

Université de Montréal

Expression des nétrines dans la rétine de la souris adulte

Par

Mathieu SIMARD

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise ès sciences (M.Sc.)

En pathologie et biologie cellulaire

Option systèmes nerveux

Décembre 2009

© MATHIEU SIMARD, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Expression des nétrines dans la rétine de la souris adulte

Présenté par :

Mathieu SIMARD

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Louis Saint-Amant
Président-rapporteur

Dr. Adriana Di Polo
Directrice de recherche

Dr. Nicole Leclerc
Membre du jury

RÉSUMÉ

Les nétrines sont une petite famille de protéines de guidage axonal qui peuvent attirer des axones ou en repousser d'autres lors du développement neuronal. Lors du développement de la rétine, les axones des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) sont attirés vers une source de nétrines au niveau du disque optique leur permettant de quitter la rétine et de former le nerf optique. Afin de pouvoir caractériser le rôle des nétrines dans le système visuel adulte, nous avons investigué l'expression des nétrines et leurs récepteurs dans la rétine de souris adulte.

Alors qu'aucune expression de la nétrine-1 n'a été détectée dans la rétine adulte, l'expression de la nétrine-3 a été abondamment détectée au niveau des CGR et des cellules amacrines. Nous démontrons aussi que les récepteurs des nétrines sont exprimés dans la rétine adulte. Alors que DCC semble être confiné au niveau des axones des CGR, néogénine est retrouvé dans les dendrites des CGR et des cellules horizontales. Quant aux protéines de la famille des récepteurs homologues à UNC-5, UNC5B a été détecté dans les somas des CGR et UNC5C dans les cellules de Müller.

La découverte que nétrine-3 et ses récepteurs sont abondamment exprimés dans plusieurs types cellulaires de la rétine adulte leur suggère un rôle dans le fonctionnement du système visuel mature.

Mots-clés : rétine, adulte, nétrine, néogénine, DCC, UNC-5

SUMMARY

The netrins are a small family of axonal guidance proteins that can attract or repulse growing axons during neural development. During development of the retina, retinal ganglion cells (RGCs) axons are attracted by a netrin source at the optic disc that permits them to exit the retina and form the optic nerve. To characterise the role of netrins in the adult visual system, we investigated the expression of netrins and their receptors in the adult mouse retina.

While expression of netrin-1 has not been detected in the adult retina, netrin-3 has been abundantly found in RGCs amacrine cells. We also demonstrate that netrin receptors are expressed in the adult retina. DCC was found to be restricted in RGCs axons and neogenin in dendrites of RGCs and horizontal cells. UNC5B proteins were detected at RGC soma and UNC5C proteins in the Müller cells.

The finding that netrin-3 and its receptors are abundantly expressed in many cell types of the adult retina suggests a functional role for them in the mature visual system.

Key words: retina, adult, netrin, DCC, neogenin, UNC-5

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
SUMMARY	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES FIGURES	VI
LISTES DES ABRÉVIATIONS	VII
REMERCIEMENTS	IIX
CHAPITRE 1	1
I) REVUE DE LITTÉRATURE	1
I.1) INTRODUCTION	2
I.2) LA RÉTINE	2
I.2.1) STRUCTURE DE LA RETINE	2
I.2.2) LES TYPES CELLULAIRES DE LA RETINE	4
I.2.3) LES SOUS-TYPES NEURONAUX DE LA RETINE	5
I.2.4) LES CELLULES GLIALES	7
I.2.5) LES AVANTAGES DE L'UTILISATION D'UN MODELE RETINIEN	7
I.3) LES NÉTRINES	8
I.3.1) LA STRUCTURE MOLÉCULAIRE DES NÉTRINES	9
I.3.1.1) LA NÉTRINE-1	9
I.3.1.2) LA NÉTRINE-3	10
I.3.1.3) LA NÉTRINE-4	11
I.3.1.4) LES NÉTRINES-G	12
I.3.2) LA LOCALISATION TISSULAIRE DES NÉTRINES	12
I.3.3) LES RÉCEPTEURS DES NÉTRINES	13
I.3.4) LA STRUCTURE MOLECULAIRE DES RECEPTEURS DES NETRINES	14
I.3.4.1) LE RÉCEPTEUR DCC	14
I.3.4.2) LE RÉCEPTEUR NÉOGÉNINE	15
I.3.4.3) LES RÉCEPTEURS HOMOLOGUES À UNC-5	16
I.3.4.4) LE RÉCEPTEUR DSCAM	16

1.3.5)	RÉPULSION VS ATTRACTION	17
1.3.6)	LA TRANSDUCTION DE SIGNAL.....	18
1.3.7)	LONGUE-DISTANCE VS COURTE-DISTANCE.....	19
1.3.7.1)	EFFET SUR UNE LONGUE DISTANCE	19
1.3.7.2)	EFFET SUR UNE COURTE DISTANCE.....	20
I.4)	FONCTIONS DES NETRINES DANS LE DEVELOPPEMENT NEURONAL.....	20
1.4.1)	LES IMPLICATIONS DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA RETINE.....	21
1.4.2)	LES IMPLICATIONS DANS LA SYNAPTOGENESE	22
1.4.3)	LES IMPLICATIONS DANS LE GUIDAGE DENDRITIQUE	22
1.4.4)	ADHÉRENCE CELLULAIRE.....	23
I.5)	LES FONCTIONS DES NÉTRINES DANS LE DÉVELOPPEMENT NON-NEURONAL	23
I.6)	LES IMPLICATIONS DES NÉTRINES CHEZ L'ANIMAL ADULTE	24
1.6.1)	LES IMPLICATIONS DANS LA MOELLE EPINIÈRE ADULTE	25
1.6.2)	LES IMPLICATIONS DANS LA RETINE ADULTE	25
1.6.3)	L'INHIBITION DE LA RÉGÉNÉRATION AXONALE.....	26
1.6.4)	LES NÉTRINES DANS L'APOPTOSE	27
I.7)	OBJECTIFS DE RECHERCHE ET APPROCHES EXPÉRIMENTALES.....	29
	CHAPITRE 2	30
II)	MANUSCRIT QUI SERA SOUMIS À NEUROSCIENCE.....	30
	CHAPITRE 3.....	64
III)	DISCUSSION GÉNÉRALE	64
III.1)	RÉSULTATS OBTENUS	65
III.2)	CONTROVERSES	68
III.3)	LIMITES DE L'ÉTUDE.....	69
III.4)	IMPORTANCE DES RÉSULTATS	70
III.4.1)	ROLES DANS LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE.....	71
III.4.2)	ROLES DANS LA SURVIE CELLULAIRE	71
III.5)	PERSPECTIVES.....	72
	BIBLIOGRAPHIE	73

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE II

Tableau I

List of primers used for RT-PCR experiments-----56

Tableau II

List of primary antibodies used for immunofluorescence and Western Blot experiments-----57

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1	<i>Structure et types cellulaires de la rétine de souris</i> -----	5
Figure 2	<i>Relations phylogénétique des nétrines à travers l'évolution</i> -----	9
Figure 3	<i>Structure moléculaire des nétrines</i> -----	11
Figure 4	<i>Structure moléculaire des récepteurs de nétrines</i> -----	15

CHAPITRE II

Figure 1	<i>Netrin-1 is not expressed by adult mouse retina</i> -----	58
Figure 2	<i>Netrin-3 is expressed by the mature retina</i> -----	59
Figure 3	<i>Expression of DCC in the adult mouse retina</i> -----	60
Figure 4	<i>Expression of neogenin in the adult mouse retina</i> -----	61
Figure 5	<i>Expression of UNC5 receptors in the adult mouse retina</i> -----	62
Figure supplémentaire 1	-----	63

CHAPITRE III

Figure 1	<i>Résumé des résultats de l'expression des nétrines et de leurs récepteurs dans la rétine de souris adulte.</i> -----	67
-----------------	--	----

LISTES DES ABRÉVIATIONS

Ach	Acétylcholine
CCG	Couche des cellules ganglionnaires
Cdc42	Cell division cycle 42
CF	Couche fibreuse
CGR	Cellules ganglionnaires de la rétine
CNE	Couche nucléaire externe
CNI	Couche nucléaire interne
CPE	Couche plexiforme externe
CPI	Couche plexiforme interne
CPR	Couche des photorécepteurs
DCC	Deleted in colorectal cancer
DD	Death domain
DSCAM	Down syndrome cell adhesion molecule
EGF	Epidermal-growth factor
EPR	Épithélium pigmentaire de la rétine
FBNI	Fibronectine de type III
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GAG	Glycosaminoglycans
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Ig	Immunoglobuline

IHC	Immunohistochimie
Kda	KiloDalton
KO	Knock out
N-WASP	Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein
NMDA	<i>N</i> -methyl-d-aspartate
Pak1	p21-activated kinase 1
PLCγ	Phospholipase C γ
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RGM	Repulsive guidance molecules
Rho-GTPases	Rho-guanidine triphosphatase
RT-PCR	Reverse-transcription polymerase chain reaction
shRNA	Short hairpin ribonucleic acid
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TSP-1	Thrombospondin-1
UNC-5	Uncoordinated locomotion-5
ZU5	Zona occludens-5

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes collègues, colocataires et amis avec qui j'ai pu entretenir de longues discussions constructives quant aux enjeux et obstacles que mon projet de recherche pouvait amener ainsi qu'à la science en générale.

Je remercie également ma famille pour le soutien, amour et humour à toute épreuve qu'ils ont pu me fournir.

Ce travail n'aurait évidemment pas pu être possible sans les encouragements et conseils constants de ma directrice de recherche, Dr Adriana Di Polo.

Un gros merci à tous les membres de l'équipe du laboratoire que j'ai côtoyés, à savoir Ariel, Ali, Fred, Barb, Jorge, Anniedou, Dara, Sri. Leur soutien technique, leurs suggestions et leur bonne humeur m'ont permis de passer un agréable bout de chemin dans le laboratoire.

Je remercie finalement le département de Pathologie et Biologie cellulaire pour m'avoir accueilli en son sein.

CHAPITRE 1

I) REVUE DE LITTÉRATURE

I.1) INTRODUCTION

La mise en place du réseau neuronal de tout organisme vivant est un processus complexe qui exige que les axones en croissance voyagent sur de très longues distances, tout en bifurquant aux endroits appropriés, afin d'éventuellement trouver leur cible et d'y établir un contact synaptique. Afin de se repérer et de trouver leurs cibles dans le système nerveux en développement, les neurones utilisent un système de guidage moléculaire ligand/récepteur. Il existe en effet une multitude de couples ligand/récepteur dont l'une des principales fonctions est de guider les axones en croissance vers un branchement cellulaire adéquat. Ces molécules sont réunies, par homologie de structure, dans les familles des nétrines, sémaphorines, éphrines, et *repulsive guidance molecules* (RGM). Parmi ces protéines, les nétrines sont très importantes au niveau du développement embryonnaire. Elles participent effectivement à la migration cellulaire et axonale de cellules contenues dans plusieurs systèmes, nerveux et non-nerveux, au sein d'un même organisme.

Plusieurs recherches confirment que chez l'animal adulte, les nétrines demeurent exprimées et contribuent à différentes fonctions cellulaires. Dans cet ordre d'idées, nous nous sommes donc intéressés au rôle que les nétrines peuvent avoir dans le système visuel mature de la souris.

I.2) LA RÉTINE

I.2.1) STRUCTURE DE LA RETINE

La rétine possède une structure stratifiée composée de plusieurs couches successives contenant chacune des types cellulaires différents (Figure 1, page 5).

Accolée à la lame limitante interne de la rétine, on retrouve la couche fibreuse (CF) qui contient la totalité des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) se regroupant pour aller rejoindre le nerf optique situé au centre de la rétine. La seconde couche rencontrée est la couche des cellules ganglionnaires (CCG) qui contient les corps cellulaires des CGR ainsi qu'un type de cellules amacrines qu'on dit déplacées puisque ces dernières ne sont pas localisées dans la couche où elles avaient été préalablement découvertes. On retrouve dans cette couche une proportion pratiquement équivalente de CGR (49%) et de cellules amacrines (51%) (Farah and Jr., 2005). Ensuite, on retrouve la couche plexiforme interne (CPI) qui est composée d'un complexe réseau de dendrites lui-même stratifié en sous-lamina. Ces dendrites appartiennent aux CGR, aux cellules amacrines et aux cellules bipolaires et sont reliées par des synapses chimiques et électriques. La couche nucléaire interne (CNI) est la quatrième couche rencontrée et elle est composée des corps cellulaires des cellules amacrines, bipolaires, horizontales et des cellules de Müller. Ensuite, on retrouve la mince couche plexiforme externe (CPE) qui contient les connexions synaptiques entre les cellules bipolaires, horizontales et les photorécepteurs. Les corps cellulaires des photorécepteurs, cônes et bâtonnets, sont tous rassemblés dans la couche nucléaire externe (CNE), couche qui est très dense en noyaux cellulaires. L'avant-dernière couche de la rétine est la couche des photorécepteurs (CPR) qui contient les segments internes et externes des cônes et des bâtonnets responsables de la détection des photons. Finalement, on retrouve la couche opaque de l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR) qui contient des cellules épithéliales pavimenteuses et hexagonales qui synthétisent de la mélanine. Alors que la face apicale de ces cellules

présente des expansions qui enveloppent le segment externe des photorécepteurs, leur face basale se retrouve en contact direct avec la choroïde.

I.2.2) LES TYPES CELLULAIRES DE LA RETINE

La rétine est un organe sensoriel composé de plusieurs circuits neuronaux. Son circuit principal conduit l'information visuelle du photorécepteur à la cellule bipolaire, puis à la cellule ganglionnaire et enfin au nerf optique. Les autres cellules nerveuses de la rétine sont des interneurons qui jouent un rôle modulateur dans ce circuit. Ainsi, les cellules horizontales agissent au niveau de la synapse entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires et les cellules amacrines au niveau de la synapse entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. L'analyse, chez la souris, des neurotransmetteurs synthétisés par les cellules nerveuses de la rétine a pu mettre en évidence la diversité des cellules amacrines (Ballesta et al., 1984; Marc, 1989; Pourcho, 1996). Diverses études morphologiques ont aussi démontré la grande diversité des cellules bipolaires (Ghosh et al., 2004), ganglionnaires (Coombs et al., 2006) et amacrines (Masland, 1988). Par conséquent, la rétine se retrouve à ne pas être seulement un lieu de réception d'un signal lumineux extérieur, mais elle constitue un véritable système nerveux assurant le pré-traitement de ce signal lumineux. Ainsi, suite à l'hyperpolarisation des photorécepteurs provoquée par le captage de photons, l'information est transmise, modulée et intégrée à travers ces neurones et interneurons pour finalement générer un potentiel d'action au niveau des CGR qui est propagé dans le nerf optique jusqu'aux aires visuelles supérieures.

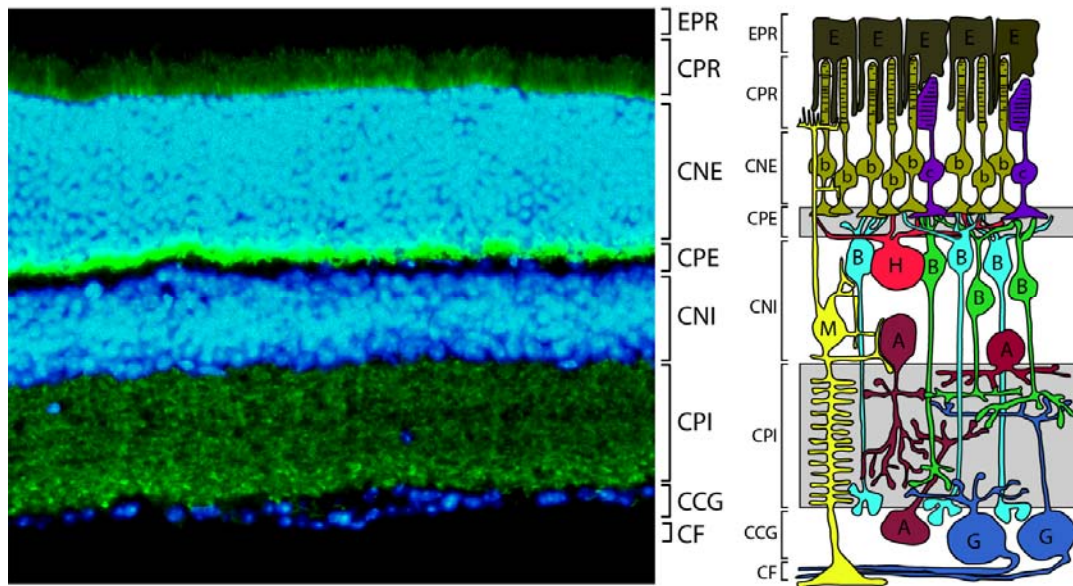


Figure 1. Structure et types cellulaires de la rétine de souris. À travers les différentes couches on retrouve les cellules ganglionnaires (G), amacriennes (A), bipolaires (B), horizontales (H), de Müller (M) ainsi que les cônes (c), bâtonnets (b) et l'épithélium pigmentaire (E).

I.2.3) LES SOUS-TYPES NEURONAUX DE LA RETINE

Différents neurones modulent et intègrent de façon très complexe l'information visuelle. Ceci nécessite une spécialisation de ces neurones de sorte que chaque type cellulaire est eux-mêmes divisés en plusieurs sous-types dépendamment de leur structure, fonction et/ou du type de neurotransmetteurs qu'ils émettent. Effectivement, chez la souris on retrouve jusqu'à 14 sous-types différents de CGR qui ont été caractérisés selon la morphologie particulière de leur corps cellulaire et de leurs dendrites (Coombs et al., 2006). Parmi ces 14 sous-types, on retrouve un type particulier de CGR, représentant 2% du nombre total de CGR (Hattar et al., 2002) impliqué dans les cycles circadiens qui possède la capacité de capter des

photons grâce à l'expression du pigment mélanopsine (Provencio et al., 1998). Au niveau des cellules amacrines, on retrouve entre 20 et 30 différents types morphologiques (Masland, 1988). Ces interneurons peuvent aussi être regroupés selon le neurotransmetteur que ceux-ci sécrètent. On retrouve ainsi les cellules amacrines GABAergiques qui représentent environ la moitié de toutes les cellules amacrines de la rétine et qui produisent le neurotransmetteur acide gamma-aminobutyrique (GABA). Avec une proportion plus faible, on retrouve aussi les cellules amacrines cholinergiques, glycinergiques et dopaminergiques qui libèrent l'acétylcholine (Ach), la glycine et la dopamine, respectivement. Les cellules bipolaires murines sont divisées en 10 sous-types distincts (Ghosh et al., 2004). Neuf de ces sous-groupes correspondent à des cellules bipolaires connectées à des cônes et peuvent être soit ON ou OFF alors que le dixième correspond au seul type de cellules bipolaires qui font synapse avec les bâtonnets. Les photorécepteurs sont divisés en cônes et en bâtonnets et sont les principales cellules responsables du captage des photons. La souris est un animal à vision dichromatique (Haverkamp et al., 2005). À l'instar des primates, l'existence de seulement deux types de pigment visuel à l'intérieur des cônes provoque une incapacité de discriminer les couleurs. On retrouve ainsi les cônes de type L et S ayant une absorption maximale de >500 nm et <500 nm respectivement (Mollon, 1989). On observe chez cet animal que les cônes se retrouvent distribués uniformément dans la rétine, à travers les bâtonnets qui sont plus de 30 fois nombreux (Carter-Dawson and LaVail, 1979). Enfin, les cellules horizontales murines ne sont pas divisées en sous-types. (Peichl and González-Soriano, 1994).

I.2.4) LES CELLULES GLIALES

Les cellules gliales existent en trois différents types dans la rétine de souris normale. La grande majorité de ces cellules sont les cellules de Müller. Étant des cellules gliales radiales spécialisées, les cellules de Müller s'étendent sur l'épaisseur entière de la rétine (Figure 1) en enveloppant tous les types de neurones et en projetant leurs pieds terminaux jusqu'à la lame limitante interne où ils contactent le corps vitré (Bringmann et al., 2006). Les cellules de Müller font aussi contact avec les vaisseaux sanguins présent dans la rétine avec lesquels ils peuvent échanger des molécules. L'une des fonctions principales des cellules de Müller est de maintenir l'homéostasie du milieu extracellulaire en régulant le métabolisme et le transport des neurotransmetteurs (Bringmann et al., 2006). Leur morphologie radiale s'étendant sur la totalité de l'espace rétinien leur confère aussi un rôle de support physique. La rétine contient aussi quelques astrocytes, caractérisés par l'expression constitutive de la protéine *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (Verderber et al., 1995), situés au niveau de couche fibreuse. Finalement, la rétine murine normale comprend aussi des microglies résidentes qui sont distribués au niveau des deux couches plexiformes (Hume et al., 1983).

