, 218-22.
- Mitchell, K. J., Doyle, J. L., Serafini, T., Kennedy, T. E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., et Dickson, B. J. (1996) Genetic analysis of Netrin genes in Drosophila: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* **17**, 203-15.
- Moalem, G., Gdalyahu, A., Shani, Y., Otten, U., Lazarovici, P., Cohen, I. R., et Schwartz, M. (2000) Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J Autoimmun* **15**, 331-45.
- Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I. R., et Schwartz, M. (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* **5**, 49-55.
- Moon, L. D., Asher, R. A., Rhodes, K. E., et Fawcett, J. W. (2001) Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci* **4**, 465-6.
- Moore, R. Y., Speh, J. C., et Card, J. P. (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* **352**, 351-66.
- Morooka, T., et Nishida, E. (1998) Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem* **273**, 24285-8.
- Mueller, B. K. (1999) Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* **22**, 351-88.
- Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F. S., Crocker, P. R., et Filbin, M. T. (1994) A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* **13**, 757-67.

- Munz, M., Rasminsky, M., Aguayo, A. J., Vidal-Sanz, M., et Devor, M. G. (1985) Functional activity of rat brainstem neurons regenerating axons along peripheral nerve grafts. *Brain Res* **340**, 115-25.
- Murase, S., et Schuman, E. M. (1999) The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 549-53.
- Nakamura, F., Kalb, R. G., et Strittmatter, S. M. (2000) Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol* **44**, 219-29.
- Negishi, H., Dezawa, M., Oshitari, T., et Adachi-Usami, E. (2001) Optic nerve regeneration within artificial Schwann cell graft in the adult rat. *Brain Res Bull* **55**, 409-19.
- Ness, R., and David, S. (1997) Leptomeningeal cells modulate the neurite growth promoting properties of astrocytes in vitro. *Glial* **19**, 47-57.
- Niclou, S. P., Jia, L., et Raper, J. A. (2000) Slit2 is a repellent for retinal ganglion cell axons. *J Neurosci* **20**, 4962-74.
- Nicotera, P., Leist, M., et Manzo, L. (1999) Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 46-51.
- Nobile-Orazio, E., Hays, A. P., Latov, N., Perman, G., Golier, J., Shy, M. E., et Freddo, L. (1984) Specificity of mouse and human monoclonal antibodies to myelin-associated glycoprotein. *Neurology* **34**, 1336-42.
- Nornes, H. O., Dressler, G. R., Knapik, E. W., Deutsch, U., et Gruss, P. (1990) Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development* **109**, 797-809.
- Oblinger, M. M., et Lasek, R. J. (1984) A conditioning lesion of the peripheral axons of dorsal root ganglion cells accelerates regeneration of only their peripheral axons. *J Neurosci* **4**, 1736-44.
- Offret, G., Dhermy, H., et Offret, H. (1986) *Embryologie et tératologie de l'oeil*. Masson, Paris.

- O'Leary, D. D., et Wilkinson, D. G. (1999) Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 65-73.
- Oppenheim, R. W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**, 453-501.
- Osusky, R., Walker, S. M., et Ryan, S. J. (1996) Vitreous body affects activation and maturation of monocytes into macrophages. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **234**, 637-42.
- Owens, T., et Sriram, S. (1995) The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis. *Neurol Clin* **13**, 51-73.
- Palkovits, M. (1995) Neuropeptide messenger plasticity in the CNS neurons following axotomy. *Mol Neurobiol* **10**, 91-103.
- Paschke, K. A., Lottspeich, F., et Stuermer, C. A. (1992) Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. *J Cell Biol* **117**, 863-75.
- Pasterkamp, R. J., De Winter, F., Holtmaat, A. J., et Verhaagen, J. (1998a) Evidence for a role of the chemorepellent semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in the regeneration of primary olfactory axons. *J Neurosci* **18**, 9962-76.
- Pasterkamp, R. J., Giger, R. J., Ruitenber, M. J., Holtmaat, A. J., De Wit, J., De Winter, F., et Verhaagen, J. (1999) Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol Cell Neurosci* **13**, 143-66.
- Pasterkamp, R. J., Giger, R. J., et Verhaagen, J. (1998b) Regulation of semaphorin III/collapsin-1 gene expression during peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* **153**, 313-27.
- Pasterkamp, R. J., et Verhaagen, J. (2001) Emerging roles for semaphorins in neural regeneration. *Brain Res Brain Res Rev* **35**, 36-54.

- Pease, M. E., McKinnon, S. J., Quigley, H. A., Kerrigan-Baumrind, L. A., et Zack, D. J. (2000) Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 764-74.
- Peinado-Ramon, P., Salvador, M., Villegas-Perez, M. P., et Vidal-Sanz, M. (1996) Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. *J Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 489-500.
- Perry, V. H. (1981) Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience* **6**, 931-944.
- Perry, V. H., Brown, M. C., et Gordon, S. (1987) The macrophage response to central and peripheral nerve injury. *J Exp Med* **165**, 1218-1223.
- Perry, V. H., et Cowey, A. (1979) The effects of unilateral cortical and tectal lesions on retinal ganglion cells in rats. *Exp Brain Res* **35**, 85-95.
- Petrausch, B., Jung, M., Leppert, C. A., et Stuermer, C. A. (2000a) Lesion-induced regulation of netrin receptors and modification of netrin-1 expression in the retina of fish and grafted rats [In Process Citation]. *Mol Cell Neurosci* **16**, 350-64.
- Petrausch, B., Tabibiazar, R., Roser, T., Jing, Y., Goldman, D., Stuermer, C. A., Irwin, N., et Benowitz, L. I. (2000b) A purine-sensitive pathway regulates multiple genes involved in axon regeneration in goldfish retinal ganglion cells. *J Neurosci* **20**, 8031-41.
- Pindzola, R. R., Doller, C., et Silver, J. (1993) Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions. *Dev Biol* **156**, 34-48.
- Prinjha, R., Moore, S. E., Vinson, M., Blake, S., Morrow, R., Christie, G., Michalovich, D., Simmons, D. L., et Walsh, F. S. (2000) Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* **403**, 383-4.

- Przyborski, S. A., Knowles, B. B., et Ackerman, S. L. (1998) Embryonic phenotype of Unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary. *Development* **125**, 41-50.
- Qu, T., Dong, K., Sugioka, K., et Yamadori, T. (1996) Demonstration of direct input from the retina to the lateral habenular nucleus in the albino rat. *Brain Res* **709**, 251-58.
- Quigley, H. A., McKinnon, S. J., Zack, D. J., Pease, M. E., Kerrigan-Baumrind, L. A., Kerrigan, D. F., et Mitchell, R. S. (2000) Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 3460-6.
- Raine, C. S., et Traugott, U. (1983) Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. Ultrastructure of the central nervous system of animals treated with combinations of myelin components. *Lab Invest* **48**, 275-84.
- Ramón y Cajal, S. (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Vol II*, Vol. 2. Instituto Ramon y Cajal, Madrid.
- Ramón y Cajal, S. (1914) *Degeneracion y Regeneracion de los Centros Nerviosos*, Vol. 2. Moya, Madrid.
- Ramón y Cajal, S. (1991) *Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system / translated by Raoul M. May ; with an introduction and additional translations by Javier DeFelipe and Edward G. Jones*. Oxford University Press, New York.
- Ranson, S. W., et Clark, S. L. (1969) *The anatomy of the nervous system, its development and function*, 10 ed. Saunders, Philadelphia.
- Raynauld, J. P., Laviolette, J. R., et Wagner, H. J. (1979) Goldfish retina: a correlate between cone activity and morphology of the horizontal cell in cone pedicles. *Science* **204**, 1436-8.
- Richardson, P. M., et Issa, V. M. (1984) Peripheral injury enhances central regeneration of primary sensory neurones. *Nature* **309**, 791-3.

- Richardson, P. M., Issa, V. M., et Aguayo, A. J. (1984) Regeneration of long spinal axons in the rat. *J Neurocytol* **13**, 165-82.
- Richardson, P. M., Issa, V. M. K., et Shemie, S. (1982a) Regeneration and retrograde degeneration of axons in the rat optic nerve. *J Neurocytol* **11**, 949-966.
- Richardson, P. M., McGuinness, U. M., et Aguayo, A. J. (1980) Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* **284**, 264-5.
- Richardson, P. M., McGuinness, U. M., et Aguayo, A. J. (1982b) Peripheral nerve autografts to the rat spinal cord: studies with axonal tracing methods. *Brain Res* **237**, 147-62.
- Rickman, D. W., et Brecha, N. C. (1995) Expression of the proto-oncogene, *trk*, receptors in the developing rat retina. *Vis Neurosci* **12**, 215-22.
- Riehl, R., Johnson, K., Bradley, R., Grunwald, G. B., Cornel, E., Lilienbaum, A., et Holt, C. E. (1996) Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* **17**, 837-48.
- Robinson, G. A. (1994) Immediate early gene expression in axotomized and regenerating retinal ganglion cells of the adult rat. *Brain Research Molecular Brain Research* **24**, 43.
- Robinson, G. A. (1996) Changes in the expression of transcription factors ATF-2 and Fra-2 after axotomy and during regeneration in rat retinal ganglion cells. *Brain Res Mol Brain Res* **41**, 57-64.
- Rodriguez, M., et Lennon, V. A. (1990) Immunoglobulins promote remyelination in the central nervous system. *Ann Neurol* **27**, 12-7.
- Rodriguez, M., Oleszak, E., et Leibowitz, J. (1987) Theiler's murine encephalomyelitis: a model of demyelination and persistence of virus. *Crit Rev Immunol* **7**, 325-65.
- Rodriguez-Tebar, A., Jeffrey, P. L., Thoenen, H., et Barde, Y. A. (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.

- Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M., et Puschel, A. W. (2000) Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech Dev* **93**, 95-104.
- Rosenberg, L. J., Teng, Y. D., et Wrathall, J. R. (1999) Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin on acute white matter pathology after experimental contusive spinal cord injury. *J Neurosci* **19**, 6122-33.
- Rudge, J. S., et Silver, J. (1990) Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci* **10**, 3594-603.
- Rush, R. A. (1984) Immunohistochemical localization of endogenous nerve growth factor. *Nature* **312**, 364-7.
- Rutishauser, U., et Jessell, T. M. (1988) Cell adhesion molecules in vertebrate neural development. *Physiol Rev* **68**, 819-57.
- Sanyanusin, P., Schimmenti, L. A., McNoe, L. A., Ward, T. A., Pierpont, M. E., Sullivan, M. J., Dobyns, W. B., et Eccles, M. R. (1995) Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* **9**, 358-64.
- Saunders, N. R., Kitchener, P., Knott, G. W., Nicholls, J. G., Potter, A., et Smith, T. J. (1998) Development of walking, swimming and neuronal connections after complete spinal cord transection in the neonatal opossum, *Monodelphis domestica*. *J Neurosci* **18**, 339-55.
- Sauve, Y., Sawai, H., et Rasminsky, M. (2001) Topological Specificity in Reinnervation of the Superior Colliculus by Regenerated Retinal Ganglion Cell Axons in Adult Hamsters. *J Neurosci* **21**, 951-960.
- Sawai, H., Clarke, D. B., Kittlerova, P., Bray, G. M., et 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**, 3887-94.



- Schaden, H., Stuermer, C. A., et Bahr, M. (1994) GAP-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat. *J Neurobiol* **25**, 1570-8.
- Schafer, M., Fruttiger, M., Montag, D., Schachner, M., et Martini, R. (1996) Disruption of the gene for the myelin-associated glycoprotein improves axonal regrowth along myelin in C57BL/Wlds mice. *Neuron* **16**, 1107-1113.
- Schnell, L., et Schwab, M. E. (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* **343**, 269-272.
- Schnell, L., et Schwab, M. E. (1993) Sprouting and regeneration of lesioned corticospinal tract fibres in the adult rat spinal cord. *Eur J Neurosci* **5**, 1156-71.
- Schonbach, J., Hu, K. H., et Friede, R. L. (1968) Cellular and chemical changes during myelination: histologic, autoradiographic, histochemical and biochemical data on myelination in the pyramidal tract and corpus callosum of rat. *J Comp Neurol* **134**, 21-36.
- Schoups, A. A., Elliott, R. C., Friedman, W. J., et Black, I. B. (1995) NGF and BDNF are differentially modulated by visual experience in the developing geniculocortical pathway. *Brain Res Dev Brain Res* **86**, 326-34.
- Schuettauf, F., Naskar, R., Vorwerk, C. K., Zurakowski, D., et Dreyer, E. B. (2000) Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA- kainate and NMDA receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 4313-6.
- Schwab, M. E., Kapfhammer, J. P., et Bandtlow, C. E. (1993) Inhibitors of neurite outgrowth. *Annu Rev Neurosci* **16**, 565-595.
- Schwab, M. E., et Thoenen, H. (1985) Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci* **5**, 2415-23.
- Schwartz, M., et Moalem, G. (2001) Beneficial immune activity after CNS injury: prospects for vaccination. *J Neuroimmunol* **113**, 185-92.

- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., et Goodman, C. S. (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* **10**, 409-26.
- Seidenbecher, C. I., Richter, K., Rauch, U., Fassler, R., Garner, C. C., et Gundelfinger, E. D. (1995) Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. *J Biol Chem* **270**, 27206-12.
- Selles-Navarro, I., Ellezam, B., Fajardo, R., Latour, M., et McKerracher, L. (2001) Retinal Ganglion Cell and Nonneuronal Cell Responses to a Microcrush Lesion of Adult Rat Optic Nerve. *Exp Neurol* **167**, 282-289.
- Selles-Navarro, I., Villegas-Perez, M. P., Salvador-Silva, M., Ruiz-Gomez, J. M., et Vidal-Sanz, M. (1996) Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 2002-2014.
- Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. C., et Tessier-Lavigne, M. (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* **87**, 1001-14.
- Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M., et Tessier-Lavigne, M. (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* **78**, 409-24.
- Shen, H., et Semba, K. (1994) A direct retinal projection to the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res* **635**, 159-68.
- Shen, S., Wiemelt, A. P., McMorris, A., et Barres, B. A. (1999) Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* **23**, 285-295.
- Shen, Y. J., DeBellard, M. E., Salzer, J. L., Roder, J., et Filbin, M. T. (1998) Myelin-associated glycoprotein in myelin and expressed by Schwann cells inhibits axonal regeneration and branching. *Molec Cell Neurosci* **12**, 79-91.

- Shifman, M. I., et Selzer, M. E. (2000) Expression of the netrin receptor UNC-5 in lamprey brain: modulation by spinal cord transection. *Neurorehabil Neural Repair* **14**, 49-58.
- Sidman, R. (1961) Histogenesis of the mouse retina studied with tritiated thymidine. In G. K. Smelser (Ed.), *The structure of the eye*, pp. 487-506. Academic Press, New York.
- Siegel, R. E. (1973) *Galen on Psychology, Psychopathology and Function of Diseases of the Nervous System*. Karger, Basel.
- Sievers, J., Hausmann, B., Unsicker, K., et Berry, M. (1987) Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve. *Neurosci Lett* **76**, 157-62.
- Silver, J., et Sidman, R. L. (1980) A mechanism for the guidance and topographic patterning of retinal ganglion cell axons. *J Comp Neurol* **189**, 101-11.
- Simpson, S. A., et Young, J. Z. (1945) Regeneration of fiber diameter after cross unions of visceral and somatic nerves. *J Anat* **79**, 48-65.
- Skarnes, W. C., Moss, J. E., Hurlley, S. M., et Beddington, R. S. (1995) Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 6592-6.
- Snow, D. M., Lemmon, V., Carrino, D. A., Caplan, A. I., et Silver, J. (1990) Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* **109**, 111-30.
- So, K. F., et Aguayo, A. J. (1985) Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res* **328**, 349-54.
- Solomon, A. S., Lavie, V., Hauben, U., Monsonego, A., Yoles, E., et Schwartz, M. (1996) Complete transection of rat optic nerve while sparing the meninges and the

- vasculature: an experimental model for optic nerve neuropathy and trauma. *J Neurosci Meth* **70**, 21-25.
- Song, H. J., et Poo, M. M. (1999) Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 355-63.
- Song, H.-j., Ming, G.-i., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., et Poo, M.-m. (1998) Conversion of growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* **281**, 1515-1518.
- Song, H.-j., Ming, G.-i., et Poo, M.-m. (1997) cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* **388**, 275-279.
- Stein, E., et Tessier-Lavigne, M. (2001) Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**, 1928-38.
- Stier, H., et Schlosshauer, B. (1995) Axonal guidance in the chicken retina. *Development* **121**, 1443-1454.
- Stier, H., et Schlosshauer, B. (1998) Different cell surface areas of polarized radial glia having opposite effects on axonal outgrowth. *Eur J Neurosci* **10**, 1000-10.
- Stockli, K. A., Lottspeich, F., Sendtner, M., Masiakowski, P., Carroll, P., Gotz, R., Lindholm, D., et Thoenen, H. (1989) Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* **342**, 920-3.
- Stuermer, C. A. (1988) Trajectories of regenerating retinal axons in the goldfish tectum: I. A comparison of normal and regenerated axons at late regeneration stages. *J Comp Neurol* **267**, 55-68.
- Stuermer, C. A., et Bastmeyer, M. (2000) The retinal axon's pathfinding to the optic disk. *Prog Neurobiol* **62**, 197-214.
- Sugar, O., et Gerard, R. W. (1940) Spinal cord regeneration in the rat. *J Neurophysiol* **3**, 1-19.

- Tabata, T., et Fukuda, Y. (1992) Dendritic regrowth of retinal ganglion cells in adult rats. *Neuroreport* **3**, 709-12.
- Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L. H., Murakami, Y., Kalb, R. G., Fujisawa, H., et Strittmatter, S. M. (1999) Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* **99**, 59-69.
- Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G. I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M. L., Goodman, C. S., Poo, M., Tessier-Lavigne, M., et Comoglio, P. M. (1999) Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* **99**, 71-80.
- Tang, S., Shen, Y. J., DeBellard, M. E., Mukhopadhyay, G., Salzer, J. L., Crocker, P. R., et Filbin, M. T. (1997a) Myelin-associated glycoprotein interacts with neurons via a sialic acid site at ARG118 and a distinct neurite inhibition site. *J Cell Biol* **138**, 1355-1366.
- Tang, S., Woodhall, R. W., Shen, Y. J., DeBellard, M. E., Saffell, J. L., Doherty, P., Walsh, F. S., et Filbin, M. T. (1997b) Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found in vivo inhibits axonal regeneration. *MolecCellNeurosci* **9**, 333-346.
- Tello, F. (1911) La influencia del neurotropismo en la rgeneracion de los centros nerviosos. *Trab Lab Invest Biol* **9**, 123-159.
- Teng, Y. D., et Wrathall, J. R. (1997) Local blockade of sodium channels by tetrodotoxin ameliorates tissue loss and long-term functional deficits resulting from experimental spinal cord injury. *J Neurosci* **17**, 4359-66.
- Tetzlaff, W., Alexander, S. W., Miller, F. D., et Bisby, M. A. (1991) Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43. *Journal of Neuroscience* **11**, 2528.

- Thanos, S. (1988) Alterations in the morphology of ganglion cell dendrites in the adult rat retina after optic nerve transection and grafting of peripheral nerve segments. *Cell Tissue Res* **254**, 599-609.
- Thanos, S. (1991) Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration. *Neurosci Lett* **127**, 108-12.
- Thanos, S., Mey, J., et 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**, 455-66.
- Thompson, S. W., Hunt, R.D. (1966) *Selected histochemical and histopathological methods*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Tigyi, G., Fischer, D. J., Sebok, A., Yang, C., Dyer, D. L., et Miledi, R. (1996) Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide -  $Ca^{+2}$  signaling and Rho. *Journal of Neurochemistry* **66**, 537-548.
- van Leeuwen, F. N., Kain, H. E. T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Kranenburg, O. W., et Collard, J. G. (1997) The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol* **139**, 797-807.
- Vidal-Sanz, M., Bray, G. M., et Aguayo, A. J. (1991) Regenerated synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons [published erratum appears in *J Neurocytol* 1992 Mar;21(3):234]. *J Neurocytol* **20**, 940-52.
- Vidal-Sanz, M., Bray, G. M., Villegas-Perez, M. P., Thanos, S., et Aguayo, A. J. (1987) Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* **7**, 2894-909.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Perez, M. P., Bray, G. M., et Aguayo, A. J. (1988) Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. *Exp Neurol* **102**, 92-101.

- Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., Bray, G. M., et Aguayo, A. J. (1988) Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* **8**, 265.
- Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G. M., et Aguayo, A. J. (1993) Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* **24**, 23-36.
- Volonte, C., et Greene, L. A. (1992) Nerve growth factor-activated protein kinase N. Characterization and rapid near homogeneity purification by nucleotide affinity-exchange chromatography. *J Biol Chem* **267**, 21663-70.
- Volonte, C., Rukenstein, A., Loeb, D. M., et Greene, L. A. (1989) Differential inhibition of nerve growth factor responses by purine analogues: correlation with inhibition of a nerve growth factor- activated protein kinase. *J Cell Biol* **109**, 2395-403.
- Wadsworth, W. G., Bhatt, H., et Hedgecock, E. M. (1996) Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local netrin cues for guiding migrations in *C. elegans*. *Neuron* **16**, 35-46.
- Wagner, H. J. (1980) Light-dependent plasticity of the morphology of horizontal cell terminals in cone pedicles of fish retinas. *J Neurocytol* **9**, 573-90.
- Walther, C., et Gruss, P. (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435-49.
- Wamil, A. W., Wamil, B. D., et Hellerqvist, C. G. (1998) CM101-mediated recovery of walking ability in adult mice paralyzed by spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13188-93.
- Wang, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., et Tessier-Lavigne, M. (1999) Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J Neurosci* **19**, 4938-47.

- Wang, X., Messing, A., et David, S. (1997) Axonal and nonneuronal cell responses to spinal cord injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein. *Exp Neurol* **148**, 568-76.
- Warren, J. T., Jr., Chandrasekhar, A., Kanki, J. P., Rangarajan, R., Furley, A. J., et Kuwada, J. Y. (1999) Molecular cloning and developmental expression of a zebrafish axonal glycoprotein similar to TAG-1. *Mech Dev* **80**, 197-201.
- Watanabe, M., Rutishauser, U., et Silver, J. (1990) Formation of the retinal ganglion cell and optic fiber layers. *Journal of Neurobiology* **22**, 85-96.
- Watanabe, M., Sawai, H., et Fukuda, Y. (1995) Number and dendritic morphology of retinal ganglion cells that survived after axotomy in adult cats. *J Neurobiol* **27**, 189-203.
- Weibel, D., Cadelli, D., et Schwab, M. E. (1994) Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain Res* **642**, 259-266.
- Weise, J., Isenmann, S., Klocker, N., Kugler, S., Hirsch, S., Gravel, C., et Bahr, M. (2000) Adenovirus-mediated expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) rescues axotomized rat retinal ganglion cells but does not support axonal regeneration in vivo. *Neurobiol Dis* **7**, 212-23.
- Whiteley, S. J., Sauve, Y., Aviles-Trigueros, M., Vidal-Sanz, M., et Lund, R. D. (1998) Extent and duration of recovered pupillary light reflex following retinal ganglion cell axon regeneration through peripheral nerve grafts directed to the pretectum in adult rats. *Exp Neurol* **154**, 560-72.
- Widmer, F., et Caroni, P. (1993) Phosphorylation-site mutagenesis of the growth-associated protein GAP-43 modulates its effects on cell spreading and morphology. *J Cell Biol* **120**, 503-12.



- Winberg, M. L., Mitchell, K. J., et Goodman, C. S. (1998) Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell* **93**, 581-91.
- Wolf, J. A., Stys, P. K., Lusardi, T., Meaney, D., et Smith, D. H. (2001) Traumatic axonal injury induces calcium influx modulated by tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *J Neurosci* **21**, 1923-30.
- Wong, J. T., Wong, S. T., et O'Connor, T. P. (1999) Ectopic semaphorin-1a functions as an attractive guidance cue for developing peripheral neurons. *Nat Neurosci* **2**, 798-803.
- Wouters, B. C., Bock-Samson, S., Little, K., et Norden, J. J. (1998) Up-regulation of fast-axonally transported proteins in retinal ganglion cells of adult rats with optic-peroneal nerve grafts. *Brain Res Mol Brain Res* **53**, 53-68.
- Yan, Q., Wang, J., Matheson, C. R., et Urich, J. L. (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol* **38**, 382-90.
- Yazulla, S., et Studholme, K. M. (1992) Light-dependent plasticity of the synaptic terminals of Mb bipolar cells in goldfish retina. *J Comp Neurol* **320**, 521-30.
- Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, I. R., Weiner, H., et Schwartz, M. (2001) Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci* **21**, 3740-8.
- Yoles, E., Muller, S., et Schwartz, M. (1997) NMDA-receptor antagonist protects neurons from secondary degeneration after partial optic nerve crush. *J Neurotrauma* **14**, 665-75.
- Yoles, E., et Schwartz, M. (1998) Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve. *Arch Ophthalmol* **116**, 906-10.

- Young, M. J., et Lund, R. D. (1998) The retinal ganglion cells that drive the pupilloconstrictor response in rats. *Brain Res* **787**, 191-202.
- Yuan, W., Zhou, L., Chen, J. H., Wu, J. Y., Rao, Y., et Ornitz, D. M. (1999) The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol* **212**, 290-306.
- Zagrebelsky, M., Buffo, A., Skerra, A., Schwab, M. E., Strata, P., et Rossi, F. (1998) Retrograde regulation of growth-associated gene expression in adult rat Purkinje cells by myelin-associated neurite growth inhibitory proteins. *J Neurosci* **18**, 7912-29.
- Zeng, B. Y., Anderson, P. N., Campbell, G., et Lieberman, A. R. (1994) Regenerative and other responses to injury in the retinal stump of the optic nerve in adult albino rats: transection of the intraorbital optic nerve. *J Anat* **185**, 643-61.
- Zhang, Y., Campbell, G., Anderson, P. N., Martini, R., Schachner, M., et Lieberman, A. R. (1995) Molecular basis of interactions between regenerating adult rat thalamic axons and Schwann cells in peripheral nerve grafts I. Neural cell adhesion molecules. *J Comp Neurol* **361**, 193-209.
- Ziv, N. E., Spira, M.E. (1998) Induction of growth cone formation by transient and localized increases of intracellular proteolytic activity. *J Cell Biol* **140**, 223-232.

## ANNEXE I – ATA ET SURVIE CELLULAIRE

*Ces expériences ont été menées par l'auteur de la thèse et par P. Sapiuha, du laboratoire du Dr. Adriana Di Polo, Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal.*

### INTRODUCTION

Heiduschka *et al.* (2000) ont proposé l'utilisation d'un antiapoptotique, l'acide aurintricarboxylique (ATA), pour favoriser la survie des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) après axotomie. Dans le but de développer une double approche thérapeutique où notre vaccin pro-régénératif serait associé à un agent neuroprotecteur, nous avons testé l'ATA après microécrasement du nerf optique.

### MÉTHODES

Nous avons effectué, chez des rates Sprague-Dawley (180-200 g), une lésion du nerf optique gauche par microécrasement intra-orbital. Une semaine avant la lésion, les CGR avaient été marquées par application de Fluorogold sur les collicules supérieurs. Un jour après lésion, nous avons injecté dans le corps vitré, par une approche rétrograde trans-sclérotique, 7.8 µg d'ATA dans 10 µl de solution saline tamponnée contenant 10% de DMSO. L'injection a été effectuée avec une seringue Hamilton, sans endommager le cristallin. Nous avons pratiqué une petite incision dans la cornée pour limiter la pression oculaire vu le fort volume injecté. Les rétines ont été examinées et les CGR dénombrées à 2 semaines post-lésion. Cette expérimentation était la même que celle d'Heiduschka *et al.*

(2000), à la différence que ces auteurs ont effectué une section complète, chez des rats Sprague-Dawley mâles (200-250 g), et qu'ils ont marqué les CGR par application de cristaux de 4Di-10ASP au site de lésion lors de l'intervention. De plus, ces auteurs ont utilisé un capillaire de verre pour faire l'injection à travers la cornée.

## RÉSULTATS

Heiduschka *et al.* ont rapporté, 2 semaines après section du nerf optique, un taux de survie moyen des CGR de  $59 \pm 10\%$  ( $n=6$ ) après injection d'ATA, de  $18 \pm 5\%$  ( $n=8$ ) après injection du véhicule seulement, et de  $14 \pm 2\%$  ( $n=8$ ) sans injection. Cette survie était exprimée en pourcentage par rapport aux rétines intactes,  $\pm$  l'écart-type.

Nous avons observé, 2 semaines après microécrasement du nerf optique, un taux de survie moyen des CGR de  $11 \pm 3\%$  ( $n=7$ ) après injection d'ATA, et de  $10 \pm 3\%$  ( $n=5$ ) sans injection (Tableau I).

avec injection d'ATA										
	<i>animal #</i>	B1	B2	M1	M2	M3	M4	M5	moyenne	écart-type
CGR/mm <sup>2</sup> œil gauche		334	321	150	210	274	322	201	231	67
CGR/mm <sup>2</sup> œil droit		2342	2153	1847	2456	2444	2468	2227	2288	266
% de survie		14%	15%	8%	9%	11%	13%	9%	11%	3%
sans injection										
	<i>animal #</i>	<u>220</u>	<u>221</u>	<u>222</u>	<u>223</u>	<u>224</u>			moyenne	écart-type
CGR/mm <sup>2</sup> œil gauche		283	191	176	271	327			250	64
CGR/mm <sup>2</sup> œil droit		2168	2441	2268	2545	2608			2406	185
% de survie		13%	8%	8%	11%	13%			10%	3%

Tableau I. Survie des cellules ganglionnaires de la rétine 2 semaines après microlésion.

## RÉFÉRENCE

Heiduschka, P., et Thanos, S. (2000) Aurintricarboxylic acid promotes survival and regeneration of axotomised retinal ganglion cells in vivo. *Neuropharmacology* **39**, 889-902.

## ANNEXE II – MARQUAGE DU CORTEX MOTEUR

*Ces expériences ont été menées par l'auteur de la thèse en collaboration avec P. Dergham, du laboratoire du Dr. Lisa McKerracher, Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal.*

### INTRODUCTION

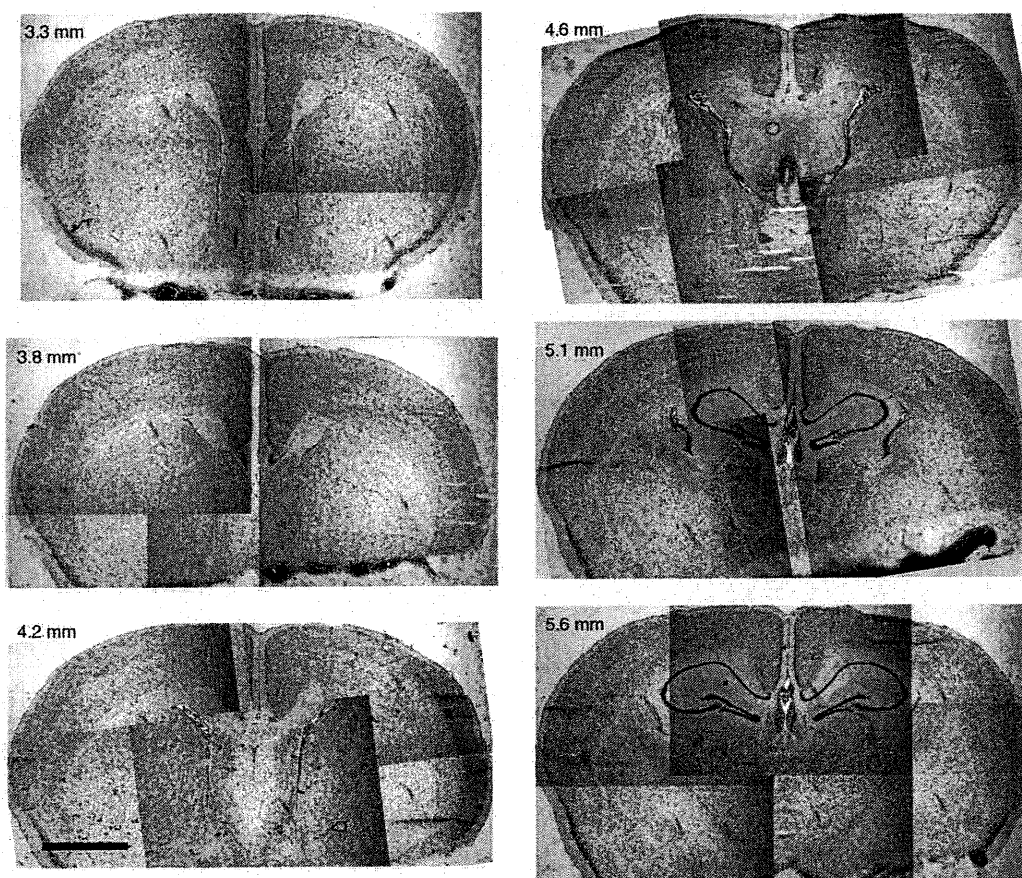
L'expression de GAP-43 dans les neurones est un corrélat de leur état régénératif. Dans le but de déterminer si les neurones du cortex moteur sont en mode régénératif après section du faisceau cortico-spinal et traitement pro-régénératif avec C3, nous souhaitons examiner l'expression de l'ARNm de GAP-43 dans le cortex moteur par hybridation *in situ*. Comme expérience préalable, nous avons dû localiser les neurones du cortex moteur qui sont axotomisés par l'hémisection de la moelle épinière pratiquée chez la souris.