I.2.5) LES AVANTAGES DE L'UTILISATION D'UN MODELE RETINIEN

Faisant partie du système nerveux central (SNC), la rétine constitue un excellent modèle *in vivo* pour l'étude de la survie neuronale, de la régénération axonale, du développement ou de la signalisation intercellulaire. De plus, la rétine est un compartiment facilement accessible pour l'administration par injection de molécules pharmacologiques, de virus ou de nucléotides et ce avec une invasivité

très limitée. Finalement, les structures et types cellulaires ainsi que les circuits ayant été très bien décrits dans la rétine facilitent considérablement son utilisation comme modèle du SNC.

I.3) LES NÉTRINES

Les nétrines ont été découvertes en tant que des facteurs capables de permettre la croissance axonale des neurones commissuraux qui sont compris à l'intérieur de la partie dorsale de la moelle épinière embryonnaire de poulet (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). Aujourd'hui, on connaît une panoplie de fonctions différentes pour les nétrines au niveau de l'organisme de plusieurs espèces animales. La famille des nétrines comprend plusieurs membres distincts ayant chacun une structure particulière mais possédant tous une certaine homologie avec la séquence de la protéine laminine (Moore et al., 2007). Chez les rongeurs, les nétrines se divisent en trois protéines sécrétées : nétrine-1, -3 et -4 ainsi qu'en la sous-classe nétrine-G représentée par les nétrine-G1 et -G2 (Moore et al., 2007). Les nétrines ont été fortement conservés à travers l'évolution de sorte que l'on retrouve des orthologues des nétrines chez tous les modèles animaux étudiés que ce soit le ver *Caenorhabditis elegans* (Hedgecock et al., 1990; Wadsworth et al., 1996), le rat (Kennedy et al., 1994), la souris (Skarnes et al., 1995), la drosophile (Mitchell et al., 1996), le poulet (Serafini et al., 1994), le poisson zébré (Strähle et al., 1997), le xénope (de la Torre et al., 1997) et l'humain (Van Raay et al., 1997). La Figure 2 (page suivante), représentant l'arbre phylogénétique des nétrines chez différentes espèces à symétrie bilatérale, souligne la conservation de cette famille au cours de l'évolution.

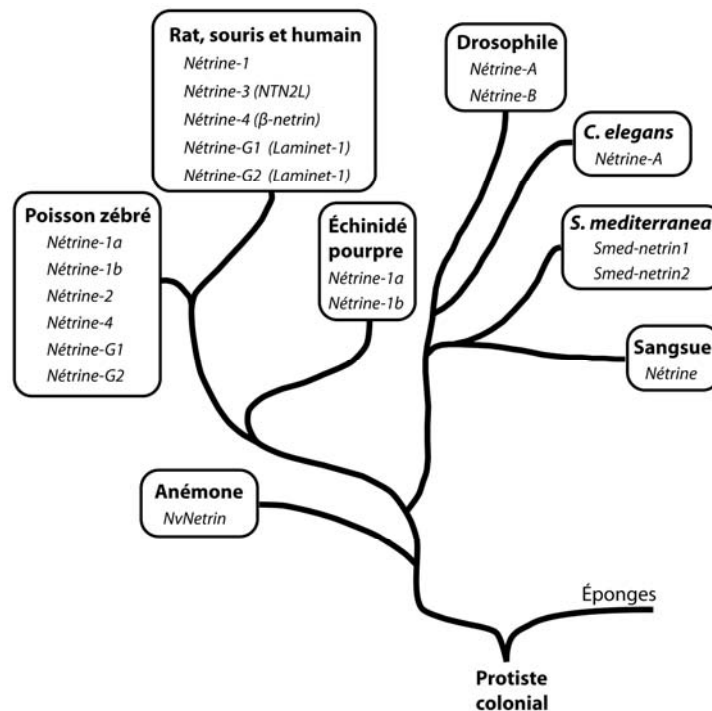


Figure 2. Relations phylogénétique des nétrines à travers l'évolution.

Tous les membres de la famille des nétrines chez ces espèces à symétrie bilatérale proviennent de l'évolution d'une nétrine présente chez un ancêtre protiste commun. Cette figure a été inspirée par Moore et al.

I.3.1) LA STRUCTURE MOLÉCULAIRE DES NÉTRINES

I.3.1.1) LA NÉTRINE-1

La nétrine-1 est sans doute le membre de cette famille le plus étudié et dont les fonctions ont été les plus répertoriées. Chez la souris, la nétrine-1 est le produit du gène *ntn1*. Cette protéine contient 604 acides aminés et possède un poids moléculaire calculé d'environ 68 kiloDalton (kDa). Cependant, la présence de quatre sites potentiels de N-glycosylation (Geisbrecht et al., 2003) lui confère, suite aux modifications post-traductionnelles, un poids réel d'environ 75 kDa. La partie N-terminale de la nétrine-1 possède une forte homologie avec des domaines V et VI du

bras court de la chaîne γ de la laminine (Figure 3, page 11) de sorte que l'on retrouve à l'intérieur du domaine V de nétrine-1 trois répétitions *epidermal-growth factor* (EGF)-like similaires à ceux de la laminine (appelés V-1, V-2 et V-3) (Cirulli and Yebra, 2007). La partie C-terminale de nétrine-1 ne correspond toutefois pas à une séquence de la laminine. On retrouve à la place un domaine positivement chargé appelé domaine C. De plus, on retrouve la présence potentiel d'un peptide signal juste avant le commencement du domaine VI .

I.3.1.2) LA NÉTRINE-3

La nétrine-3 a été découvert chez les mammifères un peu plus tard comme étant l'ortologue du gène humain *NTN2L* (*netrin-2-like*) (Wang et al., 1999) en faisant référence à la protéine nétrine-2 du poulet qui était déjà découverte. La structure moléculaire de la nétrine-3 est très semblable à celle de la nétrine-1 (Figure 3, page suivante). On y retrouve en effet la même organisation structurale que chez nétrine-1 et la même homologie avec la laminine. Cependant, la longueur protéique de nétrine-3 est plus courte de 24 acides aminés, ce qui lui donne un total de 580 acides aminés. Le poids moléculaire théorique est alors d'environ 62 kDa. Cependant, même si aucune donnée n'est disponible quant à son poids moléculaire *in vivo*, la présence de deux sites potentiels de N-glycosylation identifiées (base de données protéique Uniprot, www.uniprot.org) envisage un poids réel supérieur comme pour le cas de la nétrine-1.

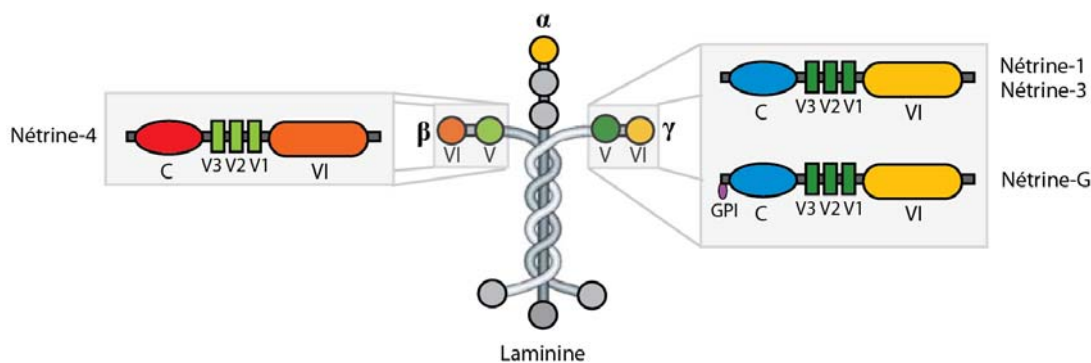


Figure 3. Structure moléculaire des nétrines. Les nétrines de la souris sont constituées de trois domaines principaux. On retrouve en N-terminale les domaines V et VI, qui possèdent une forte homologie avec des domaines V et VI du bras court de la chaîne γ de la laminine. En C-terminale, on retrouve le domaine C positivement chargé. Le domaine V est lui-même divisé en trois répétitions *epidermal-growth factor* (EGF)-like similaires à ceux de la laminine (V-1, V-2 et V-3). Les nétrines-G possèdent une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) à leur extrémité C-terminale. Cette figure a été inspirée par Cirulli et al.

I.3.1.3) LA NÉTRINE-4

La nétrine-4 est le troisième membre identifié de la famille des nétrines chez les rongeurs (Yin et al., 2000). Cette nétrine est différente des deux autres dans le sens que son homologie avec la laminine se fait plutôt avec sa sous-unité β (Figure 3), d'où le nom β -nétrine lui ayant été attribué originalement (Koch et al., 2000). À la ressemblance de la nétrine-1, la nétrine-4 possède elle aussi un peptide signal, un domaine VI, un domaine V, comprenant trois sous-domaines répétitions EGF-like et un domaine C positivement chargé. De plus, quatre sites potentiels de N-glycosylations sont présents sur cette protéine (base de données protéique Uniprot, www.uniprot.org) de 628 acides aminés (Cirulli and Yebra, 2007). Il a été répertorié

qu'une version tronquée de la nétrine-4, sans peptide signal, pouvait être produite par épissage alternatif (Zhang et al., 2004).

I.3.1.4) LES NÉTRINES-G

Il existe finalement un dernier membre de la famille des nétrines; la nétrine-G qui comprend les deux isoformes nétrine-G1 et nétrine-G2. Ayant une structure moléculaire très similaire aux nétrine-1,-3 et -4 (Figure 3, page précédente), les nétrine-G possèdent en plus une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Nakashiba et al., 2000) leur permettant de rester fixées aux membranes des cellules qui les expriment et d'être alors des protéines non sécrétées. En plus de cette différence structurelle majeure avec les trois autres nétrines, les nétrine-G ont des fonctions moléculaires très divergentes des nétrines classiques, qui ne seront pas décrites dans le présent mémoire, les réunissant ainsi dans une classe à part appelée « laminets » (Yin et al., 2002).

I.3.2) LA LOCALISATION TISSULAIRE DES NÉTRINES

Les nétrines sont des protéines exprimées dans plusieurs parties de l'organisme et l'éventail de leurs fonctions au niveau développemental est très large. Différentes études d'expression ont détecté la présence de nétrine-1 dans plusieurs parties du SNC embryonnaire notamment au niveau de la moelle épinière (Kennedy et al., 1994), du cervelet (Guijarro et al., 2006), de l'hippocampe (Barallobre et al., 2000) et de la rétine (Deiner et al., 1997a). La nétrine-1 est aussi retrouvée dans le système nerveux périphérique (SNP) au niveau du nerf sciatique de rat (Madison et al., 2000a). Récemment, la distribution s'est élargie au niveau de tissus non-

neuronaux tels que les reins (Wang et al., 2008), les os (Togari et al., 2000), les vaisseaux sanguins (Park et al., 2004), les poumons (Liu et al., 2004) et au niveau des cellules souches de plusieurs tissus (Fitzgerald et al., 2007; Fitzgerald et al., 2006; Petit et al., 2007). Jusqu'à maintenant, très peu de laboratoires se sont attardés à l'étude de la nétrine-3 de sorte que la quantité d'information disponible y est extrêmement réduite. On sait toutefois que l'expression de la nétrine-3 est pratiquement exclus du SNC en développement (Wang et al., 1999). La nétrine-3 a plutôt été détecté dans le SNP au niveau des ganglions sensoriels (Wang et al., 1999) et sympathiques (Seaman and Cooper, 2001) et au niveau de neurones moteurs. (Seaman and Cooper, 2001). Une étude chez le rat adulte a aussi démontré que la nétrine-3 était exclus de la moelle épinière (Manitt et al., 2001). Les études d'expression de la nétrine-4 ont démontré que celle-ci possédait principalement une localisation au niveau des tissus neuronaux et non-neuronaux avec une prépondérance au niveau des membranes basales de l'organisme, notamment au niveau des reins, du système vasculaire et des ovaires (Koch et al., 2000).

I.3.3) LES RÉCEPTEURS DES NÉTRINES

Les nétrines, étant des protéines sécrétées, accomplissent leurs fonctions à travers des récepteurs membranaires situés sur plusieurs différents types cellulaires. Trois différentes familles de récepteurs de nétrines sont connues jusqu'à ce jour: les récepteurs appelés Deleted in colorectal cancer (DCC), les homologues à UNC-5 (UNC5h) et le récepteur Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM). Chez la souris, la famille de récepteur DCC comprend deux membres, DCC et néogénine. La famille UNC5H comprend les quatre protéines UNC5A, UNC5B, UNC5C et

UNC5D. Il a été démontré que chacune des trois nétrines sécrétées possédait la capacité de lier les récepteurs des familles DCC et UNC5H mais avec différentes affinités (Keino-Masu et al., 1996; Leonardo et al., 1997; Qin et al., 2007; Wang et al., 1999) permettant ainsi un potentiel multifonctionnel des nétrines au sein de l'organisme. Nous verrons plus loin que dépendamment d'avec quel récepteur les nétrines sécrétées se lieront, des réponses cellulaires très opposées peuvent être observées comme par exemple une attraction ou une répulsion des corps cellulaires ou des cônes de croissance axonaux exprimant ces récepteurs. De plus, nous verrons que les nétrines ont la capacité de fonctionner à courte ou longue distance.

I.3.4) LA STRUCTURE MOLECULAIRE DES RECEPTEURS DES NETRINES

I.3.4.1) LE RÉCEPTEUR DCC

Le récepteur DCC est le premier récepteur de nétrine qui a été découvert (Keino-Masu et al., 1996). D'abord identifié comme un gène suppresseur de tumeurs altéré dans 70% des cancers colorectaux (Fearon et al., 1990), DCC fut ensuite décrit comme étant capable de lier nétrine-1 et nécessaire afin d'engendrer la croissance des axones des neurones commissuraux (Keino-Masu et al., 1996). La protéine DCC possède 1447 acides aminés et pèse environ 180 kDa. Elle fait partie de la superfamille des immunoglobulines (Ig) indiquée par la présence de quatre domaines Ig dans sa partie extracellulaire (Fearon et al., 1990) (Figure 4, page suivante). On y retrouve aussi six répétitions fibronectine de type III (FBNIII) dont la quatrième et la cinquième répétition requises pour la liaison avec nétrine-1 (Geisbrecht et al., 2003). Le récepteur DCC possède également un domaine transmembranaire et une

partie cytoplasmique contenant trois domaines conservés nommés P1, P2 et P3 (Kolodziej et al., 1996).

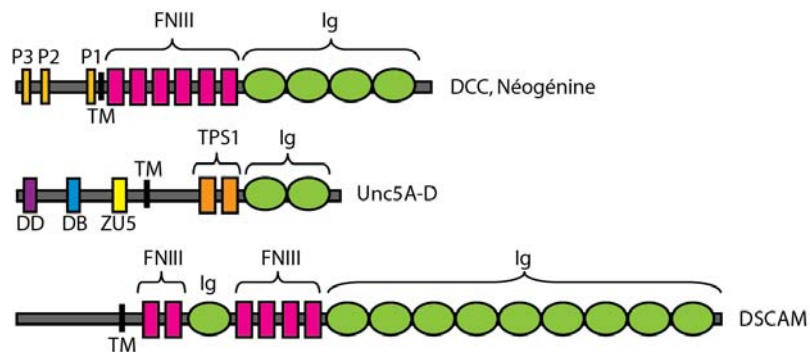


Figure 4. Structure moléculaire des récepteurs de nétrines. Les récepteurs des nétrines sont des membres de la superfamille des immunoglobulines. Les récepteurs de la famille DCC sont constitués de quatre domaines immunoglobulines (Ig), six domaines fibronectine de type III (FNIII), trois domaines cytoplasmiques (P1, P2 et P3) ainsi qu'un domaine transmembranaire (TM). Les récepteurs de la famille des homologues à UNC-5 sont constitués de deux domaines immunoglobulines (Ig), deux domaines thrombospondin-1, un domaine transmembranaire (TM), un domaine zonula occludens-5 (ZU5), un domaine *DCC-binding* (DB) et un domaine de mort (DD). Les récepteurs DSCAM sont composée de dix domaines immunoglobulines (Ig), six domaines fibronectine de type III (FBNIII) et d'un domaine transmembranaire (TM).

I.3.4.2) LE RÉCEPTEUR NÉOGÉNINE

Le récepteur néogénine est le deuxième membre de la famille des récepteurs DCC (Vielmetter et al., 1994) et possède une structure identique à DCC avec une forte homologie de séquence (Figure 4). Cependant, la version murine de néogénine possède une longueur supérieure à DCC; celle-ci est en effet constituée de 1492 acides aminés ce qui donne un poids moléculaire d'environ 190 kDa. En plus

d'interagir avec les nétrines, il a été démontré que néogénine est le récepteur principal des *repulsive guidance molecules* (RGM) (Rajagopalan et al., 2004).

I.3.4.3) LES RÉCEPTEURS HOMOLOGUES À UNC-5

La famille des récepteurs homologues à UNC-5 (UNC5H) a été découverte chez le rat par homologie de séquence avec le récepteur établi UNC-5 du ver *C. elegans* (Leonardo et al., 1997). À ce jour, quatre gènes codant chacun pour un récepteur unique d'environ 130 kDa sont retrouvés chez la souris soit: UNC5A, UNC5B, UNC5C et UNC5D. Tous les membres de la famille UNC5H possèdent une structure semblable qui consiste en deux domaines Ig et deux domaines thrombospondin-1 (TSP-1) situés dans la région extracellulaire (Leonardo et al., 1997) (Figure 4, page précédente). La région intracellulaire comprend un domaine zonula occludens-5 (ZU5), un domaine liant DCC (*DCC-binding*; DB) (Hong et al., 1999) et un domaine de mort (*death domain*; DD) (Hofmann and Tschopp, 1995). La liaison à nétrine-1 se fait via les répétitions Ig (Geisbrecht et al., 2003). Différents épissages alternatifs ont été répertoriés pour ces récepteurs (Manitt et al., 2004) augmentant ainsi potentiellement la diversité de leurs fonctions.

I.3.4.4) LE RÉCEPTEUR DSCAM

D'abord classé comme un récepteur orphelin de la superfamille des Ig impliqué dans les déficits intellectuels observés chez les sujets atteints du syndrome de Down (Yamakawa et al., 1998), DSCAM a récemment été identifié comme étant un véritable récepteur des nétrines, notamment de nétrine-1 (Liu et al., 2008; Ly et al., 2008). Avec ses 2013 acides aminés, le récepteur DSCAM murin pèse environ

250 kDa. Sa structure protéique est composée de dix domaines Ig et six domaines FBNIII dans sa partie extracellulaire (Yamakawa et al., 1998) (Figure 4, page précédente).

I.3.5) RÉPULSION VS ATTRACTION

Une des principales fonctions des nétrines étudiées et documentées est leur effet sur la répulsion ou l'attraction des cônes de croissance des axones. Les neurones embryonnaires projettent leurs axones correctement grâce à une spécialisation de leur extrémité appelée cône de croissance. Le cône de croissance est en fait une structure dynamique composée de lamellipodes et de projections cytoplasmiques fines appelées fillipodes. Munis d'une multitude de récepteurs, ces fillipodes interagissent avec l'environnement moléculaire et peuvent contrôler l'orientation de la croissance de l'axone dépendamment des molécules rencontrées. Les deux actions possibles qui peuvent être observé sur un cône de croissance sont l'attraction ou la répulsion de celui-ci envers une source moléculaire précise. Il a été suggéré que l'effet des nétrines dépend du récepteur ou de la combinaison de récepteurs exprimés par une cellule à un endroit et un moment donné. En effet, plusieurs études ont démontré que l'expression du récepteur DCC incitait l'attraction des axones vers une source de nétrine-1 (Deiner et al., 1997a; Fazeli et al., 1997; Keino-Masu et al., 1996) alors que d'autres ont suggéré que la présence des récepteurs UNC5H provoquait plutôt leur répulsion (Leung-Hagesteijn et al., 1992; Przyborski et al., 1998). Une autre étude a par la suite démontré que la formation d'un complexe composé de DCC et de UNC5H provoquait préférentiellement une répulsion suite à la reconnaissance de nétrine-1 (Hong et al., 1999). Tout porte alors

à croire que l'effet des nétrines sur le cône de croissance dépend autant de la nature du récepteur exprimé que celle du ligand sécrété.

I.3.6) LA TRANSDUCTION DE SIGNAL

Le comportement de répulsion ou d'attraction observé sur le cône de croissance axonal, suite à la reconnaissance d'une nétrine par un récepteur, est causé par une cascade de signalisation intracellulaire que celui-ci engendre. Il a été démontré que les cônes de croissance des axones peuvent se mouvoir dans l'espace grâce au constant remodelage du cytosquelette d'actine présent à l'intérieur des ses lamellipodes et fillipodes (Bentley and O'Connor, 1994). La coordination de l'élongation versus le raccourcissement de l'actine est contrôlée en partie grâce à la famille des Rho-guanidine triphosphatase (Rho-GTPases) (Hall, 1998). Il a été démontré que les cônes de croissance des neurones commissuraux sont guidés dans la moelle épinière embryonnaire par entre autre des récepteurs DCC situés aux extrémités des fillipodes (Shekarabi and Kennedy, 2002). Il a ensuite été montré que la reconnaissance de nétrine-1 par ces cônes de croissance engendrait le recrutement de plusieurs protéines via le domaine intracellulaire de DCC. En effet, la liaison de nétrine-1 à DCC provoque la dimérisation de DCC (Stein et al., 2001) et ensuite le recrutement et l'activation des protéines Rho-GTPases *cell division cycle 42* (Cdc42) et *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) et aussi des protéines *p21-activated kinase 1* (Pak1) et *neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein* (N-WASP) (Shekarabi et al., 2005). Pour corroborer le lien entre l'activation de cette cascade intracellulaire et la réorganisation de l'actine, cette même étude a démontré que la perturbation de cette voie de signalisation empêchait l'expansion du cône de

croissance en présence de nétrine-1 (Shekarabi et al., 2005). Une autre étude a démontré que l'expansion du cône de croissance suite à la liaison entre nétrine-1 et DCC nécessitait aussi l'activation de la voie PIP2 ainsi que l'activation en parallèle de l'enzyme phospholipase C γ (PLC γ) par phosphorylation au niveau de résidus tyrosine (Xie et al., 2006). Pour ce qui est de la signalisation en aval des récepteurs UNC5h et DSCAM, très peu de documentation est disponible.

I.3.7) LONGUE-DISTANCE VS COURTE-DISTANCE

I.3.7.1) EFFET SUR UNE LONGUE DISTANCE

En plus d'avoir la double fonction d'attirer ou de repousser les cônes de croissance, les nétrines possèdent la caractéristique double de fonctionner à courte ou longue distance. Il a été démontré de façon très convaincante que les nétrines exercent un effet d'attraction longue distance lorsque des explants de la partie ventrale de moelle épinière embryonnaire de rat ont été placés à une distance de 250 μm d'explants de la partie dorsale de la même moelle épinière. Les neurones commissuraux présents dans la partie dorsale ont alors été attirés par la source de nétrines produite par les cellules de la partie ventrale (Kennedy et al., 1994). De plus, il a été démontré que l'ajout ponctuel à la micropipette de nétrine-1 recombinante était suffisant pour permettre l'attraction des axones de neurones rétiniens isolés envers cette source (de la Torre et al., 1997).

I.3.7.2) EFFET SUR UNE COURTE DISTANCE

En plus de la possibilité d'attirer ou de repousser des axones situés relativement loin de leur source, les nétrines ont aussi été démontrées comme étant aptes à produire un effet local, donc à courte distance, sur les cônes de croissance de certains neurones. Effectivement, des études ont établi que les nétrines n'étaient pas nécessaires afin d'orienter les axones des neurones commissuraux vers la ligne médiane du SNC embryonnaire chez la drosophile mais qu'elles étaient plutôt requises uniquement afin de permettre à ceux-ci de traverser cette ligne médiane (Brankatschk and Dickson, 2006). Comme nous le verrons plus loin, la même observation a été faite dans la rétine, où les axones des CGR n'ont pas besoin de nétrine-1 afin de naviguer jusqu'à l'entrée du nerf optique mais bien seulement pour y pénétrer et quitter la rétine (Deiner et al., 1997).

I.4) FONCTIONS DES NETRINES DANS LE DEVELOPPEMENT NEURONAL

De plus en plus d'études démontrent que les nétrines sont impliquées dans le développement des circuits du SNC. Effectivement, découvertes d'abord pour leurs rôles dans le développement de la moelle épinière (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1996), les nétrines se sont vues par la suite attribuées des fonctions de guidage axonal dans le développement du circuit auditif de la cochlée (Howell et al., 2007), du tract longitudinal dopaminergique (Kastenhuber et al., 2009) et de la rétine (Deiner et al., 1997a). Étant le tissu au centre de l'intérêt du présent mémoire, une emphase particulière sera portée sur l'implication des nétrines et de leurs récepteurs dans la rétine des rongeurs.

I.4.1) LES IMPLICATIONS DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA RETINE

Suite à l'observation que nétrine-1, DCC (Livesey and Hunt, 1997) et néogénine (Vielmetter et al., 1994) étaient exprimés dans la rétine embryonnaire du rat et du poulet respectivement, une étude fonctionnelle chez la souris a démontré que l'interaction entre nétrine-1 et DCC permettait de guider localement les axones des cellules ganglionnaires de la rétine en croissance afin de leur permettre de quitter la rétine et de former le nerf optique (Deiner et al., 1997). L'utilisation de souris transgéniques *knock out* (KO) pour les gènes de DCC ou de nétrine-1 a permis l'observation d'axones qui réussissent à s'orienter correctement vers le disque optique mais sans toutefois pouvoir s'y introduire (Deiner et al., 1997) suggérant ainsi un rôle de guidage à courte distance puisque ces derniers réussissaient toutefois à se diriger vers le centre de la rétine. Une autre étude a démontré qu'en plus de son expression axonale, DCC est exprimé au niveau de la couche plexiforme interne chez l'embryonnaire de rat, suggérant ainsi un rôle au niveau de la ségrégation des différentes laminas de cette couche dendritique, notamment des dendrites des cellules amacrines (Johansson et al., 2001b). L'effet d'attraction de nétrine-1 sur les axones des CGR a aussi été démontré chez le xénope alors qu'un ajout ponctuel de nétrine-1 à l'aide d'une micropipette était suffisante pour permettre le changement de direction rapide des CGR (de la Torre et al., 1997). Sans avoir pu lui attribuer une fonction particulière une seconde étude a démontré l'expression des récepteurs UNC5H dans la rétine en développement du xénope (Anderson and Holt, 2002). DSCAM a récemment été démontré comme étant impliqué dans la correcte arborisation des dendrites des cellules amacrines (Fuerst et al., 2008) et dans le contrôle de la connectivité lamina-spécifique à l'intérieur de la couche plexiforme

interne (Yamagata and Sanes, 2008) lors du développement de la rétine. Cependant, quoi que DSCAM soit un récepteur pouvant lier nétrine-1, aucun résultat n'a été démontré quant à la nécessité de ce ligand dans ces deux processus développementaux.

I.4.2) LES IMPLICATIONS DANS LA SYNAPTOGENESE

En plus de ses effets sur la migration des cellules et des axones, les nétrines peuvent aussi diriger la formation de nouvelles synapses. Il a été démontré que l'expression gliale de UNC-6 (l'orthologue de nétrine-1) chez le ver *C. elegans* permettait à travers UNC-40 (l'orthologue de DCC) de guider la synaptogénèse entre les deux interneurons cholinergiques dénommés « AIY » et « RIA » (Colon-Ramos et al., 2007). Il a de plus été démontré que, lors de l'établissement de la carte rétinoectale du xénope, l'arborisation dendritique des CGR ainsi que la formation de synapse avec les cellules tectales étaient dépendantes de la sécrétion de nétrine-1 et de la signalisation engendré par DCC (Manitt et al., 2009). En effet, la démonstration qu'une simple injection de nétrine-1 au niveau du tectum provoquait l'ajout de sites présynaptiques (Manitt et al., 2009) démontra cette fonction des nétrines dans la synaptogénèse.

I.4.3) LES IMPLICATIONS DANS LE GUIDAGE DENDRITIQUE

Il semble évident maintenant que les molécules de guidages axonal classiques possèdent aussi la propriété d'accomplir un guidage dendritique (Kim and Chiba, 2004). Il a été découvert récemment chez la drosophile que les nétrines, à travers le récepteur *frazzled* (l'orthologue de DCC) permettaient à des dendrites de motoneurons nommés « aCC » de traverser adéquatement la ligne médiane (Furrer

et al., 2003). Cet effet pu être observé dans les mouches mutantes *frazzled* et *netrin* chez qui la distribution des dendrites de ces motoneurones était erronée dans les deux mutants au niveau de la ligne médiane (Furrer et al., 2003b). La restauration du phénotype sauvage par la réexpression d'une forme normale de *frazzled* permet de confirmer la nécessité de ce récepteur pour obtenir un guidage approprié des dendrites du motoneurones « aCC » (Furrer et al., 2003b).

I.4.4) ADHÉRENCE CELLULAIRE

Plusieurs résultats font état que suite à leur sécrétion les nétrines ne sont pas des molécules qui restent libres et solubles mais plutôt associées aux membranes ou aux matrices extracellulaires (Manitt et al., 2001; Serafini et al., 1994). Avec leur capacité de lier l'héparine (Serafini et al., 1994), les glycosaminoglycans (GAG) (Kappler et al., 2000), les laminines (Schneiders et al., 2007), les intégrines et le collagène de type IV (Yebra et al., 2003), les nétrines possèdent un fort potentiel d'adhérence cellulaire via leurs récepteurs membranaires. Il a été démontré que la présence de nétrine-1 immobilisée permettait à des neurones spinaux embryonnaires de rester fixés au fond des plaques d'essai et que cette adhérence était compromise par l'incubation préalable avec une version chimérique de DCC (Shekarabi et al., 2005).

I.5) LES FONCTIONS DES NÉTRINES DANS LE DÉVELOPPEMENT NON-NEURONAL

Il est évident depuis plusieurs années que les nétrines contribuent au développement du SNC. La littérature est maintenant remplie de données montrant

que les nétrines participent aussi au développement d'autres systèmes, non-neuronaux, de l'organisme. Il a ainsi été démontré que la nétrine-1 permettait la dispersion de cellules précurseurs d'oligodendrocytes dans le nerf optique (Sugimoto et al., 2001) et la moelle épinière (Tsai et al., 2003) en agissant comme agent chimio-repoussant sur ces cellules gliales (Jarjour et al., 2003). Par ailleurs, la nétrine-1 a été démontré comme ayant un rôle de stabilisation dans le morphogénèse de la glande mammaire à travers son récepteur néogénine (Srinivasan et al., 2003) et dans la morphogénèse de l'alvéole pulmonaire en parallèle avec la nétrine-4 où ces derniers moduleraient la croissance des bourgeons épithéliaux (Liu et al., 2004). Aussi, plusieurs données de fonctions dans l'angiogénèse ont été présentées. Effectivement, alors que l'induction de l'angiogénèse par nétrine-1 a été démontrée via le récepteur DCC (Nguyen and Cai, 2006; Park et al., 2004), la répulsion de filopodes de cellules endothéliales a été aussi observée lorsque le récepteur UNC5B était présent (Larrivée et al., 2007; Lu et al., 2004), définissant ainsi ce récepteur comme une cible anti-angiogénique. Les nétrines sont donc des protéines de développement à très large spectre.

I.6) LES IMPLICATIONS DES NÉTRINES CHEZ L'ANIMAL ADULTE

Bien que les implications des nétrines au sein de l'organisme aient surtout été démontrées au stade embryonnaire, des informations faisant référence à l'expression et aux fonctions des nétrines chez l'adulte commencent à émerger. Ayant été d'abord retrouvées chez la rat au niveau du SNP adulte (Madison et al., 2000a) les nétrines ont par la suite été découvertes au niveau du SNC adulte (Manitt

et al., 2001; Osborne et al., 2005). Les différentes fonctions répertoriées dans le système nerveux adulte seront décrites dans les prochaines sections.

I.6.1) LES IMPLICATIONS DANS LA MOELLE EPINIÈRE ADULTE

Au niveau de la matière grise et blanche de la moelle épinière adulte, plusieurs cellules exprimant nétrine-1 sont retrouvées. Des études de colocalisations ont démontré que ces cellules pouvaient être soit des neurones ou des cellules gliales, notamment des oligodendrocytes (Manitt et al., 2001). En performant l'analyse protéique de fractions obtenues suite à des techniques de fractionnement cellulaire, cette étude a démontré que nétrine-1 devait être associée à l'espace périaxonal, suggérant ainsi un rôle au niveau de l'interaction axone-glie. Cette fonction a par la suite été prouvée lorsqu'une autre étude a démontré que la maintenance des nœuds paranodaux nécessitait à la fois nétrine-1 et DCC (Jarjour et al., 2008). Cette étude a en effet montré que les protéines DCC et nétrine-1 étaient enrichies particulièrement au niveau de la région paranodale de la myéline et qu'un manque de l'une ou l'autre de ces protéines contribuait à sa désorganisation par détachement des nœuds paranodaux.

I.6.2) LES IMPLICATIONS DANS LA RETINE ADULTE

Au niveau de la rétine, des résultats contradictoires ne permettent pas de connaître la véritable fonction des nétrines. En effet, alors qu'une première étude a démontré par immunohistochimie que l'expression de nétrine-1 disparaît dans la rétine du rat adulte (Petrausch et al., 2000b), une seconde a affirmé qu'elle était ubiquitaire au niveau de la couche des cellules ganglionnaires et de la couche nucléaire interne (Ellezam et al., 2001). Pour ce qui est des récepteurs, il a été

démontré que suite à son rôle de guidage axonal des CGR, la protéine DCC subit une diminution progressive de son expression et cesse d'être exprimée totalement chez le rat adulte, malgré le fait que son niveau transcriptionnel reste inchangé au cours du développement (Johansson et al., 2001b). Par contre, une autre étude a démontré que les récepteurs DCC et UNC5B continuent d'être exprimés chez la rétine adulte et qu'ils contribuent ainsi probablement à la régulation de la régénération axonale des CGR (Ellezam et al., 2001). Tous ces résultats directement opposés complexifient donc la compréhension du rôle des nétrines dans la rétine adulte

I.6.3) L'INHIBITION DE LA REGENERATION AXONALE

Selon plusieurs études, les nétrines semblent jouer un rôle prépondérant au niveau de l'inhibition de la croissance axonale chez l'animal adulte. Effectivement, il a été démontré qu'au cours du développement du rat, un basculement entre l'expression prédominante du récepteur DCC vers l'expression des récepteurs UNC5H s'opérait dans la moelle épinière (Manitt et al., 2004), laissant ainsi une place plus importante aux récepteurs à effet chimio-repoussant. Cette étude a alors suggéré que ce changement du type de récepteur de nétrines exprimé pourrait ainsi créer un environnement repoussant pour la croissance de nouveaux axones. Une seconde étude a démontré que suite à une myélotomie sagittale de la moelle épinière, on observait à long terme à la fois une diminution de 50% de l'expression des récepteurs DCC, une expression renforcée des récepteurs UNC5H dans les neurones lésés et une expression maintenue de nétrine-1 par les oligodendrocytes entourant la lésion (Manitt et al., 2006). Réunis, ces observations suggèrent que ces régulations

de l'expression des récepteurs de nétrines contribuent en partie à l'incapacité des axones lésés à régénérer. Cette hypothèse a aussi été supportée par les observations qu'un ajout de nétrine-1 purifiée à des explants de ganglions spinaux adultes diminuait la croissance spontanée de leurs axones (Park et al., 2007) et qu'une surexpression locale de nétrine-1 suite à une lésion cervicale diminuait significativement la régénération axonale *in vivo* de neurones exprimant UNC5H (Low et al., 2008).

Dans la rétine, le rôle des nétrines dans l'incapacité des axones des CGR de régénérer suite à une lésion a aussi été évalué. Malgré la présence des résultats opposés décrits plus haut, les deux études ont démontré par hybridation *in situ* que suite à une lésion du nerf optique adulte, une diminution des récepteurs de nétrines s'observait au niveau des CGR, malgré une greffe de nerf périphérique, et que cette diminution devait avoir un rôle au niveau de la capacité limitée des neurones à la régénération (Ellezam et al., 2001; Petrusch et al., 2000b).

I.6.4) LES NÉTRINES DANS L' APOPTOSE

Depuis une dizaine d'années, plusieurs études se sont intéressées aux rôles des nétrines dans la tumorigénicité, plus précisément aux rôles que les nétrines et leurs récepteurs peuvent prendre dans l'apoptose. Il a ainsi été démontré que la surexpression *in vitro* de DCC était suffisante pour provoquer l'apoptose de cellules en culture et que la coexpression de nétrine-1 et de DCC empêchait cette apoptose (Mehlen et al., 1998). Cette découverte a ainsi permis l'attribution à DCC du qualificatif de « *dependance receptor* » et l'élaboration de l'hypothèse que la présence de nétrines ne permet pas seulement de guider les axones en croissance

mais aussi de participer en même temps de leur survie ou de leur mort par apoptose. Les mêmes observations *in vitro* ont aussi été faites ensuite avec les récepteurs homologues à UNC-5 (Llambi et al., 2001). La démonstration par ces deux études que les récepteurs de nétrines sont aussi des substrats pour les caspases et que leur clivage était impliqué dans le processus apoptotique a d'autant plus renforcé cette hypothèse. Par la suite, il a été démontré chez l'embryon de souris et de poulet que l'expression de nétrine-1 au niveau des neurones commissuraux inhibait le processus apoptotique engendré par DCC (Furne et al., 2008). Cette étude a en effet démontré que la simple diminution de nétrine-1 par l'expression de *short hairpin ribonucleic acid* (shRNA) à l'intérieur de la moelle épinière du poulet en développement y augmentait drastiquement le nombre de cellules apoptotiques. À l'opposé, une seconde étude a démontré que le récepteur UNC5A pouvait contrôler l'apoptose dans la moelle épinière embryonnaire mais ce, indépendamment de la présence de nétrine-1 (Williams et al., 2006).

Avec cette capacité d'agir sur l'apoptose, l'implication des nétrines dans la tumorigénicité a ensuite été évaluée. Ainsi, il a été démontré qu'alors que DCC est retrouvé muté dans la 70% des cancers colorectaux (Fearon et al., 1990), mais que l'introduction de la forme sauvage de DCC dans des xénogreffes de tumeurs a permis de réduire leur invasion et leur potentiel métastatique dans les souris inoculées (Rodrigues et al., 2007). Par ailleurs, un lien entre le suppresseur de tumeur p53 et les nétrines a été établi. Il a en effet été démontré que le facteur de transcription p53 pouvait directement contrôler l'expression de nétrine-1 et UNC5B (Tanikawa et al., 2003) et que ces derniers pouvaient à leur tour, par leur présence ou leur absence, agir sur l'apoptose induite par p53 (Arakawa, 2005). Plus

récemment, il a été montré que la production autocrine de nétrine-1 par les cellules tumorales de neuroblastomes provoquait l'inhibition de leur apoptose agissant ainsi comme un facteur de survie (Delloye-Bourgeois et al., 2009). Ensemble, ces observations suggèrent fortement que les nétrines et leurs récepteurs sont impliqués dans la survie et la dissémination de cellules cancéreuses.

I.7) OBJECTIFS DE RECHERCHE ET APPROCHES EXPÉRIMENTALES

Avec de plus en plus d'information sur l'implication des nétrines dans le fonctionnement de l'animal adulte, nous avons voulu évaluer l'importance des nétrines dans le système visuel adulte de la souris. **Pour ce faire, ce projet de recherche s'est voulu une étude qualitative de l'expression des nétrines et de ses récepteurs dans la rétine de la souris adulte.**

La présence dans la littérature de résultats contradictoires quant à leurs expression et fonctions dans la rétine adulte sème une quantité de questions fondamentales qui demeurent toujours nébuleuses. Afin de pouvoir permettre la compréhension de leurs rôles potentiels chez l'adulte nous avons voulu résoudre ces questionnements en reconsidérant l'expression des nétrines dans la rétine de souris adulte avec de meilleurs outils. Nous avons analysé l'expression des nétrines et de leurs récepteurs DCC, néogénine et les récepteurs homologues à UNC-5 en utilisant le maximum de techniques différentes afin d'assurer la rigueur des résultats. Des méthodes de *reverse-transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR), d'immonobuvardage de type Western et d'immunohistochimie ont alors été utilisées sur des tissus de souris adultes sauvages et transgéniques.