### MÉTHODES

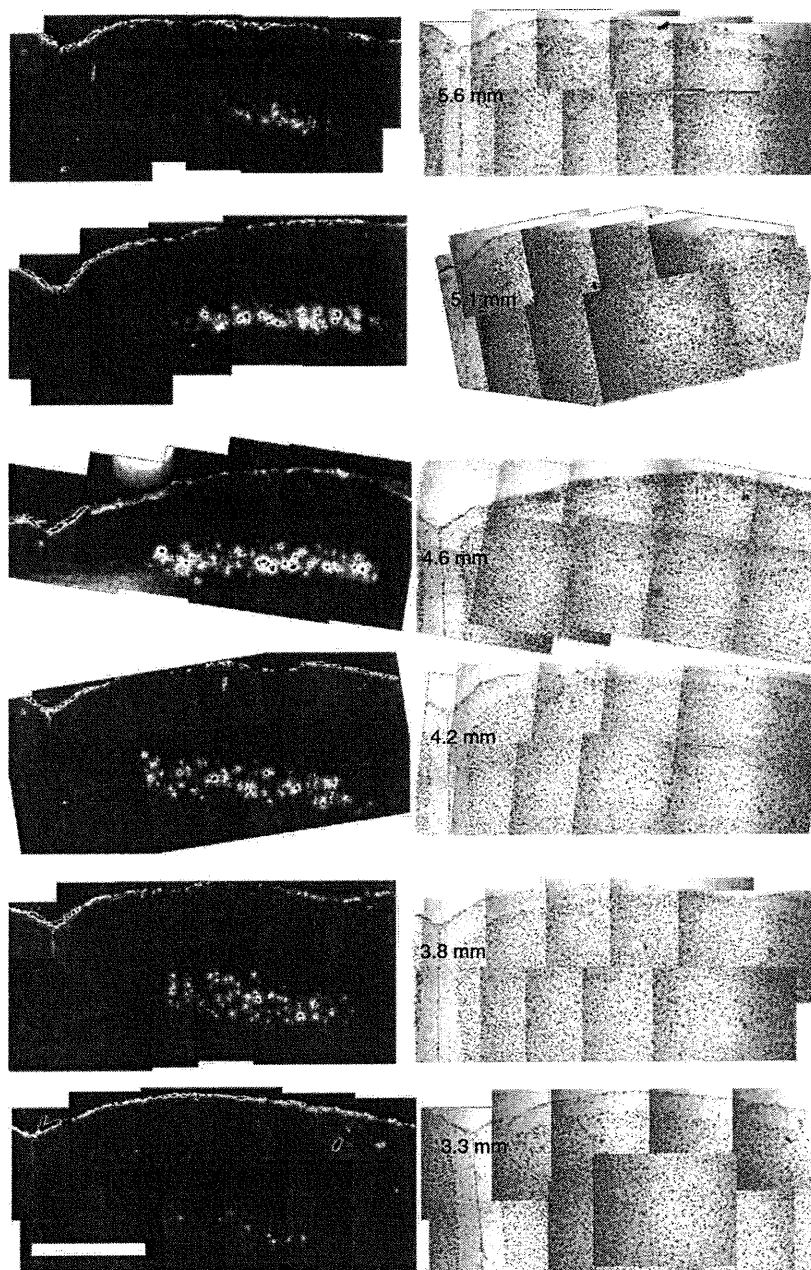
Deux souris ont subi une hémisection de la moelle épinière au niveau T7, tel que décrit par Dergham *et al.* (annexe III). Un morceau de Gelfoam imbibé de Fluorogold a été déposé au site de lésion, pour marquer de façon rétrograde les neurones dont l'axone était sectionné. Après 7 jours, les souris ont été sacrifiées sous anesthésie, par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde 4%. Les cerveaux ont été disséqués, cryoprotégés au sucrose et coupés au cryostat. Les coupes coronales sériées ont été photographiées au microscope à fluorescence, puis marquées au violet de Crésyl et photographiées à nouveau.

## RÉSULTATS

Grâce au marquage rétrograde fluorescent et à la coloration au violet de Crésyl, nous avons pu cartographier les neurones du cortex moteur axotomisés lors de l'hémisection (Figures 1 et 2). Ces données de référence nous ont permis, dans les expériences subséquentes, de retrouver ces cellules sans marquage rétrograde.



*Figure 1.* Coupes coronales colorées au violet de Crésyl. Les chiffres en haut à gauche indiquent la distance de la coupe par rapport à l'extrémité rostrale du cerveau. Les cellules axotomisées par l'hémisection se trouvent entre 3.3 et 5.6 mm, cf. Fig. 2. Échelle : 2 mm.



*Figure 2.* Les cellules marquées au Fluorogold (à gauche) correspondent aux corps cellulaires de grand calibre colorés au violet de Crésyl (à droite). Les neurones axotomisés par l'hémisection sont concentré à une distance de 4.2 – 5.1 mm de l'extrémité rostrale du cerveau. Échelle : 1 mm.

## **ANNEXE III – QUATRIÈME ARTICLE**

« Article soumis »



## Rho Signaling Pathway Targeted to Promote Spinal Cord Repair

Pauline Dergham,<sup>1</sup> Benjamin Ellezam,<sup>1</sup> Charles Essagian,<sup>1</sup> Hovsep Avedissian,<sup>2</sup> William D. Lubell,<sup>2</sup> and Lisa McKerracher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Département de pathologie et biologie cellulaire and* <sup>2</sup>*Département de chimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada.*

Abbreviated Title : Rho signaling inactivation and spinal cord repair

*Address correspondence to:*

Dr. Lisa McKerracher

Département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

C.P. 6128, succursale centre-ville

Montréal, QC H3C 3J7

Phone: (514) 343-7776

Fax: (514) 343-5755

Email: mckerral@ere.umontreal.ca

### Acknowledgements

We thank Dr. Dana Lasko for comments on the manuscript and Charles Essagian for expert technical help. We gratefully acknowledge Maxime Lehmann for help with the synthesis of C3. Supported by the Canadian Institutes of Health Research, a Barbara Turnbull Foundation-CIHR Scholarship (P. D.), and an FCAR-FRSQ scholarship (B. E.). L. M. is a *Chercheur Boursier Senior* of the FRSQ.

## ABSTRACT

The Rho signaling pathway regulates the cytoskeleton and motility and plays an important role in neuronal growth inhibition. Here we demonstrate that inactivation of Rho or its downstream target Rho-associated kinase stimulated neuronal growth in primary cells on different inhibitory substrates. Further, treatment either with C3 to inactivate Rho or with Y-27632 to inhibit ROK was sufficient to stimulate axon regeneration and recovery of hindlimb function after spinal cord injury in adult mice. Injured mice were treated with a single injection of Rho or Rho-associated kinase inhibitors delivered in a protein adhesive at the lesion site. Treated animals showed long-distance regeneration of the corticospinal tract (CST) and increased neuronal levels of GAP-43. Behaviorally, inactivation of Rho pathway induced rapid recovery of locomotion, and progressive recuperation of forelimb-hindlimb coordination. These findings provide evidence that the Rho signaling pathway is a potential target for therapeutic interventions after spinal cord injury.

*Key words: Rho GTPase, C3, corticospinal tract, regeneration, BBB behavior scale, GAP-43, mouse.*

## INTRODUCTION

Mammalian neurons don't regenerate successfully after lesion. This is explained in part by myelin-derived inhibition (Caroni et Schwab, 1988; McKerracher *et al.*, 1994; Mukhopadhyay *et al.*, 1994; Chen, 2000) and the formation of a glial scar expressing inhibitory molecules (Snow *et al.*, 1990; McKeon *et al.*, 1991; Asher *et al.*, 2000). However, numerous studies in animal models using methods designed to overcome the effect of growth inhibitory proteins have confirmed the regenerative potential of the injured spinal cord. These methods includes the use of antibodies (Schnell et Schwab, 1990; Huang *et al.*, 1999), peripheral nerve grafts (Cheng *et al.*, 1996), transplantation of cells into the lesion site (Howland *et al.*, 1995; Rapalino, 1998; Liu *et al.*, 1999; McDonald, 1999; Ramon-Cueto *et al.*, 2000) and limiting the formation of the glial scar (Davies *et al.*, 1999; Moon *et al.*, 2000).

The failure of regeneration in the adult CNS may also be due to changes occurring in mature neurons (Li *et al.*, 1995, 1996; Shen *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2001). Another approach to stimulate regeneration has been to target neurite growth signaling. For example, different neurotrophin treatments have increased the ability of neurons in adult CNS to regenerate and stimulate both axonal growth and sprouting after injury (Schnell *et al.*, 1994; Sawai *et al.*, 1996; Blesch et Tuszynski, 1997; Weidner *et al.*, 1999; Coumans *et al.*, 2001). Neurotrophins are known to delay apoptosis, prevent atrophy of axotomized neurons, and enhance the expression of some growth associated genes (Fournier *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1997; Bregman *et al.*, 1998; Broude *et al.*, 1999). Recent data suggest that neurotrophins might stimulate regeneration by increasing

neuronal cAMP levels to overcome inhibitory signaling (Cai *et al.*, 1999). Therefore, the decreased ability of the mature CNS to regenerate after injury may result from both the intrinsic properties of adult neurons and the extracellular inhibitory environment.

The Rho GTPase is a key intracellular regulator of cytoskeletal dynamics and cell motility (Hall, 1998). Rho is activated when growth cones collapse in response to chemorepulsive factors (Tigyi *et al.*, 1996; Jin et Strittmatter, 1997; Kuhn *et al.*, 1999; Wahl *et al.*, 2000), and inhibiting Rho promotes neurite outgrowth in the presence of myelin (Jin et Strittmatter, 1997; Lehmann *et al.*, 1999). Recently, Rho has been shown to regulate apoptosis (Liu *et al.*, 2001; Trapp *et al.*, 2001). An enzyme from *C. botulinum*, C3 transferase (C3) blocks Rho function by ADP ribosylation of the effector domain (Dillon et Feig, 1995). Y-27632 inhibits Rho-associated kinase (ROK), a serine/threonine protein kinase that is activated by Rho (Ishizaki, 1997; Uehata *et al.*, 1997). Inactivation of ROK with Y-27632 promotes neurite growth, (Katoh *et al.*, 1998; Bito, 2000), but it is not known if it is sufficient to allow neurite growth on inhibitory substrates, as has been shown for Rho inactivation (Lehmann *et al.*, 1999). In the present study, we compare inactivation of Rho or ROK to promote axon growth on inhibitory substrates. We further study in fully adult mice if inactivation of the Rho signaling pathway promotes axon regeneration and functional recovery after spinal cord injury (SCI). Animals treated to inactivate the Rho signalling pathway show significant improvement in locomotion by open field testing. Thus, inactivation of the Rho signalling pathway is an effective method to improve outcome after SCI.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Cell culture***

Primary retinal neurons were isolated from P0-P3 rats as described (Lehmann *et al.*, 1999). Test substrates were plated in 8-well chamber slides coated with 25 µg/ml poly-L-lysine. Myelin substrates were made by coating with 8 µg purified bovine brain myelin dried overnight at room temperature. Chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) substrates were made by incubating 0.5 µg/ml mixed proteoglycans (Chemicon International, Inc. Temecula, California) overnight in poly-L-lysine-coated chamber slides. Dissociated cells were washed, triturated with 25 or 50 µg/ml C3 or buffer, or with 35, 3.5 or 0.35 µM Y-27632, and plated in culture medium with 50 ng/ml BDNF with or without C3 or Y-27632. After 2 days, the plates were fixed with 4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde, and neurons were identified by immunocytochemistry using a βIII tubulin antibody (Sigma, Oakville, Canada). The longest neurite per neuron was measured.

### ***Preparation of recombinant C3 and Y27632***

Recombinant C3 exoenzyme was prepared as a glutathione-S-transferase-C3 fusion protein and stored at -80 °C (Lehmann *et al.*, 1999). Y-27632 was synthesized from α-methylbenzylamine and exhibited identical <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra as reported in US Patent #4,997,834 and US patent #5,478,838. Bioassays to assess activity of C3 and Y-27632 in tissue culture were performed with retinal neurons plated on myelin substrates before use *in vivo*.

### ***Spinal cord injury and delivery of Rho and Rho kinase inhibitors***

Balb-c female mice (n=70) of approximately 20g were anaesthetized with 0.4 ml/kg hypnorm and 5 mg/kg diazepam. A segment of the thoracic spinal cord was exposed using fine rongeurs to remove the bone, and a dorsal over-hemisection was made at T7. Fine scissors were used to cut the dorsal part of the spinal cord, which was cut a second time with a fine knife to ensure the lesion extended past the central canal. A fibrin adhesive delivery system was prepared using a Tisseel VH kit (ImmunoAG, Vienna, Austria). According to manufacturer's instructions for slow polymerization, lyophilized fibrinogen was reconstituted in an aprotinin solution, thrombin was reconstituted in a calcium chloride solution, and both solutions were warmed to 37 °C. C3 (40 µg) or Y-27632 (50 µg) was added to 25 µl of the thrombin solution. This was mixed with 25 µl of the fibrinogen solution just before application to the spinal cord to allow infiltration of the mixture into the lesion site before polymerization. In some animals, 10 µl of the 1 mg/ml C3 solution was added directly to the lesion site before injection of the C3-containing fibrin adhesive. As controls, a second group of animals received fibrin adhesive alone after injury, and a third group was left untreated. Collagen gels with C3 were formed as follows. C3 was lyophilized (40 µg per mouse) then reconstituted in 10 ml of 7.5% NaHCO<sub>3</sub>, and then 25 ml of rat tail collagen at 0.7 mg/ml was added. Ten µl of C3 was added to the lesion cavity before applying the C3 containing collagen gel. For retranssection of the spinal cord 3 weeks after SCI, the spinal cords were cut at T6 as described above, and the animals were observed for changes in behavior by BBB testing for 1 week after the second surgery.

### ***Anterograde labeling***

Three weeks to 3 months after injury, the CST fibers were labeled by injection of the anterograde tracer WGA-HRP into the motor cortex as described (Huang *et al.*, 1999). Two days later, the animals were perfused transcardially with saline, then 4% paraformaldehyde, and the spinal cords and brains were removed. Measurement of axon regeneration was determined from serial 30  $\mu$ m cryostat sections assessed independently by 2 reviewers.

### ***In situ hybridization***

The motor cortex of mice was identified by retrograde tracing with Fluorogold. GAP-43 mRNA was detected on coronal cryostat sections through the motor cortex of animals treated with PBS ( $n=3$ ) or C3 ( $n=3$ ). *In situ* hybridization was performed as described previously (Fournier *et al.*, 1997) with a GAP-43 cRNA probe derived from a plasmid provided by Dr. Pate Skene (Basi *et al.*, 1987).