CHAPITRE 2

II) MANUSCRIT QUI SERA SOUMIS À NEUROSCIENCE

EXPRESSION OF NETRIN-3, BUT NOT NETRIN-1, IN THE ADULT**RETINA**

Mathieu Simard¹, Timothy E. Kennedy² and Adriana Di Polo¹

¹Department of Pathology and Cell Biology and Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3T 1J4,
²Centre for Neuronal Survival, Montreal Neurological Institute, Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Section Editor: Dr. Constantino Sotelo (Cellular)

Running title: Expression of netrin-3 and its receptors in the mature retina.

Correspondence to: Dr. Adriana Di Polo
Department of Pathology and Cell Biology
Université de Montréal
2900, Boulevard Edouard-Montpetit
Pavillon Roger-Gaudry, Room S-520,
Montreal, QC, H3T 1J4, Canada
Phone : 514-343-6109

Acknowledgements: We thank Dr. Jean-Francois Cloutier (Montreal Neurological Institute, McGill University) for providing neogenin null mice. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. A.D.P. is a Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) Chercheur Senior scholar and T.E.K. is a FRSQ Chercheur National scholar.

ABBREVIATIONS

Acetyl-choline transferase (AchT), Cell division cycle 42 (Cdc42), Central nervous system (CNS), Deleted in colorectal cancer (DCC), Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM), Epidermal-growth factor (EGF), Focal adhesion kinase (FAK), Gamma-aminobutyric acid (GABA), Glycosaminoglycans (GAG), Ganglion cell layer (GCL), Glial fibrillary acidic protein (GFAP), Glycosylphosphatidylinositol (GPI), Immunoglobulin (Ig), Inner plexiform layer (INL), KiloDalton (Kda), Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP), Outer nuclear layer (ONL), Outer plexiform layer (OPL), p21-activated kinase 1 (Pak1), Phosphoinositol-3 (PI-3), Phospholipase C γ (PLC γ), Peripheral nervous system (PNS), Photoreceptor layer (PRL), Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), Retinal ganglion cell (RGC), Repulsive guidance molecule (RGM), Rho-guanidine triphosphatase (Rho-GTPases), Retinal pigment epithelium (RPE), Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

ABSTRACT

Netrins are axon guidance molecules that play critical roles during the development of the nervous system. The expression of netrins has also been described in several tissues of the adult but their expression and role in the adult nervous system is poorly defined. In this study, we investigated the expression of netrins and their receptors in the adult mouse retina. We found no expression of netrin-1 transcript or protein in wild-type adult retinal tissue, a result which was corroborated using a netrin-1 reporter mouse which labels netrin-1 expressing cells. We found that netrin-3 however was present in retinal ganglion cells (RGC) and subsets of amacrine cells. Netrin receptors expression was also investigated. Deleted in colorectal cancer (DCC) was found in RGC axons while neogenin was distributed in RGCs dendrites and horizontal cells soma and dendrites. UNC-5 homolog receptors were found to be present in cell body of RGCs and in Müller cells radial processes. Together, these results present a distribution of netrin signaling members in different cell population of the adult rodent retina, suggesting a role for them in the function of the mature visual system.

Keywords: Retina, Retinal Ganglion Cells, Amacrine Cells, Müller glia, Netrins, Deleted in colorectal cancer (DCC), UNC-5 homologs, Neogenin.

INTRODUCTION

Netrins are a family of secreted proteins that play important roles in cell and axon migration during neural development (Moore SW, 2007). In mammals, three secreted netrins (netrins 1, 3 and 4), and two glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins (netrins G1 and G2) have been identified (Nakashiba et al., 2000; Serafini et al., 1996). The response to netrins is mediated by the cellular expression of netrin receptors, including the Deleted in Colorectal Cancer family (DCC and neogenin) (Keino-Masu et al., 1996; Vielmetter et al., 1994), the *C. elegans* UNC-5 homologs family (UNC5A-D) (Leonardo et al., 1997), and the recently described Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM) (Ly et al., 2008).

Netrins have been traditionally viewed as guidance molecules, attracting or repelling the axons of developing neurons including commissural neurons (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1996) and trochlear motor neurons (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1985), respectively. New roles for netrins in cell migration, tissue formation, morphogenesis and angiogenesis are also emerging (Baker et al., 2006). For example, netrin-1 repels the migration of oligodendrocyte precursor cells (Jarjour et al., 2003; Tsai et al., 2003), regulates the maturation of developing oligodendrocytes (Jarjour et al., 2003; Rajasekharan et al., 2009), and promotes DCC-dependent migration and proliferation of vascular endothelial cells (Park et al., 2004). Of interest, netrin expression has been reported in several regions of the adult central nervous system (CNS) (Astic et al., 2002; Madison et al., 2000b; Meyerhardt et al., 1999), suggesting an even wider range of functions for members

of this family. Netrin-1 has been shown to direct the migration of adult neural stem cells to sites of injury in the mature spinal cord (Petit et al., 2007), and is required for the maintenance of axo-oligodendroglial paranodal junctions in mature myelin (Jarjour et al., 2008). Yet, the role of netrins in the adult CNS is poorly understood.

In the developing mouse retina, netrin-1 secreted by epithelial cells at the optic disk guides embryonic retinal ganglion cell (RGC) axons, which express DCC, towards the optic nerve head (Deiner et al., 1997b). Consistent with this, disruption of the netrin-1/DCC signaling in DCC null mice prevented RGC axons from leaving the retina and caused misdirected axon growth at the optic nerve head (Deiner et al., 1997b). Although the role of netrin-1 during retinal development is well established, its potential role in the adult visual system remains unknown. Previous studies on the localization of netrin in the adult retina have provided conflicting results. One group reported that netrin-1, DCC and UNC5B are constitutively expressed by adult retinal neurons (Ellezam et al., 2001), while others have reported that netrin-1 and DCC are downregulated to below detection levels in the adult rat retina and optic nerve (Johansson et al., 2001a; Petrusch et al., 2000b).

To resolve these issues, we investigated the expression of netrins and their receptors in wild-type and reporter transgenic mice using a variety of techniques. Our data show that while netrin-1 mRNA and protein are absent in adult mouse retinas, netrin-3 is abundantly expressed in RGCs and a subset of amacrine cells. We also demonstrate that the netrin receptors neogenin and UNC5B are expressed by RGC bodies and dendrites, while DCC is confined to RGC axons. Collectively, our results suggest a role for netrin-3 in the function of the mature visual system.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Experimental animals

All animal procedures were in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals. Post-natal day 0 (P0), post-natal day 2 (P2), or adult (>5 months) C57BL/6 mice were used in all experiments. Adult heterozygote Netrin-1^{geo/+} CD1 mice carrying a β -geo cassette in the netrin-1 (*Ntn1*) locus were used as reporter mice to visualize netrin-1 expressing cells. These mice express a functional β -galactosidase (β -gal) netrin-1 fusion protein under the control of the *Ntn1* gene promoter (Serafini et al., 1996; Shatzmiller et al., 2008; Skarnes et al., 1995). Wild-type, littermate CD1 mice were used as negative controls. Adult, homozygote neogenin null (*Neo1*^{Gt/Gt}) C57BL/6 mice carrying a β -geo cassette in the neogenin (*Neol*) locus (provided by Dr. J.F. Cloutier, McGill University) (Bae et al., 2009) were used to validate antibody specificity and to visualize neogenin expressing cells. Transgenic C57BL/6J mice carrying the Cyan Fluorescent Protein (CFP) reporter gene under control of the Thy1 gene promoter (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) were used for visualization of RGC neurons and their axons.

Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was purified from P0 and adult retina and cerebellum (used as control). Animals were deeply anesthetized and the eyes were rapidly enucleated. The cornea and the lens were removed and the retina was collected and immediately homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) with an electric pestle

(Kontes, Vineland, NJ) followed by several passages through a 28-gauge needle. Total RNA was extracted and its purity was monitored by A260/A280 ratio. Synthesis of cDNA was performed with 600 ng of RNA using Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen). The cDNA mixture (2 μ l) was subjected to PCR in a 50 μ L reaction containing 200 nM of each primer, 0.2 mM of dNTPs, and 2 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Burlington, ON) in a thermal controller minicycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA). Primers were designed to span an intron in each gene of interest to avoid amplification of contaminating genomic DNA (Table 1). Amplification conditions were: 5 min at 94°C, 28 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at optimal annealing temperature (Table 1), 45 sec at 72°C and final extension of 10 min at 72°C. PCR products (25 μ L) were separated in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Retinal and optic nerve immunohistochemistry

Mice were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde and the eyes were rapidly enucleated. The cornea and the lens were removed, the eyecup was cryoprotected overnight in 30% sucrose and then embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN). Retinal sections (16 μ m) were incubated in 3% BSA and 0.3% Triton X-100 (Sigma) to block non-specific binding. For netrin and DCC immunostaining, an antigen enhancement procedure was used: sections were submerged in 10 mM sodium citrate (pH 6.0) and the buffer was brought to a boil in a microwave oven for 30 sec followed by a 30 sec pause for a total of 10 min, as previously described (Kennedy et al., 2006). Slides were allowed to cool down for 15 min and were then washed

twice for 5 min in PBS at room temperature. Tissue sections, with or without antigen enhancement, were incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by incubation with secondary antibodies at room temperature. Secondary antibodies used were goat anti-rabbit IgG (1,5 µg/ml; Cy3 conjugate; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), donkey anti-goat IgG (15µg/ml; FITC conjugate; Jackson ImmunoResearch Laboratories), donkey anti-rabbit IgG (1,5µg/ml; Rhodamine conjugate; Jackson ImmunoResearch Laboratories), goat anti-mouse IgG (8 µg/ml; alexa red conjugate; Molecular Probes), goat anti-chicken IgY (1µg/ml; Cy3 conjugate; Abcam Inc., Cambridge, MA). Fluorescent staining was examined using a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada, Kirkland, QC) or a Leica TCS-SP1 confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Images were captured with a CCD video camera (Retiga, Qimaging, Burnaby, BC) and analyzed with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON). RGCs were identified by retrograde labeling following application of 2% FluoroGold (Fluorochrome, Englewood, NJ) to the superior colliculus as described previously (Sapieha et al., 2005).

Western blot analysis

Retinas and cerebellum were rapidly dissected and homogenized with an electric pestle (Kontes, Vineland, NJ) in ice-cold lysis buffer (20 mM Tris (pH 8.0), 135 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, and 10% glycerol supplemented with protease inhibitors). Retinal lysates were incubated on ice for 30 min and then centrifuged at 14,000 rpm for 5 min; the supernatants containing solubilised proteins were collected. Retinal extracts (100 µg) were resolved on 7.5% or 10% SDS

polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON). To block nonspecific binding, membranes were incubated in PBS, 0.1% Tween-20 (PBS-T) and 5% dry skim milk for 1 hr at room temperature, followed by incubation with primary antibodies overnight at 4°C (Table 2). Membranes were washed in PBS-T and incubated in peroxidase-linked anti-rabbit or anti-mouse (0.75 µg/mL, GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC) or anti-rat secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Blots were developed with a chemiluminescence reagent (ECL; GE Healthcare) and exposed to autoradiograph film (X-OMAT; Eastman Kodak, Rochester, NY).

X-Gal colorimetric assay

Mice were perfused transcardially with 0.8% glutaraldehyde and the eyes were immediately dissected out. Tissue was incubated overnight at 37°C in staining solution containing 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide and 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside (X-gal, Invitrogen, Burlington, ON). Tissue sections were produced as described above and examined under light microscopy.

RESULTS

Netrin-1 is not express in the adult mouse retina

Netrin-1 is expressed by epithelial cells around the optic disk during embryonic development of the retina (Deiner et al., 1997b), but its expression at post-natal stages is poorly defined. We first investigated the expression of netrin-1 by RT-PCR using template RNA extracted from mouse P0 and adult (>5 months) retinas. Given that netrin-1 is expressed in the mouse cerebellum post-natally

(Alcantara et al., 2000; Wehrle et al., 2005), RNA extracted from this tissue was used as positive control. Using specific intron-spanning primers for *Ntn1*, we did not detect any amplification products using cDNA produced from P0 or adult mouse retinal RNA (Fig. 1A). In contrast, RNA samples from newborn and adult cerebellum showed the predicted *Ntn1* amplification products. Similar results were obtained using other sets of primers that targeted different regions of the *Ntn1* gene (Table 1). Negative control reactions were performed in the absence of RT enzymes and showed absence of amplification products (Fig. 1A). Western blot analysis of retinal (P2, adult) and cerebellum (P2) protein homogenates, carried out with a previously characterized specific netrin-1 antibody (Bouchard et al., 2008), confirmed that the expected 75 kDa band corresponding to full-length netrin-1 was not detected in the post-natal retina (Fig. 1B).

Mice lacking functional netrin-1 or DCC die within hours of birth (Fazeli et al., 1997; Serafini et al., 1996), hence they cannot be used to test the specificity of antibodies in adult tissues. Therefore, to further characterize the expression of netrin-1 in the adult mouse retina, we used a reporter mouse in which the endogenous netrin-1 promoter drives expression of β -gal (Shatzmiller et al., 2008). Sections from adult cerebellum stained with anti- β -gal antibodies (Fig. 1C) or X-Gal solution (Fig. 1D) revealed the characteristic pattern of netrin-positive cells in the molecular layer (Alcantara et al., 2000; Wehrle et al., 2005). In contrast, there was no positive β -gal (Fig. 1F) or X-Gal (Fig. 1G) labeling in adult transgenic retinas. Non-specific, background staining in the ganglion cell layer was observed in both transgenic and wild-type retinas (Fig. 1F, 1H), and a similar staining was also

observed when the primary antibody was omitted (not shown). Collectively, these results strongly suggest that cells in the adult retina do not express netrin-1.

Netrin-3 is expressed by adult retinal neurons

To investigate whether other members of the netrin family might be expressed in the adult retina, we performed RT-PCR using specific intron-spanning primers for netrin 3 (*Ntn3*). Unlike *Ntn1*, *Ntn3* was found to be expressed in both newborn and adult retina (Fig. 2A). We then used a PN3 netrin antibody that recognizes a conserved region in both netrin-3 and netrin-1 (Kennedy et al., 2006) in western blots and detected a ~80 kDa band corresponding to netrin-3 in both adult and P2 retinal samples (Fig. 2B). The PN3 antibody did not detect the ~75 kDa band corresponding to netrin-1 in the retina, consistent with our finding using the netrin-1 antibody (Fig 1A) and confirming the absence of netrin-1 in this tissue. As expected, samples from cerebellum (P2), loaded as a positive control, showed two distinct bands corresponding to netrin-1 (75 kDa) and netrin-3 (80 kDa).

To identify which retinal cells expressed netrin-3, we performed immunostaining with the PN2 antibody that recognizes netrin-3 but not netrin-4 (Kennedy et al., 2006) on adult retinal sections treated for antigen enhancement (Supplementary Fig. 1A, B). The multiple targeting of that antibody in immunostaining can be demonstrated on cerebellar sections from the netrin-1 reporter mouse. Co-labeling with β -Gal antibodies clearly shows PN2 positive cells that are either positive or negative for β -Gal (Supplementary Fig. 1C). In the retina, positive netrin-3 immunostaining was primarily observed in the ganglion cell layer and in the inner nuclear layer (Fig. 2C). Co-labeling with β -III tubulin, a selective

marker of RGCs, demonstrated that most of the netrin-3 positive neurons in the ganglion cell layer were RGC neurons (Fig. 2C ii, arrows). Some PN2-positive cells were not labeled with β -III tubulin suggesting that they might be displaced amacrine cells (Fig. 2C ii, arrowheads and box). We then used several amacrine cell-specific markers in combination with PN2 to assess identity of PN2-positive cells in the INL. Confocal microscopy analysis revealed that many cells in the inner nuclear layer were positive for glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) (Fig. 2D i), glycine Transporter 1 (GlyT1) (Fig. 2D ii), or tyrosine hydroxylase (TH) (Fig. 2D iii), specific markers for GABAergic, glycinergic and dopaminergic amacrine cells, respectively. PN2-positive cells did not co-localize with acetylcholine transferase (AChT), a specific marker for starburst cholinergic amacrine cells (Fig. 2D iv). These results indicate that netrin-3 is expressed by RGCs and subsets of amacrine cells.

DCC family and UNC-5 homologs are expressed by neurons and glial cells in the adult retina

We next investigated the expression of the receptors that are known to bind netrin-3 (Wang et al., 1999). RT-PCR was performed using primers for DCC and neogenin using cDNA synthesized from retina and cerebellum of P0 and adult. We found that DCC and neogenin were expressed in the newborn and adult retina and cerebellum (Fig. 3A and Fig. 4A) Western blot analysis using DCC and neogenin specific antibodies revealed corresponding bands at ~190 kDa and ~180 kDa, respectively (Manitt et al., 2004) (Fig. 3B and Fig. 4B). Immunostaining of DCC on adult retinal sections obtained from a Thy1-CFP mice that express Cyan fluorescent

protein (CFP) in both RGCs and amacrine cells (Raymond et al., 2008) showed that DCC signal co-localized with RGCs axons in the fiber layer (Fig. 3C).

Immunostaining of retinal sections with a neogenin antibody revealed a strong signal in the ganglion cell layer, inner plexiform layer and outer plexiform layer (Fig. 4C), that was lost in retinal sections of neogenin null mice (Fig. 4D). The use of a second neogenin specific antibody (Table 1) revealed the exact same protein distribution in the retina (not shown). β -gal immunoreactivity, a marker for neogenin-expressing cells, was detected in many layers of the retina, primarily in both the ganglion cell layer and inner nuclear layer (Fig. 4E). β -gal staining was found in the cell bodies due to the intracellular distribution of the fusion protein as previously suggested (Leighton et al., 2001; Mitchell et al., 2001). Confocal microscopy analysis of neogenin with MAP2, a dendritic marker, demonstrated co-localization of this netrin receptor with dendrites in the inner plexiform layer (Fig. 4F). Staining with β -III tubulin confirmed that some of these neogenin-positive dendrites belonged to RGCs (Fig. 4G). Neogenin expression was also identified in horizontal cells, visualized with the cell-specific marker calbindin (Fig. 4H). Of interest, the expression of netrin-3 and neogenin in the adult retina followed a complementary distribution (Fig. 4I), suggesting a potential interaction of netrin-3 with its receptors. While neogenin was observed in the dendrites of RGC and horizontal cells, DCC was confined to RGC axons.

We also examined the expression of UNC-5 homolog receptor family. RT-PCR was performed using specific primers for each of the four UNC-5 homologs (UNC5A-D). We found expression of all UNC5 receptors in P0 and adult retina and cerebellum (Fig. 5A). We also examined protein expression using an UNC5C

antibody. Immunoblot analysis of retinal and cerebellar extracts showed ~130 kDa bands corresponding to UNC5C protein (Manitt et al., 2004) (Fig. 5B). Immunostaining of retinal section using the same antibody showed signal in the GCL and IPL that co-localized largely with CRALBP, a Müller cell-specific marker (Fig. 5C). Confocal microscopy revealed that Müller cell radial processes labeled with CRALBP were also positive for UNC5C (Fig. 5D, arrows). Using an antibody against UNC5B, positive immunoreactivity was observed on RGCs, identified with Fluorogold (Fig. 5E, box). These results suggest that UNC5B receptors are expressed only at RGCs soma whereas the UNC5C receptors are expressed by the Müller cells in the mature mouse retina.

DISCUSSION

This study supports three conclusions. First, netrin-1 expression is absent from the adult mouse retina. Second, netrin-3 is abundantly expressed by RGCs and amacrine cells. Third, the netrin receptor families DCC and UNC-5 are present in the adult retina, and are localized to different compartment of neuronal and non-neuronal cells. DCC was found in RGC axons, while UNC5B was detected in RGC soma and neogenin in RGC dendrites. Finally, Müller glial cells express UNC5C.

The existence in the literature of two studies showing opposite data concerning netrin-1 distribution in the mature rodent retina, i.e presence (Ellezam et al., 2001) or absence of expression (Petrausch et al., 2000a), has considerably confused our understanding of the possible role of netrin-1 in this tissue. Our data showed complete absence of expression of netrin-1 using three different techniques. We showed that this protein was no longer expressed in the retina as of P0. These

results thus put to rest the questioning about the possible functions netrin-1 in the adult visual system.

While the embryonic functions of netrin-1 have been examined in depth in many organs of the rodent, including the eye, very little is known about the two other members: netrin-3 and netrin-4. As expression of netrin-4 has been previously detected in the basement membrane of the cornea in infant and adult humans (Kabosova et al., 2007), we addressed for the first time the involvement of netrin-3 in the adult retina. Netrin-3 had been detected during development in parts of the peripheral nervous system (PNS) including sensory and sympathetic ganglia (Seaman and Cooper, 2001; Wang et al., 1999) and was known to be largely excluded from the embryonic and adult CNS (Manitt et al., 2001; Wang et al., 1999). These findings suggested that netrin-3 could be a secreted factor implicated in the pathfinding and fasciculation of neuronal axons within the developing peripheral nerves. It was also shown that netrin-3 expressing cells adjacent to dorsal spinal cord explants could stimulate outgrowth of commissural axons whereas a chemorepellent effect was observed on trochlear motoneurons axons originating from the ventral half of the spinal cord (Wang et al., 1999). Despite these *in vitro* observations, no evidences of similar phenomena have been shown *in vivo*. Here, we report for the first time evidence that netrin-3 is actually expressed in the CNS, in both the cerebellum and retina. We discovered that netrin-3 expression is maintained from P0 to the adult stage in these tissues. With the finding that netrin-1 was not expressed in the adult retina, the use of a pan-netrin antibody directed against netrin-1 and netrin-3 permitted us to identify netrin-3 expressing cells within the retina. We then discovered a retinal distribution of netrin-3 in the RGCs and subsets of

amacrine cells. Previous failures to detect netrin-3 in the retina using the PN2 antibody (Petrausch et al., 2000b) may have been due to the absence of an effective antigen enhancement protocol that has proven to be necessary for adequate netrin detection with this antibody (Kennedy et al., 2006).

DCC and UNC-5 homolog families have been shown to bind netrin-3 with a lower affinity in *in-vitro* experiments (Wang et al., 1999). We therefore investigated the characterisation of these receptors in the adult retina as they were the potential netrin-3 receptors in that tissue. Our data indicates that they are expressed within neuronal and glial cells that form contacts in the IPL and GCL. We found that RGCs express at least three different netrin receptors: DCC, UNC5B and neogenin. Neogenin was also found in many dendrites of both IPL and OPL, likely belonging to amacrine and horizontal cells. We also found that Müller cells, the main glial cells of the retina, express UNC5C.

The observations on the distribution of netrins inside the mature rodent retina provide clues about their possible neuronal roles in the circuitry functioning or in the structural maintenance of cellular interactions. In adult rodents, as RGCs continue to express ephrin receptor EphA ubiquitously (Sajjadi and Pasquale, 1993), the superior colliculus expresses ephrins-A in a gradient fashion (Knöll et al., 2001). This maintenance of expression of guidance molecules in the visual map has been suggested to be important for the potential capability of regenerating RGCs to correctly reinnervate their targets (Rodger et al., 2001). In the same way, expression of netrin-3 in the retina could therefore be maintained in order to permit circuitry reestablishment after a lesion or during periodic restructuring due to the photoperiod. In the drosophila, L2 cells located in the first optic neuropil have been

shown to undergo periodic dendritic plasticity modifications during the day and night (Weber et al., 2009) This leads us to suggest that a such dendritic restructuration under a circadian control could exist in dendrites of some neurons in the mature retina. Dendrites of spinal neurons were shown to be guided in part by Frazzeled (DCC) in the developing drosophila CNS (Furrer et al., 2003a). DCC as also been shown to participate in synaptogenesis in *C. elegans* (Colon-Ramos et al., 2007) and xenopus where it acts through netrin-1 in the later phases of retinotectal development (Manitt et al., 2009). Therefore, expression of neogenin on RGCs and horizontal cells dendrites could participate in local dendritic and/or synaptic plasticity inside the retina of the mature animal through netrin-3.

Conversely, expression of netrin-3 could play a role in inhibiting axonal sprouting in the mature retina. Previous studies have demonstrated negative roles for netrin signalling in the regeneration of the adult CNS (Manitt et al., 2006; Park et al., 2007) and attributed to them a possible function of inhibiting axonal regrowth (Low et al., 2008). While UNC-5 homologs are the prominent netrin receptors expressed in the adult rodent spinal cord (Manitt et al., 2004), sectioned axons are unable to grow in a netrin-1 environment (Low et al., 2008; Park et al., 2007). With our data suggesting that UNC-5 homologs are all strongly expressed in the mature retina, similar axonal growth inhibition could therefore be promoted in different neurons that find themselves in a netrin-3 environment.

Alternatively, netrin-3 could help create compartmentalized connectivity with RGCs. Consistent with previous *in situ* hybridisation made in the adult retina showing mRNA expression in RGCs of DCC, UNC5B (Petrausch et al., 2000, Ellezam et al., 2001) and neogenin (Schnichels et al., 2007), RGCs were found to

express the protein products of these receptor in three different cellular compartments. While DCC was exclusively located in their axons, UNC5B was expressed on the membranes of the cell body and neogenin was restricted to their dendrites. This asymmetry in netrin receptor distribution within the same neuron could be of importance for different functions such as a specific structural interaction with specific cell populations within the retina and optic nerve through different netrin receptors. As secreted netrins are known to be mostly bound to cellular membranes or matrices in the embryonic CNS (Manitt et al., 2001; Serafini et al., 1994), they can participate in cell adhesion via their trans-membrane receptors (Shekarabi et al., 2005). Such interactions between netrin-3 and its receptors may permit cell-cell or cell-matrix adhesion inside the adult retina in a way similar to the maintenance of paranodal junctions between axons and myelinating oligodendrocytes (Jarjour et al., 2008). The use of three different netrin receptors within the same cell could therefore permit cell-specific structural maintenance.

Also, netrin-3 could also play a role in glia proliferation. UNC-5 homologs were previously detected in adult Schwann cells (Lee et al., 2007) and it was shown that their proliferation was controlled by netrin-1 through UNC5B following an injury (Lee et al., 2007). As we found that Müller cells were expressing UNC-5 homologs, similar mechanisms could therefore be active in intact adult retina in order to control Müller cell proliferation.

It is of interest to mention that neogenin is also an identified receptor for the repulsive guidance molecules (RGM) (Rajagopalan et al., 2004) and that its expression has been previously detected in the embryonic (Gad et al., 2000) and adult (Schnichels et al., 2007) retina by *in situ* hybridization. Also, RGM were been

shown to be able to promote collapse of xenopus temporal RGC growth cone *in vitro* (Monnier et al., 2002). The finding that neogenin is expressed on the dendrites of many cell types including RGCs and horizontal cells suggests that it might be, besides netrin-3, interacting with RGM in the IPL and OPL. As RGM have been found in the adult CNS (Schmidtmer and Engelkamp, 2004) their expression remains to be investigated in the mature retina.

Many fundamental questions rise from these new findings. They suggest the presence of a functional network of cells interacting via netrin-3 and their receptors. Functional experiments would be needed to evaluate the actual importance of netrin-3 signalling in the mouse visual system. It would be interesting to investigate modification in synaptic transmission or retinal structure in absence of netrin-3 protein. As we showed that netrin-3 was strongly expressed in the post-natal retina, its functions during the development of the retina remains to be elucidated. Studies addressing the functional role of netrin-3 in the developing nervous system will help to shed further light on the role of netrin-3 in the adult.

REFERENCES

- Alcantara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C (Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127:1359-1372.2000).
- Astic L, Pellier-Monnin V, Saucier D, Charrier C, Mehlen P (Expression of netrin-1 and netrin-1 receptor, DCC, in the rat olfactory nerve pathway during development and axonal regeneration. *Neuroscience* 109:643-656.2002).
- Bae G-U, Yang Y-J, Jiang G, Hong M, Lee H-J, Tessier-Lavigne M, Kang J-S, Krauss RS (Neogenin Regulates Skeletal Myofiber Size and FAK and ERK Activities In Vivo and In Vitro. *Mol Biol Cell* E09-06-0491.2009).
- Baker KA, Moore SW, Jarjour AA, Kennedy TE (When a diffusible axon guidance cue stops diffusing: roles for netrins in adhesion and morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:529-534.2006).
- Bouchard J-F, Horn KE, Stroh T, Kennedy TE (Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1. *Journal of Neurochemistry* 107:398-417.2008).
- Colamarino S, Tessier-Lavigne M (The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81:621-629.1985).
- Colon-Ramos DA, Margeta MA, Shen K (Glia Promote Local Synaptogenesis Through UNC-6 (Netrin) Signaling in *C. elegans*. *Science* 318:103-106.2007).
- Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW (Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19:575-589.1997).
- Ellezam B, Selles-Navarro I, Manitt C, Kennedy TE, McKerracher L (Expression of Netrin-1 and Its Receptors DCC and UNC-5H2 after Axotomy and during Regeneration of Adult Rat Retinal Ganglion Cells. *Experimental Neurology* 168:105-115.2001).
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA (Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dec) gene. *Nature* 386:796 - 804.1997).
- Furrer M-P, Kim S, Wolf B, Chiba A (Robo and Frazzled/DCC mediate dendritic guidance at the CNS midline. *Nat Neurosci* 6:223-230.2003).
- Gad JM, Keeling SL, Shu T, Richards LJ, Cooper HM (The Spatial and Temporal Expression Patterns of Netrin Receptors, DCC and Neogenin, in the Developing Mouse Retina. *Experimental Eye Research* 70:711-722.2000).
- Jarjour AA, Bull S-J, Almasieh M, Rajasekharan S, Baker KA, Mui J, Antel JP, Di Polo A, Kennedy TE (Maintenance of Axo-Oligodendroglial Paranodal Junctions Requires DCC and Netrin-1. *J Neurosci* 28:11003-11014.2008).
- Jarjour AA, Manitt C, Moore SW, Thompson KM, Yuh S-J, Kennedy TE (Netrin-1 Is a Chemorepellent for Oligodendrocyte Precursor Cells in the Embryonic Spinal Cord. *J Neurosci* 23:3735-3744.2003).
- Johansson K, Törnngren M, Wasselius J, Månsson L, Ehinger B (Developmental expression of DCC in the rat retina. *Dev Brain Res* 130:133-138.2001).

- Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, Jones JCR, Kenney MC, Koch M, Ninomiya Y, Patton BL, Paulsson M, Sado Y, Sage EH, Sasaki T, Sorokin LM, Steiner-Champliand M-F, Sun T-T, SundarRaj N, Timpl R, Virtanen I, Ljubimov AV (Compositional Differences between Infant and Adult Human Corneal Basement Membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:4989-4999.2007).
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SSY, Culotti JG, Tessier-Lavigne M (Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor. *Cell* 87:175-185.1996).
- Kennedy T, Wang H, Marshall W, Tessier-Lavigne M (Axon Guidance by Diffusible Chemoattractants: A Gradient of Netrin Protein in the Developing Spinal Cord. *J Neurosci* 26:8866-8874.2006).
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre J, Tessier-Lavigne M (Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78:425-435.1994).
- Knöll B, Isenmann S, Kilic E, Walkenhorst J, Engel S, Wehinger J, Bähr M, Drescher U (Graded expression patterns of ephrin-As in the superior colliculus after lesion of the adult mouse optic nerve. *Mechanisms of Development* 106:119-127.2001).
- Lee HK, Seo IA, Seo E, Seo S-Y, Lee HJ, Park HT (Netrin-1 induces proliferation of Schwann cells through UNC5b receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362:1057-1062.2007).
- Leighton PA, Mitchell KJ, Goodrich LV, Lu X, Pinson K, Scherz P, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature* 410:174-179.2001).
- Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M (Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386:833 - 838.1997).
- Low K, Culbertson M, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Tuszynski MH (Netrin-1 Is a Novel Myelin-Associated Inhibitor to Axon Growth. *J Neurosci* 28:1099-1108.2008).
- Ly A, Nikolaev A, Suresh G, Zheng Y, Tessier-Lavigne M, Stein E (DSCAM Is a Netrin Receptor that Collaborates with DCC in Mediating Turning Responses to Netrin-1. *Cell* 133:1241-1254.2008).
- Madison RD, Zomorodi A, Robinson GA (Netrin-1 and Peripheral Nerve Regeneration in the Adult Rat. *Exp Neurol* 161:563-570.2000).
- Manitt C, Colicos MA, Thompson KM, Rousselle E, Peterson AC, Kennedy TE (Widespread Expression of Netrin-1 by Neurons and Oligodendrocytes in the Adult Mammalian Spinal Cord. *J Neurosci* 21:3911-3922.2001).
- Manitt C, Nikolakopoulou AM, Almario DR, Nguyen SA, Cohen-Cory S (Netrin Participates in the Development of Retinotectal Synaptic Connectivity by Modulating Axon Arborization and Synapse Formation in the Developing Brain. *J Neurosci* 29:11065-11077.2009).
- Manitt C, Thompson KM, Kennedy TE (Developmental shift in expression of netrin receptors in the rat spinal cord: Predominance of UNC-5 homologues in adulthood. *Journal of Neuroscience Research* 77:690-700.2004).

- Manitt C, Wang D, Kennedy TE, Howland DR (Positioned to inhibit: Netrin-1 and netrin receptor expression after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research* 84:1808-1820.2006).
- Meyerhardt JA, Caca K, Eckstrand BC, Hu G, Lengauer C, Banavali S, Look AT, Fearon ER (Netrin-1: Interaction with Deleted in Colorectal Cancer (DCC) and Alterations in Brain Tumors and Neuroblastomas. *Cell Growth Differ* 10:35-42.1999).
- Mitchell KJ, Pinson KI, Kelly OG, Brennan J, Zupicich J, Scherz P, Leighton PA, Goodrich LV, Lu X, Avery BJ, Tate P, Dill K, Pangilinan E, Wakenight P, Tessier-Lavigne M, Skarnes WC (Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat Genet* 28:241-249.2001).
- Monnier PP, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, Mann M, Flad M, Hornberger MR, Stahl B, Bonhoeffer F, Mueller BK (RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature* 419:392-395.2002).
- Moore SW T-LM, Kennedy TE. (Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 621:17-31.2007).
- Nakashiba T, Ikeda T, Nishimura S, Tashiro K, Honjo T, Culotti JG, Itohara S (Netrin-G1: a Novel Glycosyl Phosphatidylinositol-Linked Mammalian Netrin That Is Functionally Divergent from Classical Netrins. *J Neurosci* 20:6540-6550.2000).
- Park J-I, Seo I-A, Lee H-K, Park H-T, Shin S-W, Park Y-M, Ahn K-J (Netrin Inhibits Regenerative Axon Growth of Adult Dorsal Root Ganglion Neurons in Vitro. *J Korean Med Sci* 22:641-645.2007).
- Park KW, Crouse D, Lee M, Karnik SK, Sorensen LK, Murphy KJ, Kuo CJ, Li DY (The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:16210-16215.2004).
- Petit A, Sellers DL, Liebl DJ, Tessier-Lavigne M, Kennedy TE, Horner PJ (Adult spinal cord progenitor cells are repelled by netrin-1 in the embryonic and injured adult spinal cord. *PNAS* 104:17837-17842.2007).
- Petrausch B, Jung M, Leppert CA, Stuermer CAO (Lesion-Induced Regulation of Netrin Receptors and Modification of Netrin-1 Expression in the Retina of Fish and Grafted Rats. *Molecular and Cellular Neuroscience* 16:350-364.2000).
- Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller B, Strittmatter S (Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nature Cell Biology* 6:756 - 762.2004).
- Rajasekharan S, Baker KA, Horn KE, Jarjour AA, Antel JP, Kennedy TE (Netrin 1 and Dcc regulate oligodendrocyte process branching and membrane extension via Fyn and RhoA. *Development* 136:415-426.2009).
- Raymond ID, Vila A, Huynh U-CN, Brecha NC (Cyan fluorescent protein expression in ganglion and amacrine cells in a thyl-CFP transgenic mouse retina. *Molecular Vision* 14:1559-1574.2008).
- Rodger J, Lindsey KA, Leaver SG, King CE, Dunlop SA, Beazley LD (Expression of ephrin-A2 in the superior colliculus and EphA5 in the retina following

- optic nerve section in adult rat. *European Journal of Neuroscience* 14:1929-1936.2001).
- Sajjadi F, Pasquale E (Five novel avian Eph-related tyrosine kinases are differentially expressed. *Oncogene* 8:1807-1813.1993).
- Sapieha PS, Duplan L, Uetani N, Joly S, Tremblay ML, Kennedy TE, Di Polo A (Receptor protein tyrosine phosphatase sigma inhibits axon regrowth in the adult injured CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience* 28:625-635.2005).
- Schmidtmer J, Engelkamp D (Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm. *Gene Expression Patterns* 4:105-110.2004).
- Schnichels S, Conrad S, Warstat K, Henke-Fahle S, Skutella T, Schraermeyer U, Julien S (Gene expression of the repulsive guidance molecules/neogenin in the developing and mature mouse visual system: C57BL/6J vs. the glaucoma model DBA/2J. *Gene Expression Patterns* 8:1-11.2007).
- Seaman C, Cooper HM (Netrin-3 protein is localized to the axons of motor, sensory, and sympathetic neurons. *Mechanisms of Development* 101:245-248.2001).
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001-1014.1996).
- Serafini T, Kennedy TE, Gaiko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424.1994).
- Shatzmiller RA, Goldman JS, Simard-Émond L, Rymar V, Manitt C, Sadikot AF, Kennedy TE (Graded expression of netrin-1 by specific neuronal subtypes in the adult mammalian striatum. *Neuroscience* 157:621-636.2008).
- Shekarabi M, Moore S, Tritsch N, Morris S, Bouchard J, Kennedy T (Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci* 25:3132-3141.2005).
- Skarnes WC, Moss JE, Hurlley SM, Beddington RS (Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development. *PNAS* 92:6592-6596.1995).
- Tsai H-H, Tessier-Lavigne M, Miller RH (Netrin 1 mediates spinal cord oligodendrocyte precursor dispersal. *Development* 130:2095-2105.2003).
- Vielmetter J, Kayyem JF, Roman JM, Dreyer WJ (Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *J Cell Biol* 127:2009-2020.1994).
- Wang H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Tessier-Lavigne M (Netrin-3, a Mouse Homolog of Human NTN2L, Is Highly Expressed in Sensory Ganglia and Shows Differential Binding to Netrin Receptors. *J Neurosci* 19:4938-4947.1999).
- Weber P, Kula-Eversole E, Pyza E (Circadian control of dendrite morphology in the visual system of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 4:e4290.2009).
- Wehrle R, Camand E, Chedotal A, Sotelo C, Dusart I (Expression of *netrin-1*, *slit-1* and *slit-3* but not of *slit-2* after cerebellar and spinal cord lesions. *European Journal of Neuroscience* 22:2134-2144.2005).

Figure legends

Figure 1. Netrin-1 is not expressed by adult mouse retina. (A) Netrin-1 RT-PCR detection on cerebellar and retinal cDNA from P0 and adult mice. (B) Western blot shows absence of netrin-1 protein with specific netrin-1 antibody. (C-H) Netrin-1 reporter mouse fails to show netrin-1 expression in the adult retina. Both β -galactosidase immunostaining (β Gal, red) and XGal colorimetric assay (blue) on cerebellum (C,D) and retina (F,G) from an heterozygous *Net1:: β Gal* reporter mouse shows absence of signal in retina. Control non-transgenic mouse lacks β Gal reactivity in both cerebellum (E) and retina (H). Scale bars = 100 μ m

Figure 2. Netrin-3 is expressed by RGCs and subsets of amacrine cells in the mature retina. (A) Netrin-3 RT-PCR detection on cerebellar and retinal cDNA from P0 and adult mice. (B) Western blot using the pan-netrin antibody PN3 shows bands corresponding to netrin-1 (~75 kDa) and netrin-3 (~80 kDa). (C) Double immunolabeling with PN2 (red) and β -III tubulin (green) of antigen-enhanced retinal section. (C, ii) Higher magnification view of the region in the box in (C, i) shows both β -III tubulin positive (arrows) and negative (arrowheads) PN2 cells. DAPI staining shows nuclei of all cells. (D) Confocal microscopy of double immunolabeling with PN2 and amacrine cells markers GAD67 (i), Glycine transporter 1 (ii), Tyrosine hydroxylase (iii) and Acetyl-cholin transferase (iv). Scale bars = 100 μ m (C, i), 25 μ m (C, ii) and 20 μ m (D, i-iv)

Figure 3. Expression of DCC in the adult mouse retina. (A) DCC RT-PCR detection of cerebellar and retinal cDNA from P0 and adult mice. (B) Western blot using DCC antibody shows band corresponding to DCC (~180 kDa) protein. (C) DCC immunolabeling on retinal section adult *Thy1::CFP* transgenic mouse shows colocalisation in fiber layer (FL) that contains RGC axons. Scale bar = 100 μ m

Figure 4. Expression of neogenin in the adult mouse retina. (A) Neogenin RT-PCR detection on cerebellar and retinal cDNA from P0 and adult mice. (B) Western blot using neogenin antibody shows band corresponding to neogenin (~190 kDa) protein. (C) Immunolabeling of neogenin (red) on wild type mouse retina shows signal in GCL, IPL and OPL. (D) Neogenin homozygous for a β -galactosidase gene-trap (Gt) insertion lacks neogenin signal using same antibody. (E) Immunolabeling of β -galactosidase (β Gal, red) on same transgenic retinal section shows expression of the fusion protein in GCL and INL. Confocal microscopy analysis of double immunolabelings of neogenin (red) with MAP2 (F, green), β III-tubulin (G, green) or Calbindin (H, green) antibodies show localisation of neogenin on the dendrites of RGCs and horizontal cells. (I) Double-labeling of neogenin (red) with PN2 antibody reveals expression pattern of the receptor and its potent ligand netrin-3. Scale bars = 100 μ m (C,D,E,I) and 20 μ m (F,G,H).