### ***Behavioral testing***

Behavioral recovery was assessed for one month after SCI in an open field environment by the BBB method (Basso *et al.*, 1995). We modified the 21 point BBB scale to a 17 point score because mice do not exhibit differences in toe drag that can be monitored visually. Thus, scale points 16, 17 and 18 were removed from the scale. Mice raise their tail early in their recovery, and score 19 for tail up position was removed, leaving a 17 point total score. The mouse modified BBB score was as follows: [0] no observable hindlimb (HL) movement; [1] slight movement of one or two joints; [2]

extensive movement of one joint and/or slight movement of one other joint; [3] extensive movement of two joints; [4] slight movement of all three joints of the HL; [5] slight movement of two joints and extensive movement of the third; [6] extensive movement of two joints and slight movement of the third [7] extensive movement of all three joints of the HL, walking with little/no weight support; [8] extensive movement of all three joints, walking with weight support; [9] frequent to consistent dorsal stepping with weight support; [10] frequent plantar stepping with weight support; [11] consistent plantar stepping with weight support, no coordination; [12] consistent plantar stepping with consistent weight support, occasional forelimb-hindlimb (FL-HL) coordination; [13] consistent plantar stepping with consistent weight support, frequent FL-HL coordination; [14] consistent plantar stepping with consistent weight support, consistent FL-HL coordination; predominant paw position during locomotion is rotated internally or externally, or consistent FL-HL coordination with occasional dorsal stepping; [15] consistent plantar stepping with consistent weight support, consistent FL-HL coordination; predominant paw position is parallel to the body; frequent to consistent curled toes, trunk instability; [16] consistent plantar stepping with consistent weight support, consistent FL-HL coordination; predominant paw position is parallel to the body, flat toes, some trunk instability; [17] consistent plantar stepping with consistent weight support, consistent FL-HL coordination; predominant paw position is parallel to the body, flat toes and consistent stability in the locomotion. For scoring, each animal was videotaped for 3 min and 2 reviewers participated. In the late phase of recovery, the BBB score was determined from sequences of 4 steps or more from digitized videos projected on a computer screen at  $\frac{1}{4}$  speed.



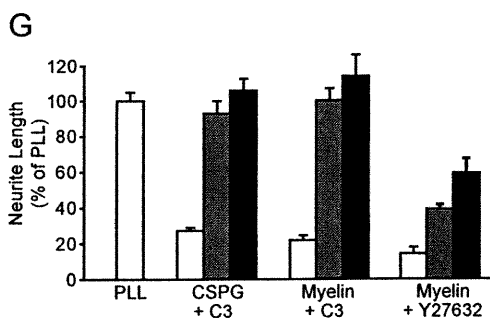
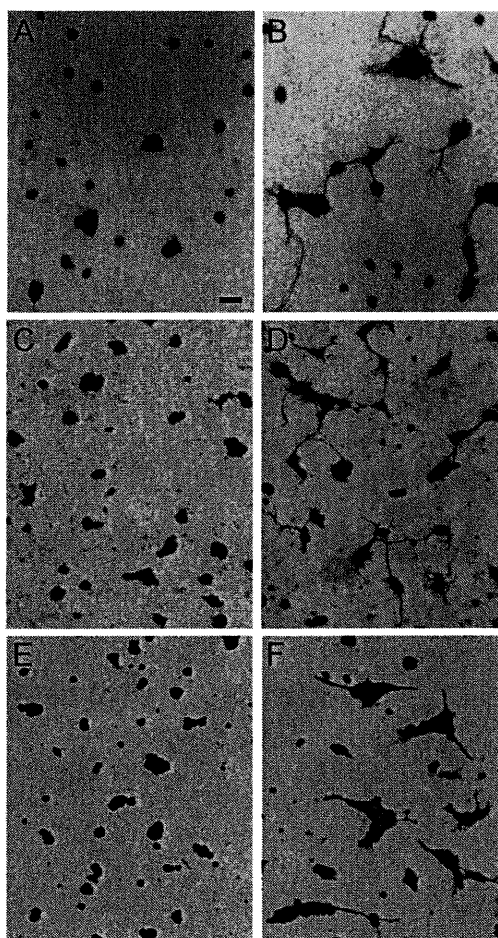
## RESULTS

### ***Inactivation of Rho or ROK promotes growth on primary neurons plated on complex inhibitory substrates***

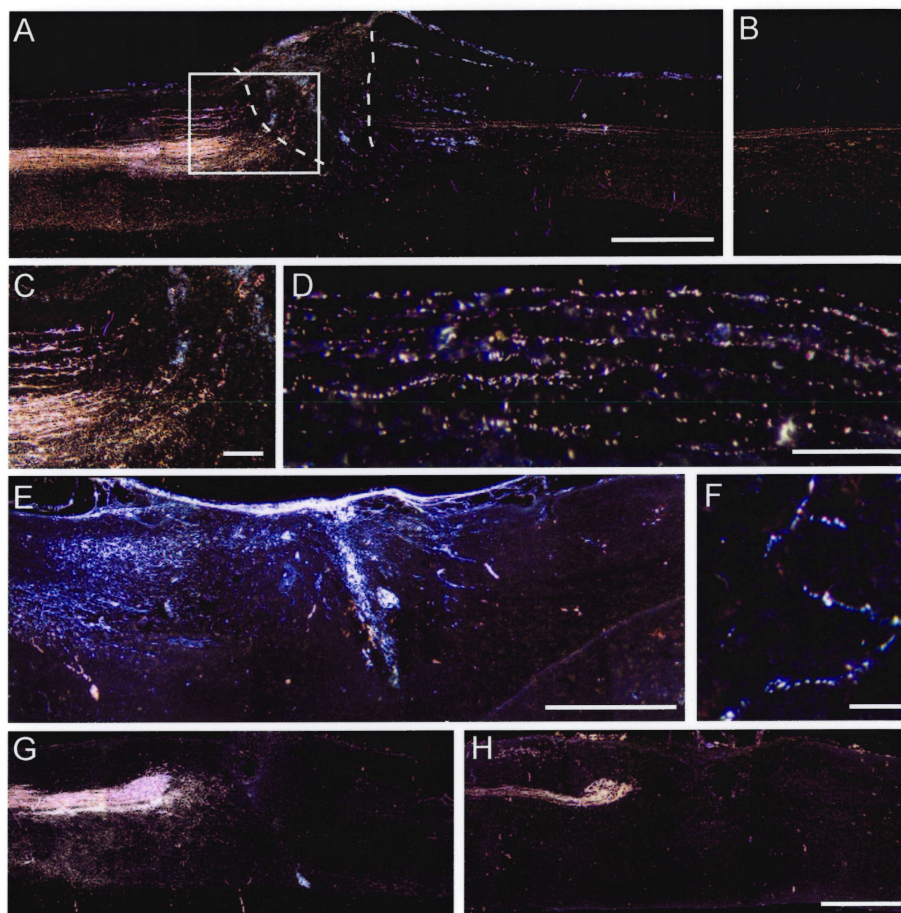
We tested first if treatment of primary neurons with C3 or with Y-27632 was sufficient to stimulate growth on complex inhibitory substrates typical of the glial scar and white matter. Neurons plated on chondroitin sulfate proteoglycans (CSPG) or purified myelin had a rounded shape (Fig. 1A, C and E). After treatment with C3 or Y-27632, neurons plated on complex inhibitory substrates were able to extend neurites (Fig. 1, B, D, F and G). Treatment either with C3 or Y27632 significantly increased the length of neurites compared to untreated cells plated on myelin or CSPG (Fig. 1G). These results demonstrate that inactivation of Rho or inhibition of ROK stimulates retinal neurons to extend neurites on growth inhibitory substrates.

### ***Treatment of injured spinal cord promotes long distance regeneration***

To assess the potential of Rho inactivation to treat SCI, we cut the spinal cord of adult mice at T7 by a dorsal over-hemisection (Huang *et al.*, 1999). We tested local delivery of C3 in collagen (Joosten, 1995) or in a fibrin adhesive (Herbert, 1998) that polymerizes *in vivo* several seconds after injection (Herbert, 1998); Y27632 was tested in the fibrin adhesive. Anterograde tracing with WGA-HRP of corticospinal tract (CST), a tract often used to study histological regeneration, was used to assess fiber growth in six groups of animals: animals treated with fibrin plus C3 ( $n=13$ ), collagen plus C3 ( $n=12$ ), fibrin plus Y27632 ( $n=5$ ), fibrin alone ( $n=10$ ), collagen alone ( $n=7$ ), and SCI with no



*Figure 1.* Effect of rho antagonist C3 or Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on neurite outgrowth of primary neurons plated on inhibitory substrates. A-F, P0 retinal ganglion cells (RGCs) after 48hr plated on (C, E) myelin or (A) CSPG remained rounded and did not extend neurites, but cells plated on (B) CSPG in the presence of C3 or on myelin in the presence of either (D) C3 or (F) Y-27632 showed neuronal growth. G, Results were analyzed quantitatively by measuring the average RGC neurite length of the longest neurite per cell after 48 hr on PLL, CSPG or myelin (white) without treatment, (gray) with 25 µg/ml C3 or 3.5 µM Y-27632 treatment or (black) with 50 µg/ml C3 or 35 µM Y-27632 treatment. Bar, 20 µm.

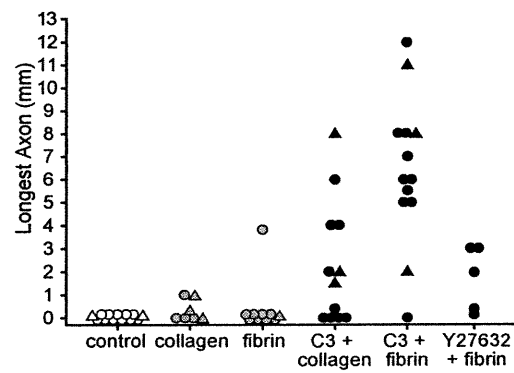


*Figure 2.* Axon regeneration after SCI and treatment with C3. Darkfield micrographs of spinal cord sections, rostral is to the left. A, Anterogradely-labeled CST fibers in a C3-treated spinal cord 3 weeks after injury. The lesion site is between the dotted lines. B, Same section as A, 12 mm caudal to the lesion site. C, Higher magnification of boxed region in A to show regenerative sprouting into lesion site and into the dorsal white matter. D, A different section from the same animal as A, showing regenerating fibers 10 mm from the lesion site. E, Anterogradely labeled CST fibers 3 months after SCI sprout into the dorsal white matter and cross the lesion site. The lesion appears as a vertical line. F, Same section as E, taken 8 mm from the lesion site. G, Fibrin-treated control showing some sprouting of lesioned fibers, but no long distance regeneration. H, Anterogradely-labeled fibers retract from the lesion site in an untreated animal. Scale bars, A,B,E,G,H, 500  $\mu$ m; C,D, 100  $\mu$ m; F, 25  $\mu$ m.

treatment ( $n=13$ ) (Fig. 3). Without C3 or Y27632 treatment, transected CST axons retracted back from the site of lesion by approximately 300  $\mu\text{m}$  (Fig. 2H), although in animals treated with fibrin alone some regenerative sprouts did extend from the retracted bundle (Fig. 2G). Application of C3 to the injured spinal cord elicited extensive sprouting into the dorsal white matter and the lesion scar (Fig. 2, A, C, and E). Treated animals with Y-27632 showed regenerative sprouting into the dorsal white matter and toward the lesion site (not shown). To assess axons distal to the lesion site, the distance of the longest axon was measured. Axons were found up to 12 mm from the lesion site in C3 treated animals and up to 3 mm from the lesion site in Y-27632 treated animals (Fig. 3), while buffer-treated animals showed retraction from the lesion site. Therefore, after treatment with C3 or with Y-27632, axons were found to extend past the lesion into the distal white matter. These axons have a twisted course of growth typical of regenerated axons (Figs. 2D and 2F). However, these experiments alone cannot rule out the possibility of protective axon sparing. This could arise in the damaged CNS if not all the axons were completely cut because C3 has neuroprotective effects (Liu *et al.*, 2001; Trapp *et al.*, 2001), in addition to promoting growth on inhibitory substrates (Fig. 1).

#### ***Effect of C3 on the expression of GAP-43 mRNA in the motor cortex of spinal cord injured animals***

After thoracic spinal cord lesion, only axons that regenerate long distances show upregulation of GAP-43 mRNA expression (Ferandes *et al.*, 1999). To confirm the growth response and the long-distance regeneration following Rho inactivation, we examined the pattern of GAP-43 mRNA expression in the motor cortex (Fig. 4, A and B) of animals 1 month after CST transection with or without treatment with C3. *In situ*

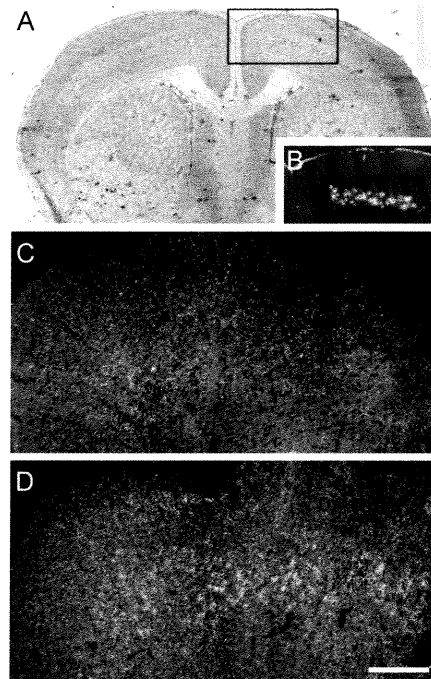


*Figure 3.* Quantification of regeneration length. Longest regeneration distances after SCI alone or treatment with vehicle, rho antagonist C3, or Rho kinase inhibitor Y27632. Each point represents one animal. The circles are animals examined 3 weeks to one month after SCI, the triangles animals examined at 3 months.

hybridization using S<sup>35</sup>-labelled riboprobes on coronal brain sections revealed high levels of GAP-43 mRNA expression in neurons of the motor cortex of C3-treated animals (Fig. 4D), whereas untreated animals showed no detectable GAP-43 signal above background (Fig. 4C). These results indicate that C3 treatments elicit changes in gene expression consistent with axon regeneration.