Figure 5. Expression of UNC5 receptors in the adult mouse retina. (A) RT-PCR detection of the four UNC-5 homologs on cerebellar and retinal cDNA from P0 and adult mice. (B) Western blot using an UNC5C antibody shows bands corresponding

to UNC5C protein (~130 kDa). (C) Double immunolabeling of UNC5C (red) and Müller cells marker CRALBP (green) shows signal in IPL and in GCL that largely colocalise with Müller cells. (E) Confocal microscopy of same sections shows that all Müller cells radial processes express UNC5C protein (arrows). (D) Immunolabeling of retinal sections of animals backlabeled with flurogold (FG, green) with UNC5B specific antibody (red) shows signal on RGC membrane (box). Scale bars = 100 μm (C,E) and 20 μm (D).

Supplementary Figure 1. (A, B) Pan-netrin PN2 antibody is effective only with antigen enhancement, consisting of boiling sections in sodium citrate buffer. Very faint signal is obtained without application of the enhancement (B) whereas strong signal is observed in GCL, IPL and INL when protocol is applied correctly. Dotted line indicates the inner limiting membrane above the RGC axons layer. (D) Double immunolabeling of PN2 (green) with β -galactosidase (β Gal, red) on heterozygous Net1:: β Gal cerebellar section confirms multiple targets of the pan-netrin antibody. PN2 signal can be seen in β Gal positive neurons (arrows) of the molecular layer (ML) and in other PN2 negative cells (arrowheads). Higher magnification is represented in the box. Bar, (A-C) 100 μm

Tables

Table I. List of primary antibodies used for immunofluorescence and Western Blot experiments.

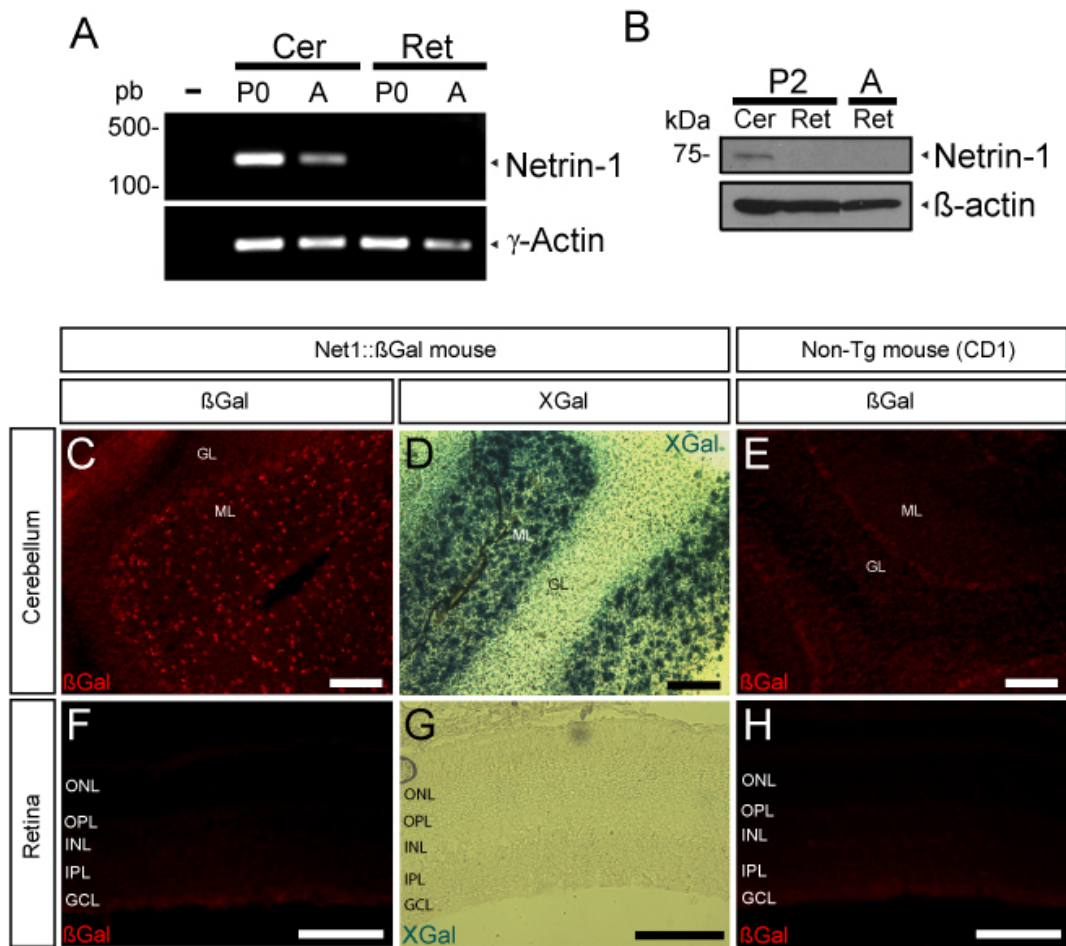
Table II. List of primers used for RT-PCR experiments.

Target	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing T°C	Product size
DCC	5' CTC TTC ACA GGA TTG GAG AAA GGC 3'	5' GAG GAG GTG TCC AAC TCA TGA TG 3'	58°C	202 pb
Gamma-actin	5' GCT TAC ACT GCG CTT CTT 3'	5' TGA GTC TTT CTG GCC CAT G 3'	50°C	213 pb
Neogenin	5' CCC TGG TCT CTA CTC GCT TC 3'	5' CCT GGC TGG CTG GTA TTC TC 3'	59°C	139 pb
Netrin-1 (a)	5' AAG CCT ATC ACC CAC CGG AAG 3'	5' GCG CCA CAG GAA TCT TGA TGC 3'	59°C	196 pb
Netrin-1 (b)	5' GGC AAG CTG AAG ATG AAC 3'	5' CTT GAG GGG CTT GAT TTT GG 3'	50°C	219 pb
Netrin-3	5' AGA CAG CGA CGT CTC TGC C 3'	5' CGG ATA GAG TGT AGG GCT CCT 3'	58°C	294 pb
UNC5A	5' ATC CCT AAC ACA GGA ATC AGC 3'	5' CTA ACG ATA GGA CTC AGC AGG 3'	58°C	146 pb
UNC5B	5' TGG ATC TTT CAG CTC AAG ACC CAG 3'	5' AAG ATG GCC AGC TGG AGC CG 3'	58°C	203 pb
UNC5C	5' GAT GAA ACC TCT GGT CTA ATT GTG 3'	5' CCT TCC GAC TCT TCG TAG TG 3'	58°C	139 pb
UNC5D	5' GTG AAC ATC TTC GTA TCC GT 3'	5' TTC TCA ATG CCT CTC CTA CTC 3'	58°C	172 pb

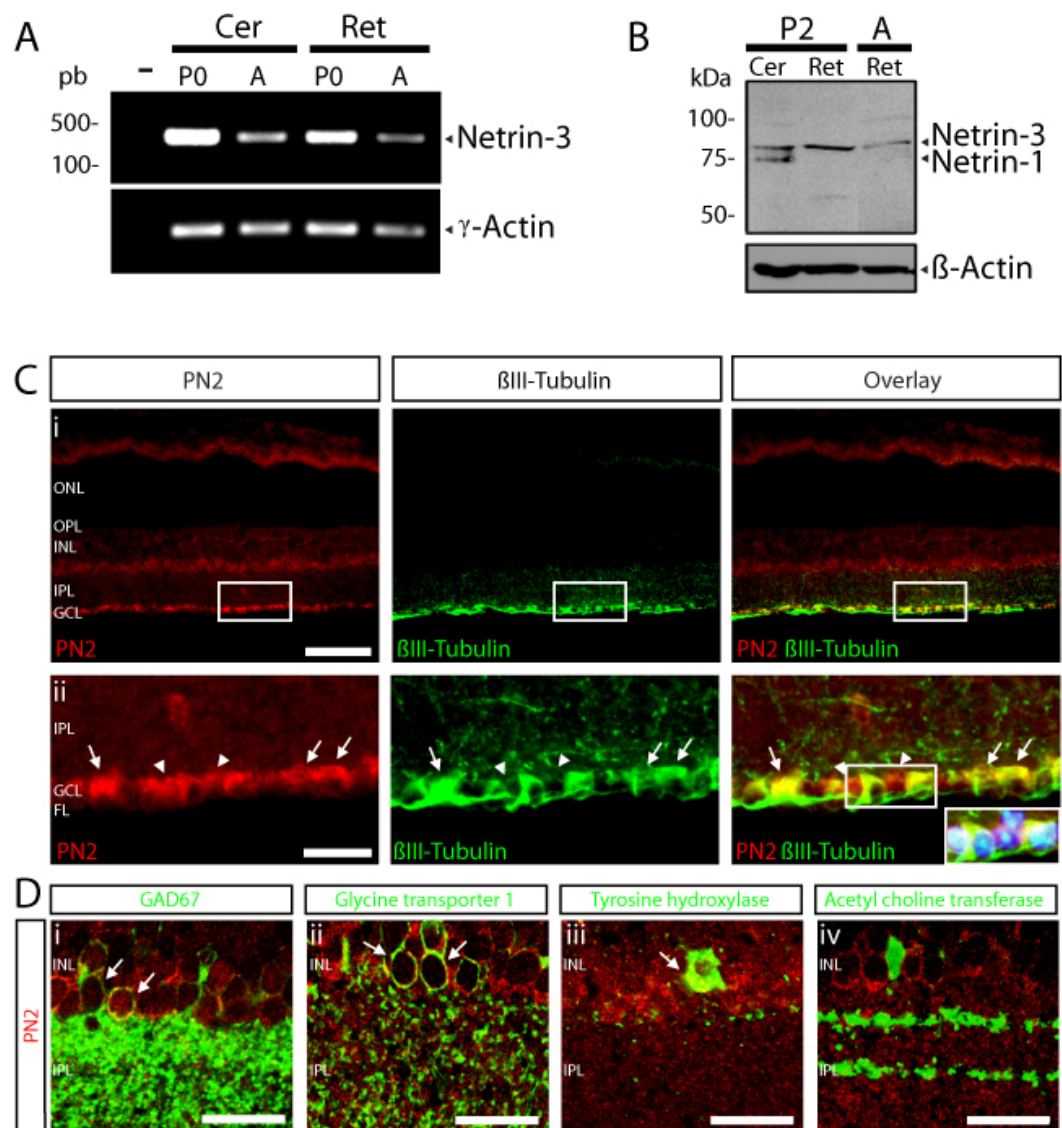
Simard et al. Table I

Antibody	Source	Catalog	Host	Dilution
AChT	Chemicon, Temecula, CA	AB144P	Goat	10 µg/mL (IHC)
β-galactosidase	Abcam Inc., Cambridge, MA	AB9361	Chicken	1 µg/mL (IHC)
β-III tubulin	Sigma, St. Louis, MO	T-8660	Mouse	1/400 (IHC)
DCC	BD Pharmingen, Mississauga, Ontario, Canada	554223	Mouse	1 µg/mL (IHC) 0,5 µg/mL (WB)
GAD67	Millipore, Billerica, MA	AB5992	Mouse	1 µg/mL (IHC)
GFAP	Chemicon	AB5804	Rabbit	1/1000 (IHC)
GlyT1	Chemicon	AB1770	Goat	1/5000 (IHC)
Neogenin	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	sc-15337	Rabbit	0,8 µg/mL (IHC) 0,4 µg/mL (WB)
Neogenin	R&D Systems, Minneapolis, MN	AF1079	Goat	4 µg/mL (IHC)
Netrin-1	R&D Systems	MAB1109	Rat	0,5 µg/mL (WB)
Neurofilament H	Chemicon	AB1989	Rabbit	1/1000 (IHC)
PN2	Antibody 11760, Kennedy et al., 2006		Rabbit	1/500 (IHC)
PN3	Antibody 11760, Kennedy et al., 2006		Rabbit	1/30 000 (WB)
TH	Sigma	T-1299	Mouse	1/2000 (IHC)
UNC5B	R&D Systems	AF1006	Goat	10 µg/mL (IHC)
UNC5C	Tony Pawson, Tong et al., 2001		Rabbit	1/250 (IHC) 1/10 000 (WB)

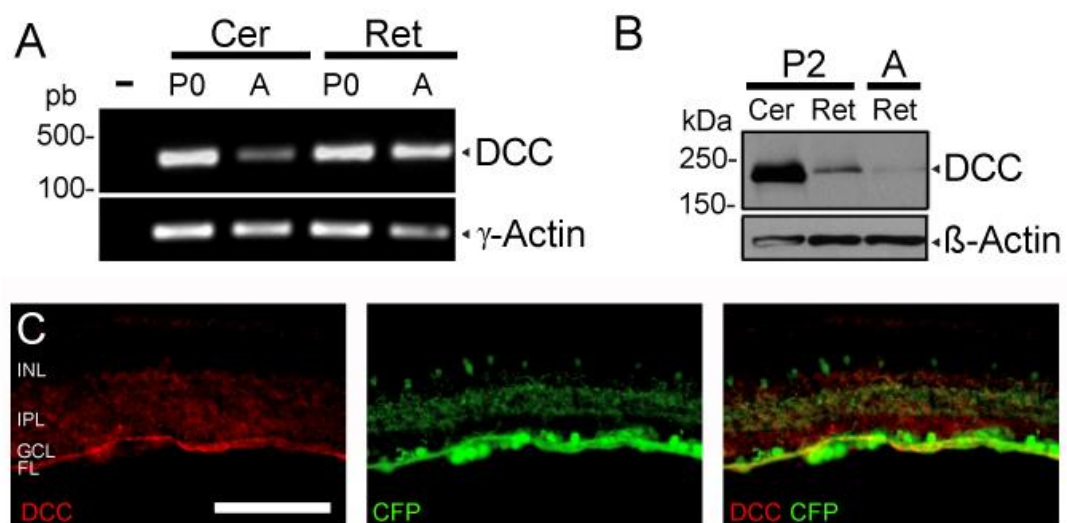
Simard et al. Table II



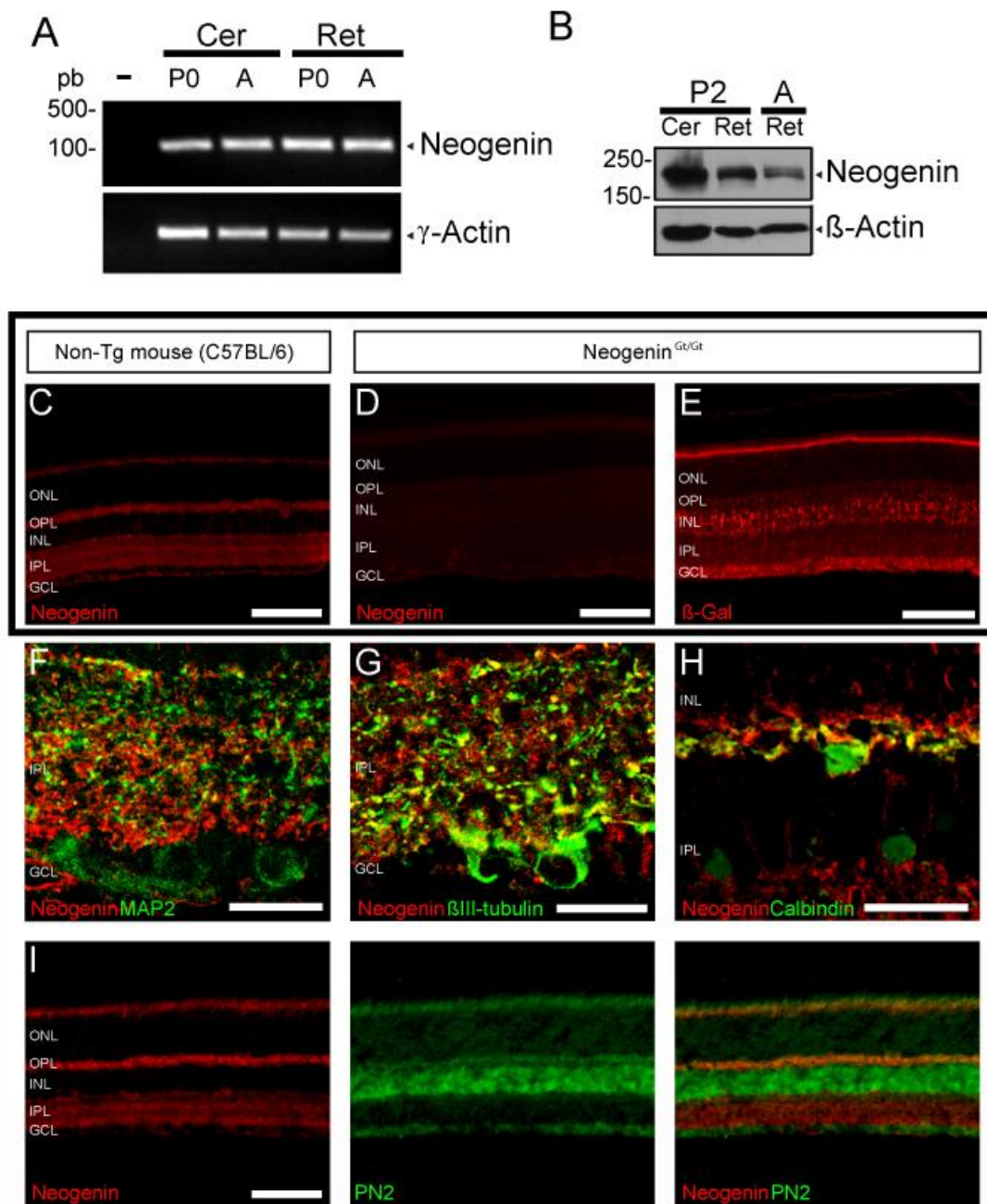
Simard et al. Figure 1



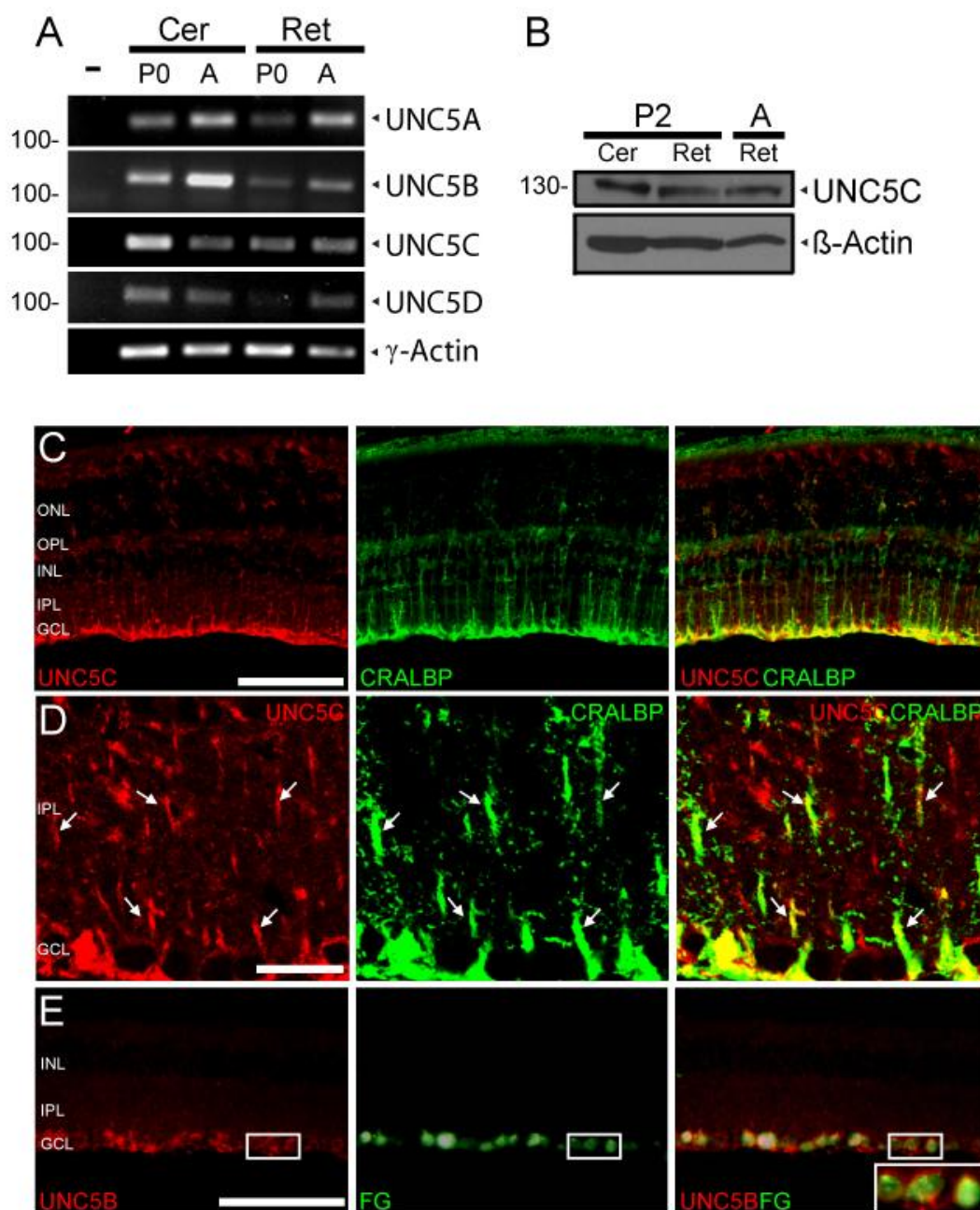
Simard et al. Figure 2



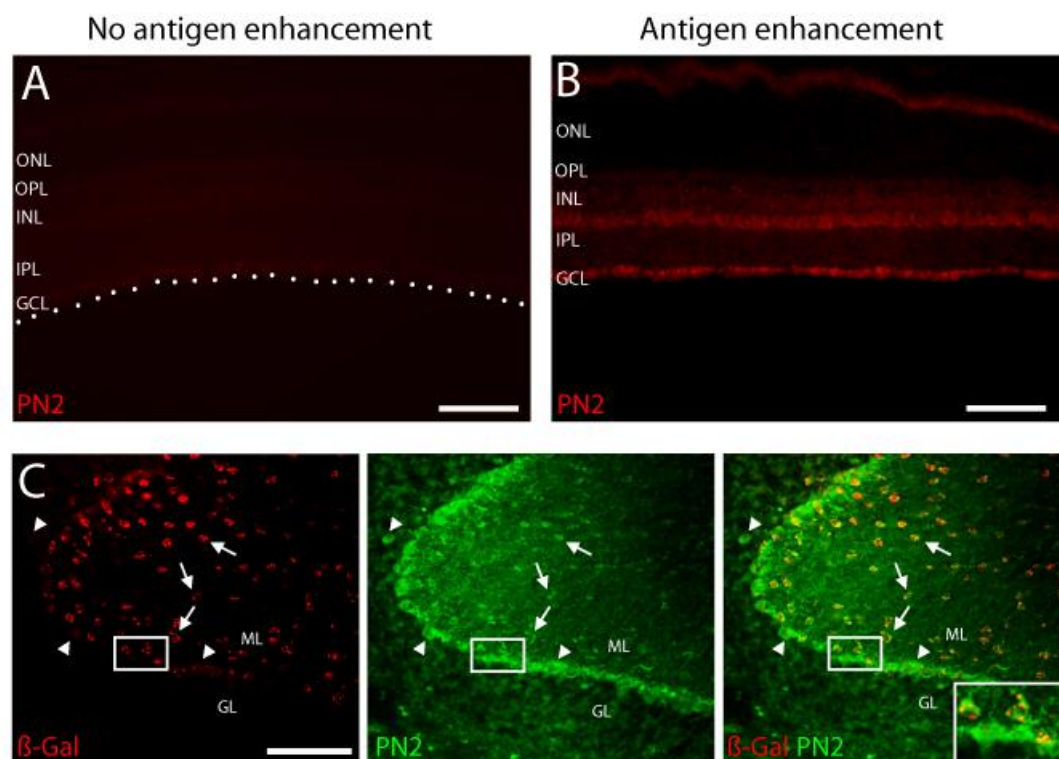
Simard et al. Figure 3



Simard et al. Figure 4



Simard et al. Figure 5



Simard et al. Figure supplémentaire 1

CHAPITRE 3

III) DISCUSSION GÉNÉRALE

III.1) RÉSULTATS OBTENUS

Dans cette étude, nous avons dressé le portrait de l'expression des nétrines et de leurs récepteurs dans la rétine de souris adulte. Alors que deux études antérieures ayant analysé l'expression de la nétrine-1 étaient arrivées à des résultats diamétralement opposés (Ellezam et al., 2001; Petrusch et al., 2000b), notre étude vient enfin clarifier la question de l'expression de la nétrine-1 en y mettant un terme définitif. Nous n'avons en effet observé aucune expression de la nétrine-1 chez la rétine adulte et ce, en utilisant trois techniques différentes. Alors que les souris transgéniques rapporteuses pour la nétrine-1 présentaient une forte expression de la protéine de fusion nétrine-1:: β Gal au niveau du cervelet, aucune détection du transgène ne fut observée à l'intérieur des rétines des mêmes animaux. De même, les expériences de RT-PCR et d'immunobuvardage de type Western démontrèrent la l'expression de la nétrine-1 dans les cervelets adultes mais pas dans les rétines adultes ni même néo-natales. Ces observations de la disparition de la nétrine-1 dans la rétine à partir d'au moins P0 viennent alors suggérer une reconsidération des résultats publiés précédemment (Ellezam et al., 2001; Petrusch et al., 2000b).

Curieusement, nous avons trouvé pour la première fois, l'expression de la nétrine-3 dans la rétine de souris adulte. Alors que la quantité de données disponibles est très limitée quant à ce membre de la famille des nétrines, les études précédentes ont observé que l'expression de la nétrine-3 se retrouvait restreinte au système nerveux périphérique. Notre étude vient donc démentir cette hypothèse en démontrant de façon très convaincante que la nétrine-3 est effectivement présente

dans le système nerveux central adulte, dans la rétine et le cervelet plus précisément. Dans la rétine, nous avons observé que la nétrine-3 était exprimée au niveau des CGR et de plusieurs sous-types de cellules amacrines principalement. Bien que son expression chez l'adulte semblait être plus faible que chez la souris P0, son maintien ainsi que la grande distribution des cellules exprimant ce ligand suggèrent alors que la nétrine-3 doit posséder un rôle important au niveau du système visuel adulte.

L'expression des récepteurs des nétrines a aussi été évaluée dans cette étude. Alors que la protéine DCC nous est apparue comme confinée au niveau de quelques axones appartenant à un certain sous-type de CGR, le récepteur néogénine a été retrouvé dans les dendrites des CGR, des cellules horizontales et des cellules amacrines. Quant aux protéines de la famille des récepteurs homologues à UNC-5, les transcrits des quatre différents isoformes ont été retrouvés mais nous n'avons seulement pu détecter UNC5B au niveau du corps cellulaire des CGR et UNC5C dans les prolongements radiaux des cellules de Müller. Ces résultats concordent sur plusieurs points avec les données publiées dans la littérature précédemment au niveau de l'expression des récepteurs des nétrines. Effectivement, suite à la découverte que le système nétrine-1/DCC permettait aux axones des CGR de quitter la rétine, de nombreuses études se sont attardées à vérifier l'expression des récepteurs des nétrines pendant le développement et chez l'adulte. Chez le rat adulte, des hybridations *in situ* ont ainsi détecté les récepteurs DCC, UNC5A et UNC5B au niveau des CGR (Ellezam et al., 2001; Petrusch et al., 2000b). Tant qu'à la néogénine, ses transcrits ont été observés chez la souris adulte au niveau des couches ganglionnaires et couches nucléaires internes et externes (Schnichels et al., 2007).

La localisation protéique de ces récepteurs observée dans notre étude concorde donc avec la localisation de leurs transcrits trouvés précédemment. En effet, nous avons

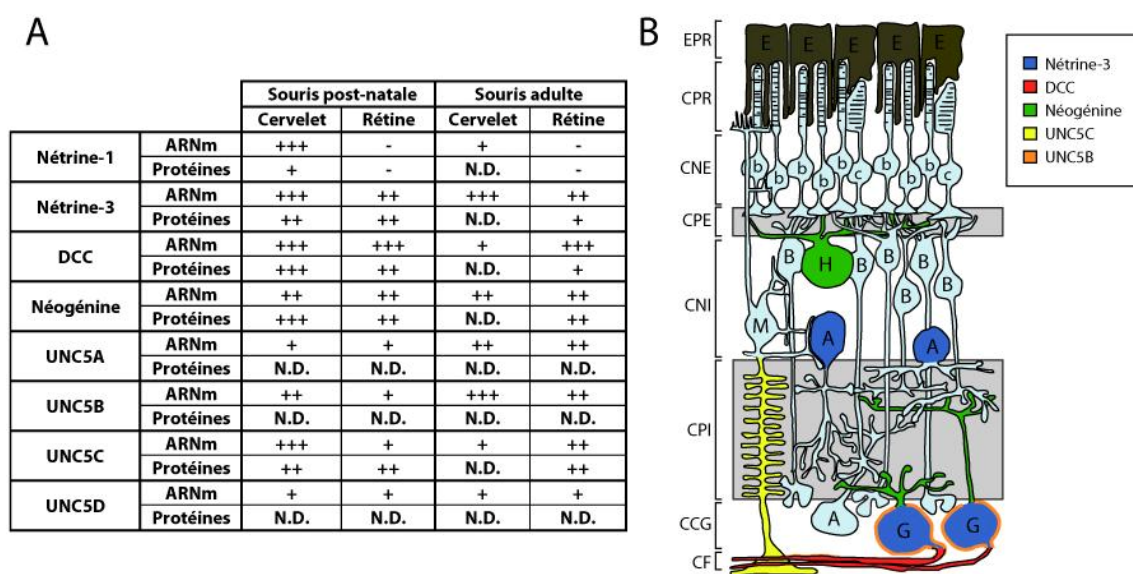


Figure 1. Résumé des résultats de l'expression des nétrines et de leurs récepteurs dans la rétine de souris adulte. A) Tableau récapitulatif des expériences semi-quantitatives de RT-PCR et d'immunobuvardage de type Western montrant une forte (+++), moyenne (++) , faible (+) ou absence (-) d'expression des différentes molécules analysées. B) Schéma de la rétine montrant la distribution des différentes protéines détectées. La nétrine-3 a été identifiée à l'intérieur des cellules ganglionnaires (G) et amacrines (A). DCC a été observé au niveau des axones des cellules ganglionnaires (G), la néogénine au niveau des dendrites des cellules ganglionnaires (G) et horizontales (H). UNC5B a été localisé sur les membranes cellulaires des cellules ganglionnaires (G) et UNC5C dans les pieds terminaux et prolongements radiaux des cellules de Müller (M).

trouvé les protéines DCC au niveau des axones des CGR, UNC5B au niveau du corps cellulaire et néogénine au niveau de leurs dendrites.

Par ailleurs, les analyses de RT-PCR et d'immunobuvardage fait sur les récepteurs DCC et homologues à UNC-5 semblaient démontrer un patron de variation développementale semblable à celui précédemment rapporté dans la

littérature. Il a été démontré que lors du développement de la moelle épinière du rat, on observe simultanément une forte diminution de l'expression des récepteurs DCC et néogénine et une forte augmentation des récepteurs homologues à UNC-5 (Manitt et al., 2004). Ces derniers semblent ainsi être les récepteurs de nétrines dominant chez l'adulte. De même, nos résultats suggèrent une baisse d'expression de DCC dans la rétine de souris entre P0 et adulte alors que les récepteurs UNC5A, UNC5B, UNC5D, mais pas UNC5C, semblent augmenter légèrement. Bien entendu, cette hypothèse demanderait d'être plus rigoureusement vérifiée par des méthodes de PCR en temps réel.

III.2) CONTROVERSE

Plusieurs hypothèses peuvent tenter d'expliquer les contradictions présentées dans les deux études traitant de l'implication des nétrines dans la régulation de la régénération axonale des CGR chez l'adulte mentionnées plus haut. D'abord, l'inexistence de l'application du protocole d'augmentation antigénique, s'étant avéré nécessaire lors de l'utilisation de l'anticorps PN2 dans la moelle épinière (Kennedy et al., 2006) et aussi dans la rétine selon nos résultats, pourrait facilement expliquer l'absence de détection de la nétrine-3 dans la rétine adulte de souris (Petrausch et al., 2000b). De plus, le signal détecté avec l'anticorps PN2 dans les couches ganglionnaires et nucléaires internes de la rétine et identifié comme correspondant à la nétrine-1 par l'étude d'Ellezam et al., pourrait très bien plutôt représenter la nétrine-3. Toutefois, l'absence d'expériences convaincantes d'identification spécifique de cette protéine dans cette étude nous empêche de s'assurer de cette hypothèse. C'est en comparant le signal obtenu avec l'anticorps PN2 avec les

marquages de la β -Galactosidase faits sur les souris transgéniques rapporteuses pour la nétrine-1 qu'ils ont pu affirmer que le signal observé avec le PN2 devait correspondre à la nétrine-1. Cependant, cette détection de signal positif pour la β -Galactosidase en utilisant la même souris rapporteuse pour la nétrine-1 que celle utilisée dans notre étude, peut s'expliquer facilement. En comparant les marquages de la β -Galactosidase fait sur des coupes de rétines de souris transgéniques avec ceux faits sur des coupes de rétines de souris de type sauvage, on peut observer qu'il y a un marquage non-spécifique relativement fort au niveau de la couche des CGR et de la couche plexiforme interne. Cette comparaison n'a toutefois pas été présentée dans l'étude d'Ellezam et al. et pourrait ainsi expliquer le signal obtenu avec cette souris.

III.3) LIMITES DE L'ÉTUDE

Notre étude a pu mettre à l'évidence l'existence de l'expression de la nétrine-3 et de plusieurs de ses récepteurs dans la rétine adulte de souris. Toutefois, notre étude se retrouve limitée par le fait que nous n'avons pas pu déterminer certains points importants. Premièrement, même si nous avons démontré la présence de récepteurs reconnus comme pouvant lier la nétrine-3, nous ne pouvons être persuadés que la nétrine-3 est vraiment un ligand *in vivo* pour tous ces récepteurs dans la rétine. Puisque la néogénine est aussi reconnue comme étant le récepteur principal des RGM (Rajagopalan et al., 2004), il se pourrait que ce dernier n'interagisse pas réellement avec la nétrine-3 mais bien avec les RGM puisque les transcrits de la protéine RGMA ont été détectés chez la souris adulte (Schnichels et al., 2007). Toutefois, la forte proximité entre les cellules exprimant la nétrine-3 et les

récepteurs des nétrines et le fait que les CGR expriment à la fois les récepteurs et le ligand suggèrent que la nétrine-3 pourrait véritablement interagir avec tous ces récepteurs de façon autocrine ou paracrine.

Deuxièmement, pour compléter notre étude qualitative, il aurait été adéquat de pouvoir identifier quelles cellules expriment les récepteurs UNC5A et UNC5D. Cependant, le manque d'anticorps fiables et caractérisés disponibles ne nous a pas permis d'effectuer les expériences nécessaires pour répondre à cette question.

Troisièmement, la question de l'importance des protéines trouvées dans la rétine de souris adulte n'a pas pu être adressée. L'utilisation d'outils génétiques permettant de réduire ou d'augmenter l'expression de ces protéines dans des types cellulaires spécifiques aurait été profitable pour résoudre ce problème.

III.4) IMPORTANCE DES RÉSULTATS

Comme mentionnés dans notre article, les données présentées dans cette étude ouvrent la porte à une panoplie d'hypothèses quant aux fonctions que la nétrine-3 et ses récepteurs peuvent avoir dans la rétine mature. Outre les hypothèses y étant avancées mentionnant que, en se basant sur les fonctions des nétrines précédemment identifiées chez l'animal adulte dans d'autres tissus, la nétrine-3 pourrait agir au niveau de la régénération, de la plasticité dendritique, de la prolifération cellulaire ou du maintien structurel, d'autres hypothèses sont envisageables. Dans la rétine, les nétrines pourraient donc potentiellement avoir aussi un rôle au niveau de la transmission synaptique ou au niveau de la survie cellulaire.

III.4.1) ROLES DANS LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE

La localisation dendritique des récepteurs néogénine suggère que ces derniers pourraient se regrouper au niveau des densités post-synaptiques des dendrites des CGR, par exemple, et jouer un rôle dans la transmission synaptique. Il a été démontré que chez le rat adulte, l'exposition répétée aux amphétamines provoquait une régulation positive des récepteurs DCC et homologues à UNC-5 dans les neurones dopaminergiques (Yetnikoff et al., 2007) et que cette augmentation était inhibée par l'administration d'un antagoniste du récepteur *N*-methyl-d-aspartate (NMDA) (Yetnikoff et al., 2007). De plus, il a été démontré que des souris ne possédant qu'une seule allèle sauvage du gène *dcc* ne développaient pas de sensibilisation face aux amphétamines (Flores et al., 2004). Ces observations laissent supposer que chez l'adulte, les récepteurs des nétrines sont régulés par l'activité neuronale et pourraient être impliqués d'une quelconque façon dans la transmission synaptique. De même, l'expression des récepteurs de la nétrine-3 pourrait potentiellement jouer un rôle dans la transmission synaptique des cellules horizontales, amacrines ou ganglionnaires de la rétine.

III.4.2) ROLES DANS LA SURVIE CELLULAIRE

Avec de plus en plus de données sur l'implication des nétrines dans la survie cellulaire en agissant sur leurs « *dependance receptor* » DCC et homologues à UNC-5 (Llambi et al., 2001; Mehlen et al., 1998), il est tout à fait plausible de penser qu'un tel mécanisme pourrait être en place dans la rétine adulte de souris. Ainsi, une sécrétion paracrine ou autocrine de la nétrine-3 pourrait assurer la survie neuronale

ou gliale des différentes cellules exprimant les récepteurs de nétrines que nous avons identifiés.

III.5) PERSPECTIVES

Notre étude démontre clairement que la nétrine-3 et ses récepteurs sont tous exprimés dans la rétine adulte et ce, au niveau de différents types cellulaires jouant un rôle crucial dans la transmission et la modulation du lumineux. Plusieurs avenues restent à être explorées et cette étude se voulait comme une première étape dans l'élaboration d'une profonde investigation.

Il serait très intéressant de pouvoir quantifier jusqu'à quel point la nétrine-3 ainsi découverte est importante dans la fonction de l'organe visuel. En utilisant des souris KO pour la nétrine-3 ou en utilisant des shRNA dirigés contre ses récepteurs par exemple, il pourrait être possible d'évaluer leurs implications dans la survie neuronale ou la distribution dendritique laminaire dans la couche plexiforme interne pour ne citer que quelques exemples. Il pourrait être aussi intéressant d'évaluer le comportement de souris soumises à une interruption induite d'expression de la nétrine-3 par un système inductible Dox. Aussi, en procédant à la culture d'explants de rétine adulte, il pourrait être intéressant de quantifier la transmission synaptique par électrophysiologie suite à la diminution contrôlée de la nétrine-3. Finalement, l'importance de la nétrine-3 devrait être évaluée lors de l'application de modèles expérimentaux de blessures tels que le l'induction expérimentale du glaucome ou l'axotomie.