### ***Behavioral testing***

To test functional recovery after SCI and C3 or Y27632 treatment, we measured HL motor function using the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) locomotor rating scale (Basso *et al.*, 1995) (n=37). Since a toe clearance phase cannot be evaluated in recuperating mice, we modified the rating to a 17 point scale (see material and methods). Twenty-four hr after surgery, control mice were paraplegic (Fig. 5A) and moved by pulling themselves forward with their forelimbs (Fig. 5B). Mice treated with C3 or with Y27632 showed a remarkable recovery within 24 hr (Fig. 5A), already walking with weight support (Fig. 5A and C, movie 1). While this early recovery is too rapid to be explained by long distance regeneration, possible mechanisms include local reorganization of central pattern generator circuitry (Ribotta *et al.*, 2000), pharmacological activation of neurotransmitter receptors (Rossignol *et al.*, 2000) or neuroprotection (Laufs *et al.*, 2000; Trapp *et al.*, 2001). Mice that had received C3 or Y27632 treatment continued to recover over the 1 month period of observation, and exhibited hindlimb-forelimb coordination (Fig. 5, E and G) (movie 2). By contrast, the average recovery plateau for untreated animals was limited to unstable walking without hindlimb-forelimb coordination (Fig. 5, D and F) (movie 2). Retranssection of the spinal



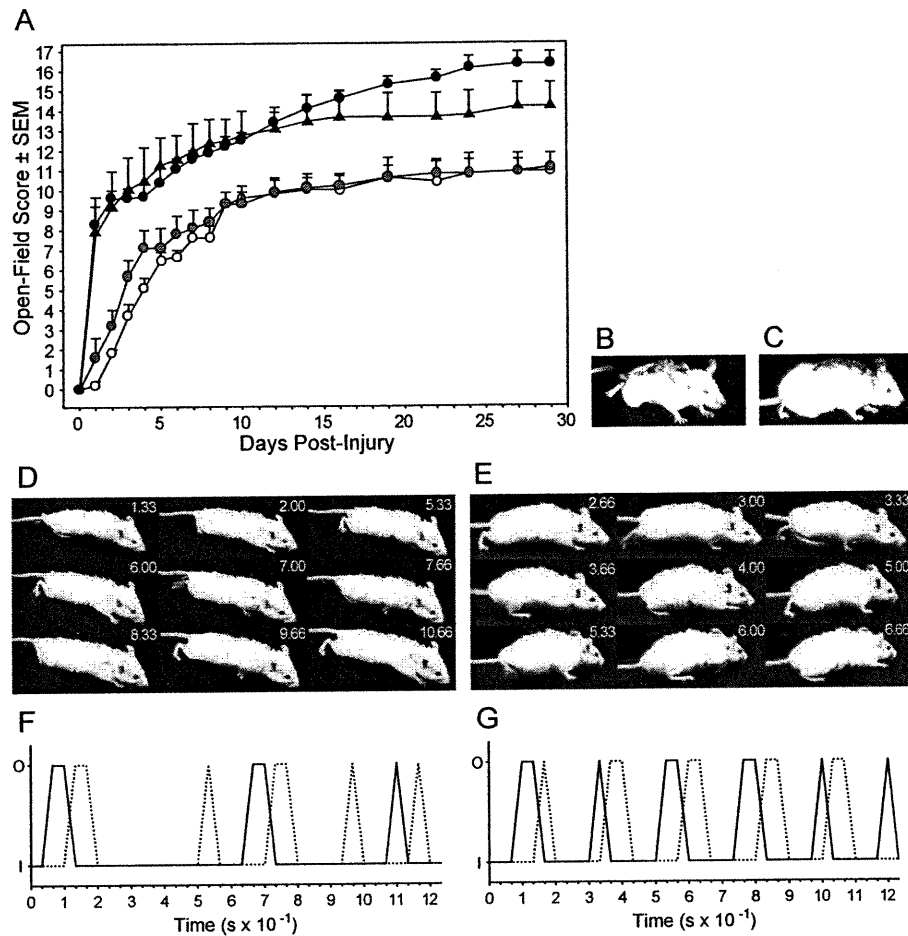
*Figure 4.* Expression of GAP-43 mRNA in motor cortex. A, Photomicrograph of a cresyl violet stained coronal section of mouse brain. Box outlines motor cortex area depicted in (B-D). B, Fluorescent micrograph of same section as in (A) showing neurons retrogradely labeled with Fluorogold applied at the site of a dorsal hemisection at T7. C and D, Darkfield photomicrographs showing sections of motor cortex from (C) an untreated mouse or (D) a C3/fibrin-treated mouse following in situ hybridization for GAP-43. Note the increased signal after treatment with C3. Scale bar, A, 1.8 mm; B, 1.2 mm; C,D, 250  $\mu$ m.

cord at 3 weeks ( $n=8$ ) eliminated any achieved hindlimb recovery in both C3 treated ( $n=5$ ) and control ( $n=3$ ) animals (data not shown).

## DISCUSSION

The failure of axon regeneration in the spinal cord is due, at least in part, to the growth inhibitory properties of white matter and of the lesion site. The Rho signalling pathway is known to be important both for the cell response to growth inhibition (Lehmann *et al.*, 1999) and for neuroprotection (Trapp *et al.*, 2001). We report here that inactivation of either Rho or of Rho kinase is sufficient to allow axon growth on inhibitory substrates, and leads to improved recovery after SCI. C3 ribosylates asparagine 41 in the effector domain to inactivate Rho (Sekine *et al.*, 1989). Whereas Y-27632 inhibits the kinase activity of ROK by competing with ATP for binding to the kinase (Ishizaki, 1997; Uehata *et al.*, 1997). Our studies target these two different parts of the Rho signaling pathway to demonstrate the importance of Rho pathway signaling for CNS repair. Both C3 and Y-27632 promoted recovery of function and axon growth, but C3 was more effective than Y-27632. The difference between the effects of C3 and Y-27632 suggest the presence of another effector of Rho that is inactivated by C3 but not by Y-27632. Rho not only signals to ROK, but also to protein kinase N (Amano *et al.*, 1996), rhotekin and other targets (Reid *et al.*, 1996). We observed that C3 was more effective than Y-27632 in stimulating RGC neurite growth on inhibitory substrates, in promoting axon regeneration *in vivo*, and in promoting functional recovery. Therefore, for CNS repair, Rho appears to be a more efficient target than ROK.





**Figure 5.** Analysis of functional recovery. **A**, Modified BBB scores of (black circles) C3-treated ( $n=11$ ), (black triangles) Y27632-treated ( $n=5$ ), (grey circles) fibrin-treated ( $n=11$ ) and (open circles) untreated ( $n=10$ ) mice to evaluate recovery of locomotion during the month following dorsal over-hemisection. **B**, Photograph of a spinal cord injured mouse 24 hr after injury; HL cannot support body weight. **C**, Photograph of a C3/fibrin-treated mouse 24 hr after injury; body weight is supported by HL. **D** and **E**, Selected videoframes of representative untreated and C3/fibrin-treated mice, respectively, to show differences in recovery of hindlimb-forelimb coordination 30 days after lesion. Whereas C3-treated mice alternate front paw and foot placements properly, untreated mice do not show one to one correspondence between HL and FL stepping. Numbers refer to elapsed time in tenths of seconds. **F** and **G**, For the mice depicted in (**D**) and (**E**), respectively, hindlimb-forelimb coordination is represented graphically. The position of (solid line) the right hind paw and (dotted line) the right front paw (I) on or (O) off the ground was noted for each one of 38 sequential videoframes. The untreated mouse in (**D**) moves its forelimb twice fore each HL step.

The remarkable improvement in function within one day of spinal cord lesion and treatment with C3 or Y-27632 may be due to increased neuroprotection in the lesioned spinal cord. Neuroprotection by itself is important for improved functional recovery after SCI (Pencalet *et al.*, 1993; Gaviria *et al.*, 2000), and an growing volume of literature suggests that the application of C3 to ischemic CNS tissue has neuroprotective effects (Laufs *et al.*, 2000; Trapp *et al.*, 2001). Moreover, it has been demonstrated that the application of C3 following middle cerebral artery occlusion reduces infarct volumes (Trapp *et al.*, 2001). Therefore, Rho signaling pathway is a good target to both prevent cell death and stimulate regeneration. The ability of C3 and Y-27632 to block unwanted effects of Rho activation, cell death and neurite retraction, are likely to contribute importantly to improved outcome after SCI. It is also possible that C3 and Y-27632 treatments affected other cells, such as leukocytes; immediate improvement in functional recovery after SCI has been observed 24 h after treatment with gabexate mesilate, a protease inhibitor that inhibits activation of leukocytes (Taoka, 1997). Therefore, the short-term effects that we observe after treatment with C3 or Y-27632 are likely caused by the ability of these compounds to limit the cell damage that occurs immediately after injury.

It should be kept in mind that mice show important differences from rats in their response to spinal cord injury, most notably the absence of necrotic cavitation (Steward *et al.*, 1999). In our experiments, we used an over-hemisection of the spinal cord to test if Rho or ROK inactivation were able to promote repair. Many strategies that work well to promote regeneration after hemisection are not effective after complete transection of the spinal cord. It has been shown that sparing of ventrolateral fibers may translate into

significant differences in locomotor performance (Brustein, 1998) since these fibers are important in the initiation and control of locomotor pattern through spinal central pattern generators (reviewed by Rossignol *et al.*, 2000). Sprouting of uninjured collaterals (Weidner *et al.*, 2001) or sprouting of fibres that are part of the circuitry of the spinal cord (Giménez y Ribotta, 2000) are likely to contribute importantly to repair. It was recently demonstrated that reorganization of spared pathways also contributes to functional recovery (Raineteau *et al.*, 2001). Thus, inactivation of Rho may help stimulate and enhance the spontaneous repair process that leads to limited recovery after dorsal hemisection of control animals.

To study the effects of C3 and Y-27632 on axons *in vivo*, we chose to study the CST because it is one of the best characterized tracts for studies of axon regeneration in the spinal cord. Moreover, the CST can be anterogradely labeled, and in mice, most of the fibers within the CST are located just above the central canal in the dorsal spinal cord. The dorsal over-hemisection that we used for our studies would eliminate not only the CST fibers but also other dorsal and lateral descending pathways while sparing the ventral pathways essential for locomotion. We demonstrated with our *in vitro* studies that treatment with C3 or Y27632 can stimulate axon growth on inhibitory substrates. *In vivo*, we observed sprouting and long-distance regeneration. It is well documented that reorganization of collateral CST fibres occurs after SCI (Weidner *et al.*, 2001). Also, dendritic remodelling of neurons can be enhanced by inactivation of Rho (Ruchhoeft, 1999). Thus, inactivation of Rho, which is known to affect both axons and dendrites, is likely to enhance spontaneous plasticity of axons and dendrites, leading to functional remodelling of spinal cord circuitry.

The BBB openfield locomotor test cannot be correlated with the regeneration of specific tracts. While the late recovery of hindlimb-forelimb coordination we observe at one month is consistent with regeneration of cut fibres, we cannot completely rule out the possibility of protective sparing, as reported with other strategies that promote repair after CNS injury (Lazarov-Spiegler *et al.*, 1996; Hauben *et al.*, 2000). However, our observation that GAP-43 is up-regulated in the motor cortex is consistent with the interpretation that anterogradely CST fibers past the injury site represent regenerated fibers. Increased GAP-43 expression correlates with regeneration of rubrospinal neurons, and projection neurons do not express GAP-43 after thoracic injury alone (Ferandes *et al.*, 1999). Therefore the upregulation of GAP-43 expression is a good indicator for long distance regeneration. Notwithstanding the mechanism, we observed long-term improvements in BBB outcomes, even in animals where substantial CST labelling was not observed. Therefore, many factors (neuroprotection, remodelling and regeneration) and many fiber tracts (dorsal and ventral) are likely to contribute to functional recovery after SCI and treatment with Rho or Y-27632. These treatments that potentiate spontaneous functional recovery in open field tests give hope that effective treatment for spinal cord injury will be developed in the foreseeable future. The treatment we have developed to promote functional recovery and axonal regeneration after SCI is simple: an inhibitor of Rho signalling pathway injected at the lesion site in a tissue adhesive. These studies show the potential for a new, straightforward treatment to reduce functional impairment after SCI.

## REFERENCES

- Amano, M., Mukai, H., Ono, Y., Chihara, K., Matsui, T., Hamajima, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., et Kaibuchi, K. (1996) Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* **271**, 648-50.
- Asher, R. A., Morgenstern, D. A., Fidler, P. S., Adcock, K. H., Oohira, A., Braistead, J. E., Levine, J. M., Margolis, R. U., Rogers, J. H., et Fawcett, J. W. (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* **20**, 2427-38.
- Basi, G. S., Jacobson, R. D., Virag, I., Schilling, J., et Skene, J. H. (1987) Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. *Cell* **49**, 785-791.
- Basso, D. M., Beattie, M. S., et Bresnahan, J. C. (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* **12**, 1-21.
- Bito, H., Furuyaashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Nurumiya, S. (2000) A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron* **26**, 431-441.
- Blesch, A., et Tuszynski, M. H. (1997) Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol* **148**, 444-52.
- Bregman, B. S., Broude, E., McAtee, M., et Kelleey, M. S. (1998) Transplants and neurotrophic factors prevent atrophy of mature CNS neurons after spinal cord injury. *Exp Neurol* **149**, 13-27.
- Broude, E., McAtee, M., Kelley, M. S., et Bregman, B. S. (1999) Fetal spinal cord transplants and exogenous neurotrophic support enhance c-Jun expression in mature axotomized neurons after spinal cord injury. *Exp Neurol* **155**, 65-78.

- Brustein, E. a. R., S. (1998) Recovery of locomotion after ventral and ventrolateral spinal lesions in the cat. I. Deficits and adaptive mechanisms. *J Neurophysiol* **80**.
- Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B. S., et Filbin, M. T. (2001) Neuronal cyclic amp controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci* **21**, 4731-9.
- Cai, D., Shen, Y., DeBellard, M. E., Tang, S., et Filbin, M. T. (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* **22**, 89-101.
- Caroni, P., et Schwab, M. E. (1988) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *JCell Biol* **106**, 1281-1288.
- Chen, M. S., Huber, A.B., van der Haar, M., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A.A., Christ, F., Schwab, M.E. (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* **403**, 434-438.
- Cheng, H., Cao, Y., et Olson, L. (1996) Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* **273**, 510-513.
- Coumans, J. V., Lin, T. T., Dai, H. N., MacArthur, L., McAtee, M., Nash, C., et Bregman, B. S. (2001) Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci* **21**, 9334-44.
- Davies, S. J. A., Goucher, D. R., Doller, C., et Silver, J. (1999) Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* **19**, 5810-5822.
- Dillon, S. T., et Feig, L. A. (1995) *Purification and assay of recombinant C3 transferase.*, Vol. 256. Academic Press, Toronto.
- Ferandes, K. J., Fan, D. P., Tsui, B. J., Cassar, S. L., et Tetzlaff, W. (1999) Influence of the axotomy to cell body difference in rat rubrospinal and spinal motoneurons:

- differential regulation of GAP-43, tubulins and neurofilament-M. *J Comp Neurol* **414**, 495-510.
- Fournier, A. E., Beer, J., Arregui, C. O., Essagian, C., Aguayo, A. J., et McKerracher, L. (1997) Brain-derived neurotrophic factor modulates GAP-43 but not  $T\alpha 1$  expression in injured retinal ganglion cells of adult rats. *J Neurosci Res* **47**, 561-572.
- Gaviria, M., Privat, A., d'Arbigny, P., Kamenka, J. M., Haton, H., et Ohanna, F. (2000) Neuroprotective effects of gacyclidine after experimental photochemical spinal cord lesion in adult rats: dose-window and time-window effects. *J Neurotrauma* **17**, 19-30.
- Giménez y Ribotta, M., Provencher, J., Feraboli-Lohnherr, D., Rossignol, S., Privat, A., and Orsal, D. (2000) Activation of Locomotion in Adult Chronic Spinal Rats Is Achieved by Transplantation of Embryonic Raphe Cells Reinnervating a Precise Lumbar Level. *J Neurosci* **20**, 5144-5152.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.
- Hauben, E., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, I. R., et Schwartz, M. (2000) Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet* **355**, 286-7.
- Herbert, C. B., Nagaswami, C., Bittner, G. D., Hubbell (1998) Effects of fibrin micromorphology on neurite growth from dorsal root ganglia cultured in three-dimensional fibrin gels. *J Biomed Mater Res* **40**, 551-559.
- Howland, D. R., Bregman, B. S., Tessler, A., et Goldberger, M. E. (1995) Transplants enhance locomotion in neonatal kittens whose spinal cords are transected: a behavioral and anatomical study. *Exp Neurol* **135**, 123-145.
- Huang, D. W., McKerracher, L., Braun, P., et David, S. (1999) A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* **24**, 639-647.

- Ishizaki, T., Naaito, M., Fujisawa, K., Maekawa, M., Watanabe, N., Saito, Y., Narumiya, S. (1997) p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett* **404**, 118-124.
- Jin, Z., et Strittmatter, S. M. (1997) Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci* **17**, 6256-6263.
- Joosten, E. A. J., Bar, P. R., Gispen, W. H. (1995) Collagen implants and cortico-spinal axonal growth after mid-thoracic spinal cord lesion in the adult rat. *J Neurosci Res* **41**, 481-490.
- Katoh, H., Aoki, J., Ichikawa, A., et Negishi, M. (1998) p160 RhoA-binding kinase ROK $\alpha$  induces neurite retraction. *J Biol Chem* **273**, 2489-2492.
- Kobayashi, N. R., Fan, J., Giehl, K. M., Bedard, A. M., Weigand, S. J., et Tetzlaff, W. (1997) BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and T $\alpha$ 1 tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci* **17**, 9583-9595.
- Kuhn, T. B., Brown, M. D., Wilcox, C. L., Raper, J. A., et Bamburg, J. R. (1999) Myelin and collapsin-1 induce motor neuron growth cone collapse through different pathways: inhibition of collapse by opposing mutants of Rac1. *J Neurosci* **19**, 1965-1975.
- Laufs, U., Endres, M., Stagliano, N., Amin-Hanjani, S., Chui, D. S., Yang, S. X., Simoncini, T., Yamada, M., Rabkin, E., Allen, P. G., Huang, P. L., Bohm, M., Schoen, F. J., Moskowitz, M. A., et Liao, J. K. (2000) Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J Clin Invest* **106**, 15-24.
- Lazarov-Spiegler, O., Solomon, A., Zeev-Bran, A. B., Hirschberg, D. L., Lavie, V., et Schwartz, M. (1996) Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEBJ* **110**, 1296-1302.



- Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., et McKerracher, L. (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci* **19**, 7537-47.
- Li, D., Field, P. M., et Raisman, G. (1995) Failure of axon regeneration in postnatal rat entorhinohippocampal slice coculture is due to maturation of the axon, not that of the pathway or target. *Eur J Neurosci* **7**, 1164-71.
- Li, M., Shibata, A., Li, C., Braun, P. E., McKerracher, L., Roder, J., Kater, S. B., et David, S. (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *J Neurosci Res* **46**, 404-414.
- Liu, A., Cerniglia, G. J., Bernhard, E. J., et Prendergast, G. C. (2001) RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 6192-7.
- Liu, Y., Kim, D., Himes, B. T., Chow, S. Y., Schallert, T., Murray, M., Tessler, A., et Fischer, I. (1999) Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J Neurosci* **19**, 4370-87.
- McDonald, J. W., Lui, X-Z., Qu, Y., Liu, S., Mickey, S.K., Turetsky, D., Gottlieb, D. I., Choi, D.W. (1999) Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Medicine* **12**, 1410-1412.
- McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S., et Silver, J. (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* **11**, 3398-3411.
- McKerracher, L., David, S., Jackson, J. L., Kottis, V., Dunn, R., et Braun, P. E. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite outgrowth. *Neuron* **13**, 805-811.

- Moon, L. D., Brecknell, J. E., Franklin, R. J., Dunnett, S. B., et Fawcett, J. W. (2000) Robust regeneration of CNS axons through a track depleted of CNS glia. *Exp Neurol* **161**, 49-66.
- Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F. S., Crocker, P. R., et Filbin, M. T. (1994) A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* **13**, 805-811.
- Pencalet, P., Ohanna, F., Poulat, P., Kamenka, J. M., et Privat, A. (1993) Thienylphencyclidine protection for the spinal cord of adult rats against extension of lesions secondary to a photochemical injury. *J Neurosurg* **78**, 603-9.
- Raineteau, O., Fouad, K., Noth, P., Thallmair, M., et Schwab, M. E. (2001) Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6929-34.
- Ramon-Cueto, A., Cordero, M. I., Santos-Benito, F. F., et Avila, J. (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* **25**, 425-35.
- Rapalino, O., Lazarov-Spiegler, O., Agranov, E., Velau, G. J., Yoles, E., Fraidakis, M., Solomon, A., Gepstein, R., Katz, A., Belkin, M., Hadani, M., Schwartz, M. (1998) Implantation of stimulated homogenous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nature medicine* **4**, 814-821.
- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., et Narumiya, S. (1996) Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* **271**, 13556-60.
- Ribotta, M. G., Provencher, J., Feraboli-Lohnherr, D., Rossignol, S., Privat, A., et Orsal, D. (2000) Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level. *J Neurosci* **20**, 5144-52.

- Rossignol, S., Bélanger, M., Chau, C., Giroux, N., Brustein, E., Bouyer, L., Grenier, C.-A., Drew, T., Barbeau, H., et Reader, T. (2000) The spinal cat. *In* R. G. Kalb and S. M. Strittmatter (Eds.), *Neurobiology of spinal cord injury*, pp. 57-87. Humana Press, Totowa.
- Ruchhoeft, M. L., Ohnuma, S-I., Holt, C.E., Harris, W. (1999) The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by Rho-family GTPases in vivo. *J Neurosci* **19**, 8454-8463.
- Sawai, H., Clarke, D. B., Kittlerova, P., Bray, G. M., et Aguayo, A. J. (1996) Brain-derived neurotrophic factor and NT-4/5 stimulate the growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells. *JNeurosci* **16**, 3887-3894.
- Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y.-A., et Schwab, M. E. (1994) Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* **367**, 170-173.
- Schnell, L., et Schwab, M. E. (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* **343**, 269-272.
- Sekine, A., Fujiwara, M., et Narumiya, S. (1989) Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **264**, 8602-5.
- Shen, S., Wiemelt, A. P., McMorris, A., et Barres, B. A. (1999) Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* **23**, 285-295.
- Snow, D. M., Lemmon, V., Carrino, D. A., Caplan, A. I., et Silver, J. (1990) Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* **109**, 111-30.
- Steward, O., Schauwecker, P. E., Guth, L., Zhang, Z., Fujiki, M., Inman, D., Wrathall, J., Kempermann, G., Gage, F. H., Saatman, K. E., Raghupathi, R., et McIntosh, T.

- (1999) Genetic approaches to neurotrauma research: opportunities and potential pitfalls of murine models. *Exp Neurol* **157**, 19-42.
- Taoka, Y., Okajima, K., Uchiba, M., Murakami, K., Kushimoto, S., Johno, M., Naruo, M., Okabe, H., Takatsuki, K. (1997).
- Tigyi, G., Fischer, D. J., Sebok, A., Yang, C., Dyer, D. L., et Miledi, R. (1996) Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide -  $Ca^{+2}$  signaling and Rho. *Journal of Neurochemistry* **66**, 537-548.
- Trapp, T., Olah, L., Holker, I., Besselmann, M., Tiesler, C., Maeda, K., et Hossmann, K. A. (2001) GTPase RhoB: an early predictor of neuronal death after transient focal ischemia in mice. *Mol Cell Neurosci* **17**, 883-94.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., et Narumiya, S. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension [see comments]. *Nature* **389**, 990-4.
- Wahl, S., Barth, H., Coiossek, T., Akoriss, K., et Mueller, B. K. (2000) Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol* **149**, 263-270.
- Weidner, N., Blesch, A., Grill, R. J., et Tuszynski, M. H. (1999) Nerve growth factor-hypersecreting Schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of L1. *J Comp Neurol* **413**, 495-506.
- Weidner, N., Ner, A., Salimi, N., et Tuszynski, M. H. (2001) Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3513-8.

## ANNEXE IV – CINQUIÈME ARTICLE

« Ellezam, B., Dubreuil, C., Winton, M., Loy, L., Dergham, P., Selles-Navarro, I., et McKerracher, L. (2002) Inactivation of intracellular Rho to stimulate axon growth and regeneration. *Prog Brain Res.* Sous presse. »

## **Inactivation of intracellular Rho to stimulate axon growth and regeneration**

Benjamin Ellezam, Catherine Dubreuil, Matthew Winton, Leanna Loy, Pauline Dergham, Inmaculada Sellés-Navarro\*, Lisa McKerracher.

*Département de pathologie et biologie cellulaire et Centre de recherche en sciences neurologiques, Université de Montréal, Québec H3T 1J4, \* Laboratorio de Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Spain.*

**Key words** : GTPase, signaling, optic nerve, growth inhibition, spinal cord injury.

## Introduction

Damage to neuronal function following spinal cord injury (SCI) arises from a complex series of reactions. A key determinant of functional loss after SCI is axon injury at the lesion site. Projection neurons that extend long axons within the spinal tracts are crucial for motor and sensory function, and their axons do not regenerate following transection, even though their cell bodies may remain alive for many years. This regenerative failure is explained in part by the presence of growth inhibitory proteins. These molecules repress axon regeneration by severely limiting the ability of growth cones to extend. Most known growth inhibitory molecules are concentrated in myelin, the white matter territory where projection neurons extend long axons. Other inhibitory proteins such as proteoglycans are expressed by cells that form the scar directly at the lesion site. Therefore, one challenge to stimulate axon regeneration after injury is to overcome the neuronal response to the diverse types of inhibitory proteins that are expressed in the CNS.

As in development, growing axons in regeneration require the formation of a growth cone, the sensorimotor apparatus that forms at the proximal tip of a cut axon soon after injury. Regrowth of a cut axon depends on the coordinated assembly, disassembly and contraction of the actin cytoskeleton in the growth cone, and this process is responsible for the extension and retraction of the axon in response to positive and negative extracellular cues. In the mammalian CNS, it is thought that negative cues that limit regeneration have a stronger influence or are in greater abundance than the positive cues, which explains why growth cones fail to extend very far. In tissue culture, the

response of growth cones to inhibitory molecules is to collapse, and growth cone collapse depends on the balance of inhibitory to growth promoting cues (David *et al.*, 1995; Wenk *et al.*, 2000).

Actin-mediated cell motility is regulated in all cells by the Rho family of GTPases. In neurons, intracellular Rho GTPases regulate the response of growth cones to both chemorepulsive guidance cues and growth inhibitory proteins (Dickson, 2001; Jin and Strittmatter, 1997; Kuhn *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 1999; Wahl *et al.*, 2000). Growth inhibitory proteins that induce growth cone collapse activate Rho, and molecules that promote neurite growth inactivate Rho (Lehmann *et al.*, 1999; Wahl *et al.*, 2000; Wenk *et al.*, 2000). We have investigated whether targeting Rho GTPase activity in neurons can allow them to ignore growth inhibitory signalling and grow directly on inhibitory substrates. The inactivation of Rho not only allows axon growth on myelin and chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) substrates, but also allows axon regeneration after injury in the CNS. Moreover, recent studies suggest that the inactivation of Rho may also have neuroprotective effects (Trapp, 2001).

## Regulation of Rho GTPases

GTPases bind and hydrolyse GTP and cycle between active and inactive states. They are active when bound to GTP and lose their activity upon hydrolysis to GDP. (Bishop and Hall, 2000; Schwartz and Shattil, 2000). To date, more than ten mammalian Rho family members have been identified, and each Rho family member has several isoforms. Rho, Rac and Cdc 42 were the first identified and are the best characterised of the Rho family GTPases. Isoforms of the Rho group include Rho A, Rho B and Rho C

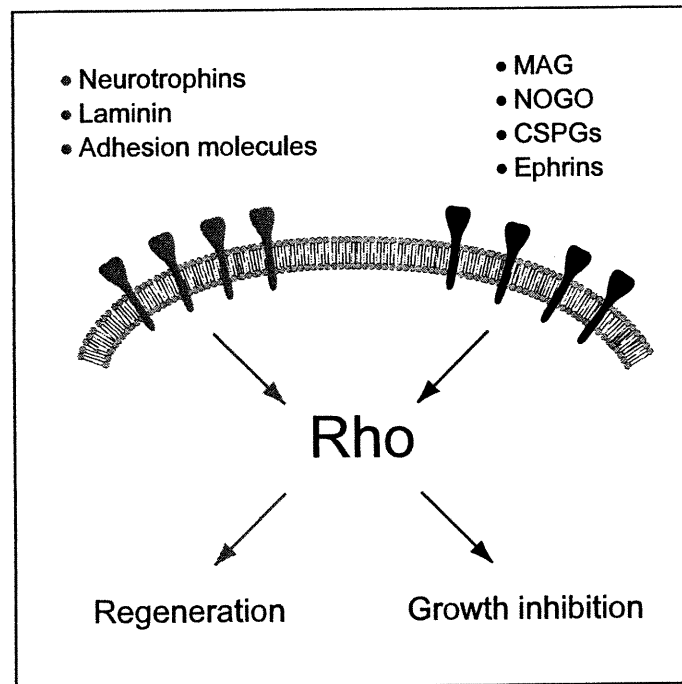


(Takai *et al.*, 2001). PC12 cells express Rho A, Rho B, Rho C and one unidentified Rho isoform (Lehmann *et al.*, 1999) that may be Rho E, a Rho family protein that shares the effector domain of Rho A, B and C and promotes motility through actin reorganization. Unlike Rho A and Rho B, Rho E is not affected by C3-transferase, an inhibitor of Rho activity (Guasch, 1998; Wilde *et al.*, 2001). In neurons, Rho and Rac have opposing effects: active Rho inhibits growth and active Rac stimulates it (Lin *et al.*, 1994; van Leeuwen *et al.*, 1997). Interestingly, it was shown that the effect of neurotrophins on promoting neurite outgrowth is mediated by the p75 receptor by Rho inactivation (Yamashita *et al.*, 1999). Other studies examining the cross talk between different GTPases show that neurotrophins also activate Rac (Yamaguchi *et al.*, 2001). *In vivo*, GTPases may affect both axons and dendrites differently (Luo *et al.*, 1996; Ruchhoeft, 1999), and one consistent finding is that Rho is important in regulating growth cone motility. In the CNS, there is recent evidence that one isoform of Rho, Rho B, is up-regulated after ischemia suggesting that this GTPase may play a role in the neuronal response to injury (Trapp, 2001). Moreover, we have preliminary evidence that an imbalance in Rho expression and activity occurs after SCI, a change that could contribute to the failure of axons to regrow after injury. While the coordinated regulation of the different GTPases remains to be elucidated in regenerating axons, it is clear that the different Rho family GTPases regulate the initiation, growth and guidance of both axons and dendrites by acting on the actin cytoskeleton in response to diverse extracellular signals.

While Rho GTPases act as molecular switches cycling between active GTP bound and inactive GDP bound states, this switching is catalyzed by other proteins. The

guanine exchange factors (GEFs) promote GTP binding to small GTPases. The GTPase activating proteins (GAPs) hydrolyse GTP, pushing the GTPase into the inactive GDP bound state. While Rho is expressed in all cell types, GEFs may exhibit cell-type specificity. Several GEFs that are known to play an important role in axon formation and guidance include Trio, a GEF for Rac, Rho and Cdc42 (Lin and Greenberg, 2000) and Tiam1, a GEF specific for Rac (Kunda *et al.*, 2001). Once activated, the Rho GTPases bind and activate different effector proteins. A principal effector of activated Rho is Rho-associated kinase (ROK), a serine threonine kinase that is activated by Rho-GTP (Matsui *et al.*, 1996). Microinjection of the catalytic domain of ROK into neurons induces neurite retraction, and inhibition of ROK with Y27632, a specific ROK inhibitor, promotes neurite outgrowth (Katoh *et al.*, 1998). Therefore, inhibiting either Rho or its effector ROK is sufficient to promote neurite outgrowth in tissue culture.

Rho GTPases play an important role in integrating different signaling pathways that influence growth cone morphology and collapse (Fig. 1). Recently, Wahl *et al.* (Wahl *et al.*, 2000) demonstrated that ephrin-A5, a known inhibitory molecule and ligand of the Eph tyrosine kinase receptors, causes the collapse of growth cones by activating Rho A and down-regulating Rac1. This induced collapse was significantly reduced when the cultures were pretreated with the Rho inhibitor C3-transferase, or the ROK inhibitor Y27632. Consistent with these findings, a newly discovered Rho family GEF, ephexin, links Eph/ ephrin receptor complex to intracellular signaling by Rho GTPases to influence growth cone collapse. Ephexin can strongly activate both Rho A and Cdc42, but can only weakly activate Rac1. These studies provide strong evidence for a direct link between extracellular growth inhibitory cues and Rho GTPases. Although we are just beginning to



*Figure 1.* Schematic diagram to show that multiple growth signals converge to Rho. The activity state of Rho is influenced by extracellular cues through both positive (gray) and negative (black) receptor-mediated signaling.

understand how extracellular guidance cues control cytoskeleton dynamics and growth cone motility in neurons, there is growing evidence that GTPases in non-neuronal cells are directly modulated by many different extracellular cues. A link between integrin signaling and Rho has been well established in fibroblasts (Adams and Schwartz, 2000; Wenk *et al.*, 2000), and integrin binding to laminin is well known to promote neurite outgrowth (David *et al.*, 1995). Therefore, Rho appears to integrate diverse positive and negative signals in axon regeneration.

Extracellular cues can affect many other aspects of cellular regulation, particularly the levels of intracellular cAMP. There is an interesting link between Rho signalling and cAMP levels. Increased cAMP levels allow neurons to extend neurites on inhibitory substrates (Cai *et al.*, 1999) and it is thought that endogenous cAMP levels determine the regenerative capacity of a neuron (Qiu, Cai and Filbin, this volume). Increases in cAMP levels are known to inactivate Rho (Lang *et al.*, 1996), and changes brought about by increasing cAMP levels can be counteracted by Rho activation and by ROK (Dong *et al.*, 1998). Either cAMP or Rho can be manipulated to promote neurite outgrowth in the presence of growth inhibitory molecules (Lehmann *et al.*, 1999; Song *et al.*, 1998). Thus, the Rho pathway appears to act downstream of cAMP, and Rho represents a specific and important target to promote axon growth.

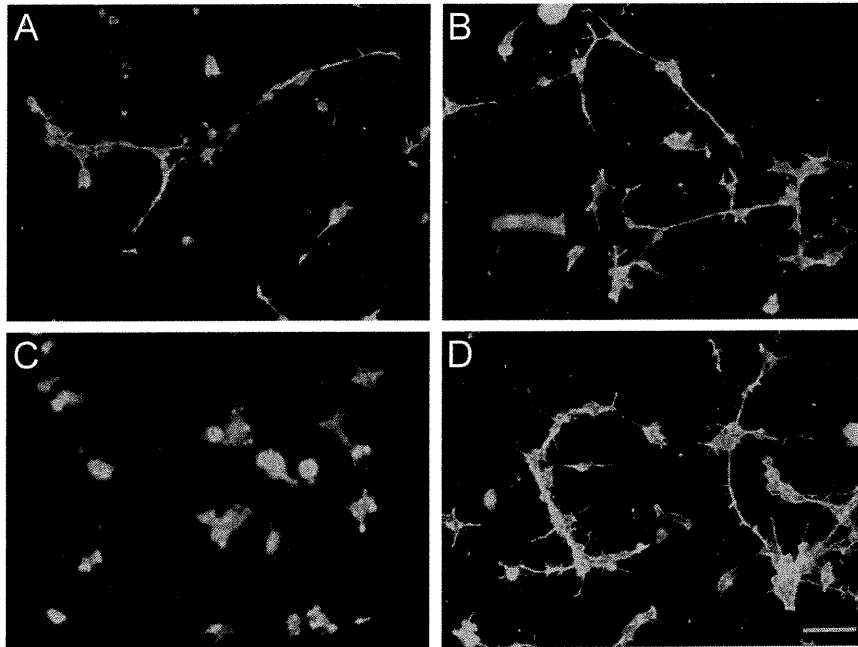
While Rho is best known for regulating the actin cytoskeleton (Mackay and Hall, 1998), more recent evidence implicates activation of Rho with apoptosis. An upregulation of Rho B occurs in ischemia-injured neurons, and stabilization of the actin cytoskeleton helps protect neurons from ischemic cell death (Trapp, 2001). In non-neuronal cells, Rho B is required for apoptosis and regulates the apoptotic response of neuroplastic cells to

DNA damage (Liu, 2001). Therefore, growing evidence suggests that the inactivation of Rho should not only promote axon regeneration but also limit cell death after injury.

### Inactivation of Rho by C3-transferase promotes neurite growth

C3-ADP ribosyltransferase is a 24kD exoenzyme synthesized by *Clostridium botulinum* which specifically ADP ribosylates the Rho A, B, and C isoforms, but not any other members of the Rho families (Wilde *et al.*, 2001). We used recombinant C3-transferase to test if the inactivation of Rho would allow axons to grow on complex myelin and proteoglycan growth inhibitory substrates. The cDNA encoding C3 was cloned into a pGex2T vector (Amersham Pharmacia, Quebec Canada) that has a glutathione-S-transferase (GST) tag. The recombinant C3 protein was produced in E.coli and purified by affinity purification with glutathione-agarose beads. Thrombin was used to cleave the GST tag from the purified protein, and p-aminobenzamidine agarose beads were used to remove thrombin. Purified C3 was then centrifuged to remove the beads, concentrated, desalted, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

To test the ability of C3 to promote neurite growth on inhibitory substrates we have examined two types of primary neuronal cells : retinal neurons and cerebellar granule cells that were isolated from early postnatal rats. Retinal neurons were dissociated and plated on inhibitory substrates made of either MAG, myelin or chondroitin sulfate proteoglycans. Addition of C3 allowed retinal neurons to grow neurites on all three inhibitory substrates, and brought an increase in both the number of neurons extending neurites and the average neurite length. Cerebellar neurons were dissociated, prelabelled with DiI, and triturated with C3 (25-50 $\mu\text{g/ml}$ ) or buffer, then plated on laminin as a



*Figure 2.* Treatment of cerebellar granule cells with C3 promotes neurite outgrowth. (A and B) Dissociated cerebellar neurons treated with (A) buffer or (B) C3 and plated on laminin. (C and D) Neurons treated with (C) buffer or (D) C3 and plated on MAG. Treatment of neurons with C3 potentiated neurite growth on laminin, and allowed neurons to extend neurites on a growth inhibitory substrate.

growth promoting substrate (Fig. 2, A and B) or myelin-associated glycoprotein (MAG) as a growth inhibitory substrate (Fig. 2, C and D). With cerebellar neurons, C3 treatment allowed neurite outgrowth on MAG (Fig. 2D) and potentiated neurite outgrowth on laminin (Fig. 1B). Untreated cerebellar neurons plated on MAG did not extend neurites (Fig. 2C).

Although C3 is a very effective way to inactivate Rho and stimulate neurite outgrowth, it is not very cell permeable. Thus, trituration of primary neurons was necessary to enable C3 to enter the cell and allow neurites to grow on inhibitory substrates. However, to improve delivery of C3, we have developed permeable forms that allow us to simply add it to the cell culture medium. Experiments using our new C3-like constructs give the same results as those with C3, the advantage being that lower doses are required.

### **Inactivation of Rho is sufficient to promote neurite growth on inhibitory substrates.**

To verify that inactivation of Rho was sufficient to allow neurons to extend neurites on inhibitory substrates, we examined the ability of PC12 cells transfected with dominant negative RhoA (N19TRhoA) to grow on recombinant MAG substrates. Transfected N19TRhoA cells and mock-transfected PC12 cells were examined for their ability to extend neurites when plated on inhibitory MAG substrates. Inactivation of RhoA by dominant negative mutation was sufficient to allow N19TRhoA cells plated on MAG substrates to extend neurites, and by contrast, mock transfected cells were unable to grow on MAG substrates (Lehmann *et al.*, 1999). It is not known if dominant negative

mutations of Rho expressed *in vivo* by gene therapy techniques would allow regeneration after axonal injury. In this case, the dominant negative Rho expressed in the cell body would have to be transported to the tip of the transected axon to be effective. It would be useful to know if this transport occurs at the slow or fast rates of axonal transport, and if direct delivery of dominant negative Rho to a neuronal cell body could stimulate the growth of an axon cut many centimeters away.

### The optic nerve microcrush model to study ~~of~~ *in vivo* axon regeneration

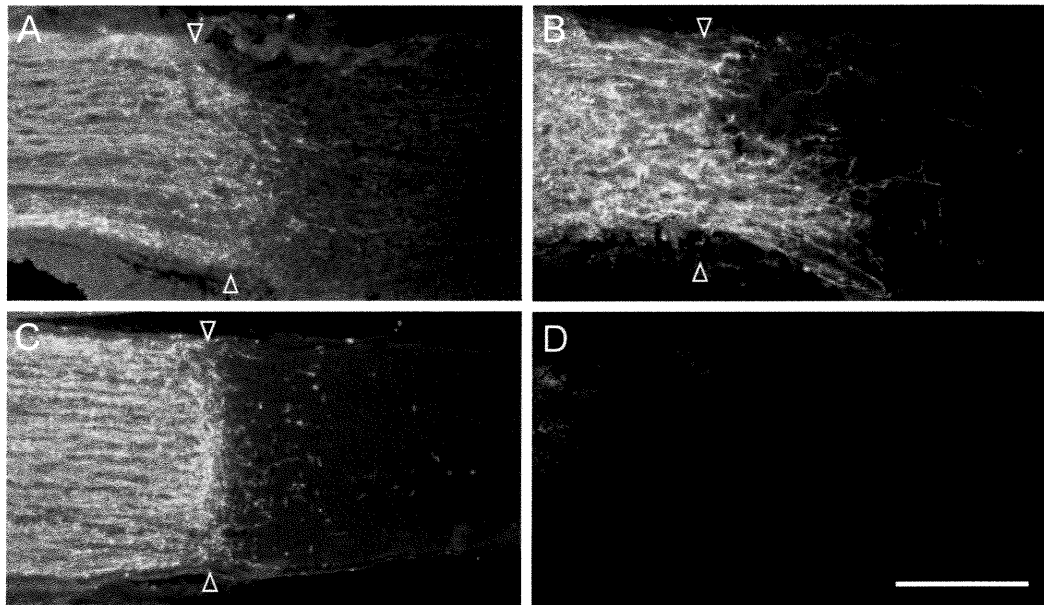
Aguayo and colleagues first showed adult RGC axons could regenerate if they were provided with an alternative environment such as a peripheral nerve graft (So and Aguayo, 1985; Vidal-Sanz *et al.*, 1987). It is apparent now that RGCs can regenerate in their native optic nerve environment if given trophic support (Berry *et al.*, 1996; Berry *et al.*, 1999; Leon *et al.*, 2000), if the optic nerve environment is modified by cell transplantation (Lazarov-Spiegler *et al.*, 1996), or if growth inhibitory myelin proteins are blocked (Ellezam and McKerracher, 2000; Weibel *et al.*, 1994). To develop those strategies, investigators have relied on optic nerve crush to unequivocally axotomize all RGCs yet preserve tissue integrity between proximal and distal segments. Standard crush lesions cause less cell death and optic nerve damage than complete transection of the optic nerve (Berkelaar *et al.*, 1994; Kiernan, 1985). However, crushing the nerve with forceps creates an area of cavitation with a poorly delimited injury site that makes quantitation of axon regeneration difficult (Berry *et al.*, 1996; Giftchristos and David, 1988; Weibel *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 1994). Therefore, we developed a new type of



lesion where complete axotomy is achieved by constricting the optic nerve with 10-0 sutures for 60 seconds (Lehmann *et al.*, 1999). This microcrush lesion results in a clear and defined injury site that is suitable for precise anatomical studies of axon retraction and regeneration (Selles-Navarro *et al.*, 2001).

To characterize the microlesion model we have examined the neuronal and non-neuronal responses to a microcrush lesion. We have found that as early as 6 hr following microcrush of the optic nerve, anterogradely labeled RGC axons retract up to 200  $\mu\text{m}$  from the lesion site, and in the following week they sprout back toward the site of lesion where they abruptly stop (Selles-Navarro *et al.*, 2001). This initial growth response is consistent with the early sprouting observed by Zeng *et al.* (1994) using electron microscopy. At 2 weeks, still very few axons grow past the injury site, most of them still remaining on the proximal side (Figure 3C). As for the non-neuronal response, it is similar to that observed after typical optic nerve crush made with forceps (Berry *et al.*, 1996), although constrained to a smaller lesion area. Immediately after injury (24 hr) there is a GFAP-negative region, while CSPGs detected with CS56 antibody are expressed along a discrete injury line (Selles-Navarro *et al.*, 2001). CSPG immunoreactivity remains detectable for at least 2 weeks, indicating formation of a persistent glial scar. In fact, it might be more appropriate to refer to the glial scar as the lesion scar since invading meningeal cells contribute importantly to its formation (Selles-Navarro *et al.*, 2001). Indeed, a network of newly formed blood vessels quickly fills the injury site and appears to form of a tight physical barrier.

Studying the microcrush lesion model has provided us with some insight on the reason for RGC regeneration failure. Anterograde tracing examination clearly shows that



*Figure 3.* Regeneration of retinal ganglion cells axons after injury and treatment with C3. (A) Seven days after injury and C3 treatment many axons cross the lesion site as compared to animals treated with buffer alone where axons stop abruptly at the lesion site. (B) Two weeks after C3 treatment many axons cross the lesion scar (arrow heads) to grow in the distal white matter. (C) Control animal treated with buffer in the Gelfoam and Elvax 7 days after injury and treatment. (D) Normal optic nerve showing that cholera toxin B subunit, used as the anterograde tracer in these studies, does not accumulate when there is no lesion.

early after optic nerve lesion adult RGCs have retained their potential to regenerate, since after the initial retraction they can regrow for up to 200  $\mu\text{m}$ . However, without any treatment, the vast majority of axons stop abruptly at the C556 immunoreactive lesion barrier. Yet, despite the presence of a barrier, some axons do cross the lesion site, but only grow within the myelin-rich white matter for very short distances. More often these axons will either be contained outside the nerve and along the sheath or in the first 50  $\mu\text{m}$  past the lesion site, within the limits of the myelin-free zone (Lehmann *et al.*, 1999; Selles-Navarro *et al.*, 2001) suggesting the importance of myelin inhibitors in blocking regeneration. Moreover, when myelin inhibitors are blocked without any additional intervention, significant regeneration is observed (Weibel *et al.*, 1994), a regrowth most likely driven by the initial sprouting reaction seen after injury. Thus, both the lesion scar and myelin inhibitors contribute to the lack of significant RGC regeneration after optic nerve injury.

Another possible explanation for RGC regenerative failure is the delayed apoptosis that follows axotomy. Indeed, five days after optic nerve injury RGCs rapidly start to die (Berkelaar *et al.*, 1994). However, one week after microlesion about 60% of RGCs still survive (Selles-Navarro *et al.*, 2001) and their axons can still actively transport the anterograde tracer cholera toxin B. Moreover, one week after optic nerve injury, most surviving cells have normal morphology when observed after Fluorogold labelling and do not show signs of impending apoptosis (Kikuchi *et al.*, 2000). Yet, all those surviving RGCs typically do not extend an axon farther than the lesion site. Therefore, the poor regeneration observed at 7 days cannot be accounted for by poor cell survival alone, making growth inhibition an essential target for new regeneration strategies.

### C3 promotes axon regeneration of retinal ganglion cell axons *in vivo*

To test if blocking Rho signaling could promote axon regeneration *in vivo*, we studied the effect of C3 on RGC regeneration after optic nerve microcrush (Lehmann *et al.*, 1999). We applied C3 to the lesion site as a 2 mg/ml solution absorbed in Gelfoam, and then wrapped the Gelfoam around the nerve at the site of lesion. In addition, two 3 mm long tubes of Elvax, a slow release polymer loaded with 20  $\mu\text{g}$  C3, were inserted in the Gelfoam near the nerve for continued slow release of C3. For controls, phosphate buffered saline (PBS) was used in the Gelfoam and Elvax implants. Seven days or two weeks after optic nerve crush, RGC axons were anterogradely labeled with cholera toxin  $\beta$  subunit injected into the vitreous, then the animals were fixed by perfusion with 4% paraformaldehyde and longitudinal cryostat sections of the optic nerve were processed for immunoreactivity to cholera toxin  $\beta$  subunit. For a quantitative analysis the numbers of axons per section were counted at distances of 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , and 500  $\mu\text{m}$ , and at least 4 sections per animal were analyzed. Two C3 treated animals and four controls were examined 7 days after lesion. For examination 2 weeks post lesion, 16 animals were treated with C3, 10 animals were treated with buffer as controls, and 4 animals received microcrush lesion only.

After treatment of crushed optic nerve with C3, large numbers of axons extended through the site of the crush to grow in the distal optic nerve. Seven days after lesion, many axons had grown past the region of the lesion scar (Fig. 2A). In control animals, axons had sprouted to the lesion site by 7 days, but the vast majority stopped abruptly at the lesion site (Fig. 3C). Most of our observations were made two weeks after lesion

where the results were even more dramatic. In C3-treated animals, many axons extended 500  $\mu\text{m}$  past the lesion site by two weeks, and axons that extended in the distal optic nerve showed a twisted path of growth, supporting their identification as regenerating axons (Fig. 3B). In control animals, only a few axons were able to grow past the lesion at 1 week, and growth was not observably further at the two week time point. Finally, to rule out the possibility that some of the fibres observed past the lesion site are actually axons that were spared at the time of injury, we injected the antergrade tracer in the vitreous of untreated animals with intact optic nerves and allowed the same amount of time for the tracer to be transported before perfusion. Longitudinal sections of those nerves did not show axon profiles past the lamina cribosa (Fig. 3D). Although RGC somas showed accumulation of the tracer (data not shown), axons in turn did not retain it, most likely because the tracer accumulated at their synaptic endings. These experiments rule out the possibility that spared fibers were detected after microlesion and C3 treatment.

To quantitatively examine the differences between C3 and buffer-treated animals, we counted the number of axons in each section at distances of 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , and 500  $\mu\text{m}$  past the lesion site. Significantly more axons extended past the lesion in the C3-treated animals than in the microcrush lesion or buffer-treated controls at distances of 100  $\mu\text{m}$  and 250  $\mu\text{m}$ . Therefore, C3 applied to injured RGC axons can enter axotomized axons and promote robust axon regeneration in the inhospitable growth environment of the optic nerve. We speculate that C3, which is not readily cell permeable, was effective in eliciting regeneration because it was able to enter injured axons. It is known that injured axons readily take up substances from their environment. Our current investigations are to

determine to what extent the new permeable forms of C3 that we have made can further augment the regeneration response after injury.

### *In vivo* Spinal Cord Injury Experiments

We have begun a series of experiments to test the ability of C3 to promote regeneration and functional recovery after spinal cord injury. For these studies, we have used a dorsal over-hemisection of the mouse spinal cord. We chose this model because we have previously used it to test a therapeutic vaccine to promote axon regeneration (Huang, 1999) and because it is highly suitable to study by anterograde tracing the regeneration of fibres in the corticospinal tract. In considering the various *in vivo* models of spinal cord injury, it is important to keep in mind that each model has distinct advantages and disadvantages. The contusion model is believed to most closely resemble human SCI (Bresnahan *et al.*, 1987; Gruner, 1992; Wrathall *et al.*, 1985), and recovery of hindlimb movement can be measured with the BBB scale (Basso *et al.*, 1996). After contusion there is a rim of spared tissue, and therefore, this model is unsuitable for the unequivocal histological determination of successful axon regeneration.

To study the ability of C3 to promote axon regeneration in the injured spinal cord, we lesioned the spinal cord at the T7 level by cutting past the central canal with microscissors, then re-cutting with a surgical knife. One month later, wheat germ agglutinin horse radish peroxidase (WGA-HRP) was injected into several sites of the motor cortex. Two days later, the animals were fixed by perfusion, longitudinal cryostat sections obtained and reacted for HRP enzymatic activity, then counter-stained with neutral red. This staining allowed us to confirm that the lesion scar extended past the

central canal. In control animals, the bundle of CST axons retracted from the lesion site, as previously observed (Huang, 1999; Li *et al.*, 1996). In mice treated with C3, many axons extended into the lesion site and some axons were able to grow distances of up to 10 mm. Therefore, as in injured optic nerve, C3 used to inactivate Rho can promote axon regeneration in the injured adult spinal cord.

We have also studied recovery of hindlimb movement and walking in treated mice. Treated mice showed an improvement in locomotion within 24 hours. This rapid recovery may be due to neuroprotection because neuroprotection improves functional outcomes (Giménez y ribotta, Gaviria, Menet, and Privat, this volume). The activation of Rho has been implicated in cell death after ischemia in the CNS (Trapp, 2001), and thus, the inactivation of Rho by C3 may be neuroprotective. Moreover, treated mice showed recovery of walking with hind-limb-forelimb coordination. Control mice recovered walking, but did not recover coordination between hindlimbs and forelimbs.

At this stage of the research, we cannot correlate the functional recovery we observe with axon regeneration. The BBB openfield locomotor test cannot be correlated with the regeneration of specific tracts, and adaptive plasticity of preserved tracts is likely to contribute to recovery. In our studies, the potential neuroprotective effect of C3 could play an important role in improved recovery, and therefore, it is not clear to what extent improvements in the BBB score reflect the observed regeneration. While the late recovery of hindlimb-forelimb coordination we observe at one month is consistent with regeneration of cut fibres, it is well documented that reorganization of collateral CST fibres occurs after SCI (Weidner, 2001) and this process could be enhanced by C3 treatment that might enhance spontaneous plasticity of axons and dendritic remodelling.

After incomplete SCI, there is plasticity of motor systems attributed to cortical and subcortical levels, including spinal cord circuitry (reviewed by Raineteau and Schwab, 2001). This plasticity may be attributed to axonal or dendritic sprouting of collaterals and synaptic strengthening or weakening. Additionally, it has been shown that sparing of a few ventrolateral fibers may translate into significant differences in locomotor performance (Brustein and Rossignol, 1998) since these fibers are important in the initiation and control of locomotor pattern through spinal central pattern generators (reviewed by Rossignol, 2000). Moreover, the SC devoid of supraspinal input but with peripheral afferents is in and of itself capable of generating hindlimb locomotion through central pattern generators (Rossignol, 2000). Therefore, many factors may contribute to functional recovery. Nonetheless, treatments that stimulate functional recovery in animal models give hope that effective treatment for spinal cord injury will be developed in the foreseeable future. Towards this end, we are developing more effective recombinant Rho antagonists that have increased cell permeability and that can stimulate spinal cord repair at lower doses. This strategy to improve recovery after spinal cord injury is simple: a single recombinant protein given once soon after injury. Further research with different animal models is needed to more directly compare C3-induced functional recovery with the recovery observed with other strategies described in this volume.

## Summary

Our studies indicate that the small GTPase Rho is an important intracellular target for promoting axon regrowth after injury. In tissue culture, inactivation of the Rho signaling pathway is effective in promoting neurite growth on growth inhibitory CNS



substrates by two different methods: inactivation of Rho with C3 transferase, and inactivation by dominant negative mutation of Rho. *In vivo*, we have documented the regeneration of transected axons after treatment with C3 in two different animals models, microcrush lesion of the adult rat optic nerve, and over-hemisection of adult mouse spinal cord. Mice treated with C3 after SCI showed impressive functional recovery although it is important to point out that mice differ from rats in their response to spinal cord injury, especially in the extent of cavitation at the lesion site (Steward, 1999). It remains to be determined to what extent the regeneration of specific descending and ascending spinal axons contribute to the recovery, and whether inactivation of Rho enhances the spontaneous plasticity of axonal and dendritic remodeling after SCI. Inactivation of Rho with C3 to promote regeneration and functional recovery after SCI is simple, and our studies show the potential for a new, straightforward technique to promote axon regeneration.

## References

- Adams, J. C., and Schwartz, M. A. (2000) Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. *J Cell Biol* 150: 807-22.
- Basso, D. M., Beattie, M. S., and Bresnahan, J. C. (1996) Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neuro*.139: 244-56.
- Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., and Aguayo, A. J. (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 14: 4368.
- Berry, M., Carlile, J., and 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: 147-70.
- Berry, M., Carlile, J., Hunter, A., Tsang, W., Rosustrel, P., and Sievers, J. (1999) Optic nerve regeneration after intravitreal peripheral nerve implants: trajectories of axons regrowing through the optic chiasm into the optic tracts. *J Neurocytol* 28: 721-41.
- Bishop, A. L., and Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2: 241-55.
- Bresnahan, J. C., Beattie, M. S., Todd, F. D., 3rd, and Noyes, D. H. (1987) A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp Neurol* 95: 548-70.
- Brustein, E., and Rossignol, S. (1998) Recovery of locomotion after ventral and ventrolateral spinal lesions in the cat. I. Deficits and adaptive mechanisms. *J Neurophysiol* 80: 1245-67.

- Cai, D., Shen, Y., DeBellard, M. E., Tang, S., and Filbin, M. T. (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* 22: 89-101.
- David, S., Braun, P. E., Jackson, J. L., Kottis, V., and McKerracher, L. (1995) Laminin overrides the inhibitory effects of PNS and CNS myelin-derived inhibitors of neurite growth. *J. Neurosci. Res.* 42: 594-602.
- Dickson, B. J. (2001) Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 11: 103-10.
- Dong, J.-M., Leung, T., Manser, E., and Lim, L. (1998) cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROK $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 273: 22554-22562.
- Ellezam, B., and McKerracher, L. (2000) Testing a therapeutic vaccine to stimulate axon regeneration after microcrush of the optic nerve in adult rats. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26: 118.
- Giftchristos, N., and David, S. (1988) Laminin and heparin sulfate proteoglycan in the lesioned adult mammalian central nervous system and their possible relationship to axonal sprouting. *J. Neurocytol.* 17: 385-397.
- Gruner, J. A. (1992) A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma* 9: 123-6; discussion 126-8.
- Guasch, R. M., Scambler, P., Jones, G.E., Ridley, A.J. (1998) RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol. Cell Biol.* 18: 4761-4771.
- Huang, D. W., McKerracher, L., Braun, P., McKerracher, L., David, S. (1999) A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 24: 639-647.
- Jin, Z., and Strittmatter, S. M. (1997) Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci* 17: 6256-63.

- Katoh, H., Aoki, J., Ichikawa, A., and Negishi, M. (1998) p160 RhoA-binding kinase ROK $\alpha$  induces neurite retraction. *J. Biol. Chem.* 273: 2489-2492.
- Kiernan, J. A. (1985) Axonal and vascular changes following injury to the rat's optic nerve. *J Anat* 141: 139-54.
- Kuhn, T. B., Brown, M. D., Wilcox, C. L., Raper, J. A., and Bamberg, J. R. (1999) Myelin and collapsin-1 induce motor neuron growth cone collapse through different pathways: inhibition of collapse by opposing mutants of rac1. *J Neurosci* 19: 1965-75.
- Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K., and Caceres, A. (2001) Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J Neurosci* 21: 2361-72.
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., and Bertoglio, J. (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* 15: 510-519.
- Lazarov-Spiegler, O., Solomon, A., Zeev-Bran, A. B., Hirschberg, D. L., Lavie, V., and Schwartz, M. (1996) Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB.J.* 110: 1296-1302.
- Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., and McKerracher, L. (1999) Inactivation of rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J Neurosci* 19: 7537-47.
- 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: 4615-26.
- Li, M., Shibata, A., Li, C., Braun, P. E., McKerracher, L., Roder, J., Kater, S. B., and David, S. (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *J.Neurosci.Res.* 46: 404-414.
- Lin, C. H., Thompson, C. A., and Forscher, P. (1994) Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility. *Curr Opin Neurobiol* 4: 640-7.

- Lin, M. Z., and Greenberg, M. E. (2000) Orchestral maneuvers in the axon: trio and the control of axon guidance. *Cell* 101: 239-42.
- Liu, A. X., Cerniglia, G. J., Prendergast, G. C. (2001) RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 6192-6197.
- Luo, L., Hensch, T. K., Ackerman, L., Barbel, S., and Jan, Y. N. (1996) Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic spines. *Nature* 379: 837-840.
- Mackay, D. J., and Hall, A. (1998) Rho GTPases. *J Biol Chem* 273: 20685-8.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996) Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *Embo J* 15: 2208-16.
- Raineteau, O., and Schwab, M. E. (2001) Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 2: 263-73.
- Rossignol, S. (2000) Locomotion and its recovery after spinal injury. *Curr Opin Neurobiol* 10: 708-16.
- Ruchhoeft, M. L., Ohnuma, S-I., Holt, C.E., Harris, W. (1999) The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by Rho-family GTPases in vivo. *J. Neurosci.* 19: 8454-8463.
- Schwartz, M. A., and Shattil, S. J. (2000) Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* 25: 388-91.
- Selles-Navarro, I., Ellezam, B., Fajardo, R., Latour, M., and McKerracher, L. (2001) Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve. *Exp Neurol* 167: 282-289.

- So, K. F., and Aguayo, A. J. (1985) Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res* 328: 349-54.
- Song, H.-j., Ming, G.-i., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M.-m. (1998) Conversion of growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 281: 1515-1518.
- Steward, O., Schauwecker, P.E., Guth, L., Zhang, Z., Fujiki, M., Inman, D., Wrathall, J., Kempermann, G., Gage, F.H., Raghupathi, R., McIntosh, T. (1999) Genetic approaches to neurotrauma research: opportunities and potential pitfalls of murine models. *Exp. Neurol* 157: 19-42.
- Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208.
- Trapp, T., Olah, L., Holker, I., Besselmann, M., Tiesler, C., Maeda, K., Hossmann, K.-A. (2001) GTPase RhoB: an early predictor of neuronal death after transient focal ischemia in mice. *Molec. Cell. Neurosci.* 17:
- van Leeuwen, F. N., Kain, H. E. T., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Kranenburg, O. W., and Collard, J. G. (1997) The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J. Cell Biol.* 139: 797-807.
- Vidal-Sanz, M., Bray, G. M., Villegas-Perez, M. P., Thanos, S., and Aguayo, A. J. (1987) Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* 7: 2894-909.
- Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K., and Mueller, B. K. (2000) Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol* 149: 263-70.

- Weibel, D., Cadelli, D., and Schwab, M. E. (1994) Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain Res.* 642: 259-266.
- Weidner, N., Ner, A., Salimi, N., Tuszynski, M.H. (2001) Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 3513-3518.
- Wenk, M. B., Midwood, K. S., and Schwarzbauer, J. E. (2000) Tenascin-C suppresses Rho activation. *J Cell Biol* 150: 913-20.
- Wilde, C., Chhatwal, G. S., Schmalzing, G., Aktories, K., and Just, I. (2001) A Novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* Modifying RhoE and Rnd3. *J Biol Chem* 276: 9537-9542.
- Wrathall, J. R., Pettegrew, R. K., and Harvey, F. (1985) Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups. *Exp Neurol* 88: 108-22.
- Yamaguchi, Y., Katoh, H., Yasui, H., Mori, K., and Negishi, M. (2001) RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 276: 18977-83.
- Zeng, B. Y., Anderson, P. N., Campbell, G., and Lieberman, A. R. (1994) Regenerative and other responses to injury in the retinal stump of the optic nerve in adult albino rats: transection of the intraorbital optic nerve. *J Anat* 185: 643-61.

## ANNEXE V – CONTRIBUTION AUX ARTICLES

### **Article 1**

J'ai effectué l'essentiel des expériences, c'est-à-dire la chirurgie, l'histologie, l'immunohistochimie, l'hybridation *in situ* quantitative et l'immunobuvardage Western. Les greffes de nerf périphérique ont été effectuées en partie par I. Selles-Navarro, et le Northern blot de la Fig. 7 par C. Mannit. T.E. Kennedy est le superviseur de C. Mannit. Il a contribué à la conception du projet et fourni des réactifs (anticorps et ADN). J'ai produit toutes les figures et j'ai rédigé le texte en collaboration avec L. McKerracher.

### **Article 2**

Je suis intervenu dans ce projet pour compléter et publier les travaux initiés par I. Selles-Navarro (stagiaire post-doctorale), après son départ du laboratoire. J'ai effectué les chirurgies, dissections de nerfs optiques et colorations histologiques nécessaires à la caractérisation de l'expression de la myéline après microlésion. J'ai participé aux expériences sur l'expression des CSPG et de GFAP. J'ai produit toutes les figures et j'ai participé activement à la rédaction avec L. McKerracher. I. Selles-Navarro a effectué les expériences visant à valider la microlésion comme méthode d'axotomie complète (chirurgie, marquages antérograde et rétrograde), quantifié ses effets sur la survie neuronale et examiné la réponse non-neuronale (histologie et immunohistochimie ED-1 et laminine). M. Latour a participé aux expériences présentées à la Fig. 5 (chirurgie et immunohistochimie CSPG et GFAP). R. Fajardo a contribué aux expériences présentées à la Fig. 3 (coloration histologique).



**Article 3**

Je suis responsable de toutes les expériences effectuées, à l'exception des immunobuvardage Western présentés à la figure 4, qui ont été réalisés par J. Bertrand en étroite collaboration avec moi.

**EN ANNEXE****Article 4**

Cet article représente le projet de PhD de P. Dergham. J'ai été responsable des expériences menant à la figure 4, qui présentent des résultats d'hybridation *in situ*, incluant les expériences préliminaires présentées à l'annexe II. J'ai conçu la figure 5, représentant graphiquement la récupération fonctionnelle. J'ai participé activement à la rédaction du manuscrit. J'ai été responsable de sa mise en forme, incluant la production des figures. H. Avedissian a conçu l'inhibiteur Y-27632.

**Article 5**

Cette article de revue fait suite au XXIII<sup>e</sup> Symposium du Centre de recherche en sciences neurologiques. En tant qu'étudiant sénior du labo, j'ai été responsable de : 1) la rédaction d'une section; 2) la relecture, une correction et une supervision critique de l'ensemble; 3) une partie des résultats originaux présentés à la figure 3; 4) la mise en forme du manuscrit et des figures; 5) la conception de la figure 1.