BIBLIOGRAPHIE

- Alcantara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C. 2000. Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127(7):1359-1372.
- Anderson RB, Holt CE. 2002. Expression of UNC-5 in the developing *Xenopus* visual system. *Mechanisms of Development* 118(1-2):157-160.
- Arakawa H. 2005. p53, apoptosis and axon-guidance molecules. *Cell Death Differ* 12(8):1057-1065.
- Astic L, Pellier-Monnin V, Saucier D, Charrier C, Mehlen P. 2002. Expression of netrin-1 and netrin-1 receptor, DCC, in the rat olfactory nerve pathway during development and axonal regeneration. *Neuroscience* 109(4):643-656.
- Bae G-U, Yang Y-J, Jiang G, Hong M, Lee H-J, Tessier-Lavigne M, Kang J-S, Krauss RS. 2009. Neogenin Regulates Skeletal Myofiber Size and FAK and ERK Activities In Vivo and In Vitro. *Mol Biol Cell*:E09-06-0491.
- Baker KA, Moore SW, Jarjour AA, Kennedy TE. 2006. When a diffusible axon guidance cue stops diffusing: roles for netrins in adhesion and morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16(5):529-534.
- Ballesta J, Terenghi G, Thibault J, Polak J. 1984. Putative dopamine-containing cells in the retina of seven species demonstrated by tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Neuroscience* 12(4):1147-1156.
- Barallobre M, Del Rio J, Alcantara S, Borrell V, Aguado F, Ruiz M, Carmona M, Martin M, Fabre M, Yuste R, Tessier-Lavigne M, Soriano E. 2000. Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in netrin 1-deficient mice. *Development* 127(22):4797-4810.
- Bentley D, O'Connor T. 1994. Cytoskeletal events in growth cone steering. *Curr Opin Neurobiol* 4(1):43-48.
- Bouchard J-F, Horn KE, Stroh T, Kennedy TE. 2008. Depolarization recruits DCC to the plasma membrane of embryonic cortical neurons and enhances axon extension in response to netrin-1. *Journal of Neurochemistry* 107(2):398-417.
- Brankatschk M, Dickson BJ. 2006. Netrins guide *Drosophila* commissural axons at short range. *Nat Neurosci* 9(2):188-194.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 25(4):397-424.
- Carter-Dawson L, LaVail M. 1979. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comparative Neurology* 245-62(188):2.
- Cirulli V, Yebra M. 2007. Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(4):296-306.
- Colamarino S, Tessier-Lavigne M. 1985. The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81(4):621-629.
- Colon-Ramos DA, Margeta MA, Shen K. 2007. Glia Promote Local Synaptogenesis Through UNC-6 (Netrin) Signaling in *C. elegans*. *Science* 318(5847):103-106.

- Coombs J, van der List D, Wang G, Chalupa L. 2006. Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience* 140(1):123-136.
- de la Torre JR, Höpker VH, Ming G-l, Poo M-m, Tessier-Lavigne M, Hemmati-Brivanlou A, Holt CE. 1997. Turning of Retinal Growth Cones in a Netrin-1 Gradient Mediated by the Netrin Receptor DCC. *Neuron* 19(6):1211-1224.
- Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW. 1997a. Netrin-1 and DCC Mediate Axon Guidance Locally at the Optic Disc: Loss of Function Leads to Optic Nerve Hypoplasia. *Neuron* 19(3):575-589.
- Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin M-A, Stupack D, Nakagawara A, Rousseau R, Combaret V, Puisieux A, Valteau-Couanet D, Benard J, Bernet A, Mehlen P. 2009. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* 206(4):833-847.
- Ellezam B, Selles-Navarro I, Manitt C, Kennedy TE, 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. *Experimental Neurology* 168(1):105-115.
- Farah MH, Jr. SSE. 2005. Cell birth and death in the mouse retinal ganglion cell layer. *The Journal of Comparative Neurology* 489(1):120-134.
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA. 1997. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386:796 - 804.
- Fearon E, Cho K, Nigro J, Kern S, Simons J, Ruppert J, Hamilton S, Preisinger A, Thomas G, Kinzler K. 1990. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49-56.
- Fitzgerald DP, Bradford D, Cooper HM. 2007. Neogenin is expressed on neurogenic and gliogenic progenitors in the embryonic and adult central nervous system. *Gene Expression Patterns* 7(7):784-792.
- Fitzgerald DP, Cole SJ, Hammond A, Seaman C, Cooper HM. 2006. Characterization of neogenin-expressing neural progenitor populations and migrating neuroblasts in the embryonic mouse forebrain. *Neuroscience* 142(3):703-716.
- Flores C, Manitt C, Rodaros D, Thompson KM, Rajabi H, Luk KC, Tritsch NX, Sadikot AF, Stewart J, Kennedy TE. 2004. Netrin receptor deficient mice exhibit functional reorganization of dopaminergic systems and do not sensitize to amphetamine. *Mol Psychiatry* 10(6):606-612.
- Fuerst PG, Koizumi A, Masland RH, Burgess RW. 2008. Neurite arborization and mosaic spacing in the mouse retina require DSCAM. *Nature* 451(7177):470-474.
- Furne C, Rama N, Corset V, Chédotal A, Mehlen P. 2008. Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(38):14465-14470.
- Furrer M-P, Kim S, Wolf B, Chiba A. 2003. Robo and Frazzled/DCC mediate dendritic guidance at the CNS midline. *Nat Neurosci* 6(3):223-230.
- Gad JM, Keeling SL, Shu T, Richards LJ, Cooper HM. 2000. The Spatial and Temporal Expression Patterns of Netrin Receptors, DCC and Neogenin, in the Developing Mouse Retina. *Experimental Eye Research* 70(6):711-722.

- Geisbrecht BV, Dowd KA, Barfield RW, Longo PA, Leahy DJ. 2003. Netrin Binds Discrete Subdomains of DCC and UNC5 and Mediates Interactions between DCC and Heparin. *J Biol Chem* 278(35):32561-32568.
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H. 2004. Types of bipolar cells in the mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology* 469(1):70-82.
- Guijarro P, Simó S, Pascual M, Abasolo I, Del Río JA, Soriano E. 2006. Netrin1 exerts a chemorepulsive effect on migrating cerebellar interneurons in a Dcc-independent way. *Molecular and Cellular Neuroscience* 33(4):389-400.
- Hall A. 1998. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* 279(5350):509-514.
- Hattar S, Liao H-W, Takao M, Berson DM, Yau K-W. 2002. Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. *Science* 295(5557):1065-1070.
- Haverkamp S, Wässle H, Duebel J, Künér T, Augustine GJ, Feng G, Euler T. 2005. The Primordial, Blue-Cone Color System of the Mouse Retina. *J Neurosci* 25(22):5438-5445.
- Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. 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* 4(1):61-85.
- Hofmann K, Tschopp Jr. 1995. The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance. *FEBS Letters* 371(3):321-323.
- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo M-m, Tessier-Lavigne M, 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(7):927-941.
- Howell DM, Morgan WJ, Jarjour AA, Spirou GA, Berrebi AS, Kennedy TE, Mathers PH. 2007. Molecular guidance cues necessary for axon pathfinding from the ventral cochlear nucleus. *The Journal of Comparative Neurology* 504(5):533-549.
- Hume D, Perry V, Gordon S. 1983. Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol* 97(1):253-257.
- Jarjour AA, Bull S-J, Almasieh M, Rajasekharan S, Baker KA, Mui J, Antel JP, Di Polo A, Kennedy TE. 2008. Maintenance of Axo-Oligodendroglial Paranodal Junctions Requires DCC and Netrin-1. *J Neurosci* 28(43):11003-11014.
- Jarjour AA, Manitt C, Moore SW, Thompson KM, Yuh S-J, Kennedy TE. 2003. Netrin-1 Is a Chemorepellent for Oligodendrocyte Precursor Cells in the Embryonic Spinal Cord. *J Neurosci* 23(9):3735-3744.
- Johansson K, Törnngren M, Wasselius J, Månsson L, Ehinger B. 2001. Developmental expression of DCC in the rat retina. *Dev Brain Res* 130(1):133-138.
- Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, Jones JCR, Kenney MC, Koch M, Ninomiya Y, Patton BL, Paulsson M, Sado Y, Sage EH, Sasaki T, Sorokin LM, Steiner-Champlaud M-F, Sun T-

- T, SundarRaj N, Timpl R, Virtanen I, Ljubimov AV. 2007. Compositional Differences between Infant and Adult Human Corneal Basement Membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(11):4989-4999.
- Kappler J, Franken S, Junghans U, Hoffmann R, Linke T, Müller HW, Koch K-W. 2000. Glycosaminoglycan-Binding Properties and Secondary Structure of the C-Terminus of Netrin-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271(2):287-291.
- Kastenhuber E, Kern U, Bonkowsky JL, Chien C-B, Driever W, Schweitzer J. 2009. Netrin-DCC, Robo-Slit, and Heparan Sulfate Proteoglycans Coordinate Lateral Positioning of Longitudinal Dopaminergic Diencephalospinal Axons. *J Neurosci* 29(28):8914-8926.
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SSY, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. 1996. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor. *Cell* 87(2):175-185.
- Kennedy T, Wang H, Marshall W, Tessier-Lavigne M. 2006. Axon Guidance by Diffusible Chemoattractants: A Gradient of Netrin Protein in the Developing Spinal Cord. *J Neurosci* 26(34):8866-8874.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre J, Tessier-Lavigne M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78(3):425-435.
- Kim S, Chiba A. 2004. Dendritic guidance. *Trends in Neurosciences* 27(4):194-202.
- Knöll B, Isenmann S, Kilic E, Walkenhorst J, Engel S, Wehinger J, Bähr M, Drescher U. 2001. Graded expression patterns of ephrin-As in the superior colliculus after lesion of the adult mouse optic nerve. *Mechanisms of Development* 106(1-2):119-127.
- Koch M, Murrell JR, Hunter DD, Olson PF, Jin W, Keene DR, Brunken WJ, Burgeson RE. 2000. A Novel Member of the Netrin Family, β -Netrin, Shares Homology with the β Chain of Laminin: Identification, Expression, and Functional Characterization. *J Cell Biol* 151(2):221-234.
- Kolodziej PA, Timpe LC, Mitchell KJ, Fried SR, Goodman CS, Jan LY, Jan YN. 1996. frazzled Encodes a Drosophila Member of the DCC Immunoglobulin Subfamily and Is Required for CNS and Motor Axon Guidance. *Cell* 87(2):197-204.
- Larrivée B, Freitas C, Trombe M, Lv X, DeLafarge B, Yuan L, Bouvrée K, Bréant C, Del Toro R, Bràchot N, Germain S, Bono F, Dol F, Claes F, Fischer C, Autiero M, Thomas J-L, Carmeliet P, Tessier-Lavigne M, Eichmann A. 2007. Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. *Genes & Development* 21(19):2433-2447.
- Lee HK, Seo IA, Seo E, Seo S-Y, Lee HJ, Park HT. 2007. Netrin-1 induces proliferation of Schwann cells through UNC5b receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362(4):1057-1062.
- Leighton PA, Mitchell KJ, Goodrich LV, Lu X, Pinson K, Scherz P, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. 2001. Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature* 410(6825):174-179.
- Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. 1997. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386:833 - 838.

- Leung-Hagesteijn C, Spence AM, Stern BD, Zhou Y, Su M-W, Hedgecock EM, Culotti JG. 1992. UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71(2):289-299.
- Liu G, Li W, Wang L, Kar A, Guan K-L, Rao Y, Wu JY. 2008. DSCAM functions as a netrin receptor in commissural axon pathfinding. *PNAS* 106:2951-2956.
- Liu Y, Stein E, Oliver T, Li Y, Brunken WJ, Koch M, Tessier-Lavigne M, Hogan BLM. 2004. Novel Role for Netrins in Regulating Epithelial Behavior during Lung Branching Morphogenesis. *Current Biology* 14(10):897-905.
- Livesey FJ, Hunt SP. 1997. Netrin and Netrin Receptor Expression in the Embryonic Mammalian Nervous System Suggests Roles in Retinal, Striatal, Nigral, and Cerebellar Development. *Molecular and Cellular Neuroscience* 8(6):417-429.
- Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. 2001. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO Journal* 20(11):2715-2722.
- Low K, Culbertson M, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Tuszynski MH. 2008. Netrin-1 Is a Novel Myelin-Associated Inhibitor to Axon Growth. *J Neurosci* 28(5):1099-1108.
- Lu X, le Noble F, Yuan L, Jiang Q, de Lafarge B, Sugiyama D, Breant C, Claes F, De Smet F, Thomas J-L, Autiero M, Carmeliet P, Tessier-Lavigne M, Eichmann A. 2004. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 432(7014):179-186.
- Ly A, Nikolaev A, Suresh G, Zheng Y, Tessier-Lavigne M, Stein E. 2008. DSCAM Is a Netrin Receptor that Collaborates with DCC in Mediating Turning Responses to Netrin-1. *Cell* 133(7):1241-1254.
- Madison RD, Zomorodi A, Robinson GA. 2000. Netrin-1 and Peripheral Nerve Regeneration in the Adult Rat. *Experimental Neurology* 161(2):563-570.
- Manitt C, Colicos MA, Thompson KM, Rousselle E, Peterson AC, Kennedy TE. 2001. Widespread Expression of Netrin-1 by Neurons and Oligodendrocytes in the Adult Mammalian Spinal Cord. *J Neurosci* 21(11):3911-3922.
- Manitt C, Nikolakopoulou AM, Almarino DR, Nguyen SA, Cohen-Cory S. 2009. Netrin Participates in the Development of Retinotectal Synaptic Connectivity by Modulating Axon Arborization and Synapse Formation in the Developing Brain. *J Neurosci* 29(36):11065-11077.
- Manitt C, Thompson KM, Kennedy TE. 2004. Developmental shift in expression of netrin receptors in the rat spinal cord: Predominance of UNC-5 homologues in adulthood. *Journal of Neuroscience Research* 77(5):690-700.
- Manitt C, Wang D, Kennedy TE, Howland DR. 2006. Positioned to inhibit: Netrin-1 and netrin receptor expression after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research* 84(8):1808-1820.
- Marc R. 1989. The role of glycine in the mammalian retina. *Prog Retinal Res* 8:67-107.
- Masland R. 1988. Amacrine cells. *Trends Neurosci* 11(9):405-410.
- Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. 1998. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395(6704):801-804.

- Meyerhardt JA, Caca K, Eckstrand BC, Hu G, Lengauer C, Banavali S, Look AT, Fearon ER. 1999. Netrin-1: Interaction with Deleted in Colorectal Cancer (DCC) and Alterations in Brain Tumors and Neuroblastomas. *Cell Growth Differ* 10(1):35-42.
- Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ. 1996. Genetic Analysis of Netrin Genes in *Drosophila*: Netrins Guide CNS Commissural Axons and Peripheral Motor Axons. *Neuron* 17(2):203-215.
- Mitchell KJ, Pinson KI, Kelly OG, Brennan J, Zupicich J, Scherz P, Leighton PA, Goodrich LV, Lu X, Avery BJ, Tate P, Dill K, Pangilinan E, Wakenight P, Tessier-Lavigne M, Skarnes WC. 2001. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat Genet* 28(3):241-249.
- Mollon J. 1989. "Tho' she kneel'd in that place where they grew..." The uses and origins of primate colour vision. *J Exp Biol* 146(1):21-38.
- Monnier PP, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, Mann M, Flad M, Hornberger MR, Stahl B, Bonhoeffer F, Mueller BK. 2002. RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature* 419(6905):392-395.
- Moore S, Tessier-Lavigne M, Kennedy T. 2007. Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol* 621:17-31.
- Nakashiba T, Ikeda T, Nishimura S, Tashiro K, Honjo T, Culotti JG, Itohara S. 2000. Netrin-G1: a Novel Glycosyl Phosphatidylinositol-Linked Mammalian Netrin That Is Functionally Divergent from Classical Netrins. *J Neurosci* 20(17):6540-6550.
- Nguyen A, Cai H. 2006. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism. *103(17):6530-6535*.
- Osborne PB, Halliday GM, Cooper HM, Keast JR. 2005. Localization of immunoreactivity for Deleted in Colorectal Cancer (DCC), the receptor for the guidance factor netrin-1, in ventral tier dopamine projection pathways in adult rodents. *Neuroscience* 131(3):671-681.
- Park J-I, Seo I-A, Lee H-K, Park H-T, Shin S-W, Park Y-M, Ahn K-J. 2007. Netrin Inhibits Regenerative Axon Growth of Adult Dorsal Root Ganglion Neurons in Vitro. *J Korean Med Sci* 22(4):641-645.
- Park KW, Crouse D, Lee M, Karnik SK, Sorensen LK, Murphy KJ, Kuo CJ, Li DY. 2004. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(46):16210-16215.
- Peichl L, González-Soriano J. 1994. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci* 11(3):501-517.
- Petit A, Sellers DL, Liebl DJ, Tessier-Lavigne M, Kennedy TE, Horner PJ. 2007. Adult spinal cord progenitor cells are repelled by netrin-1 in the embryonic and injured adult spinal cord. *PNAS* 104:17837-17842.
- Petrausch B, Jung M, Leppert CA, Stuermer CA. 2000. Lesion-induced regulation of netrin receptors and modification of netrin-1 expression in the retina of fish and grafted rats. *Mol Cell Neurosci* 16:350-364.
- Pourcho R. 1996. Neurotransmitters in the retina. *Curr Eye Res* 15(7):797-803.

- Provencio I, Jiang G, Grip WJD, Hayes WP, Rollag MD. 1998. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *PNAS* 95:340-345.
- Przyborski S, Knowles B, Ackerman S. 1998. Embryonic phenotype of UNC5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary. *Development* 125(1):41-50.
- Qin S, Yu L, Gao Y, Zhou R, Zhang C. 2007. Characterization of the receptors for axon guidance factor netrin-4 and identification of the binding domains. *Molecular and Cellular Neuroscience* 34(2):243-250.
- Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller B, Strittmatter S. 2004. Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nature Cell Biology* 6(8):756 - 762.
- Rajasekharan S, Baker KA, Horn KE, Jarjour AA, Antel JP, Kennedy TE. 2009. Netrin 1 and Dcc regulate oligodendrocyte process branching and membrane extension via Fyn and RhoA. *Development* 136:415-426.
- Raymond ID, Vila A, Huynh U-CN, Brecha NC. 2008. Cyan fluorescent protein expression in ganglion and amacrine cells in a thyl1-CFP transgenic mouse retina. *Molecular Vision* 14:1559–1574.
- Rodger J, Lindsey KA, Leaver SG, King CE, Dunlop SA, Beazley LD. 2001. Expression of ephrin-A2 in the superior colliculus and EphA5 in the retina following optic nerve section in adult rat. *European Journal of Neuroscience* 14(12):1929-1936.
- Rodrigues S, De Wever O, Bruyneel E, Rooney RJ, Gespach C. 2007. Opposing roles of netrin-1 and the dependence receptor DCC in cancer cell invasion, tumor growth and metastasis. *Oncogene* 26(38):5615-5625.
- Sajjadi F, Pasquale E. 1993. Five novel avian Eph-related tyrosine kinases are differentially expressed. *Oncogene* 8(7):1807-1813.
- Sapieha PS, Duplan L, Uetani N, Joly S, Tremblay ML, Kennedy TE, Di Polo A. 2005. Receptor protein tyrosine phosphatase sigma inhibits axon regrowth in the adult injured CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience* 28(4):625-635.
- Schmidtmer J, Engelkamp D. 2004. Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm. *Gene Expression Patterns* 4(1):105-110.
- Schneiders FI, Maertens B, Bose K, Li Y, Brunken WJ, Paulsson M, Smyth N, Koch M. 2007. Binding of Netrin-4 to Laminin Short Arms Regulates Basement Membrane Assembly. *J Biol Chem* 282(33):23750-23758.
- Schnichels S, Conrad S, Warstat K, Henke-Fahle S, Skutella T, Schraermeyer U, Julien S. 2007. Gene expression of the repulsive guidance molecules/neogenin in the developing and mature mouse visual system: C57BL/6J vs. the glaucoma model DBA/2J. *Gene Expression Patterns* 8(1):1-11.
- Seaman C, Cooper HM. 2001. Netrin-3 protein is localized to the axons of motor, sensory, and sympathetic neurons. *Mechanisms of Development* 101(1-2):245-248.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87(6):1001-1014.

- Serafini T, Kennedy TE, Gaiko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78(3):409-424.
- Shatzmiller RA, Goldman JS, Simard-Émond L, Rymar V, Manitt C, Sadikot AF, Kennedy TE. 2008. Graded expression of netrin-1 by specific neuronal subtypes in the adult mammalian striatum. *Neuroscience* 157(3):621-636.
- Shekarabi M, Kennedy TE. 2002. The Netrin-1 Receptor DCC Promotes Filopodia Formation and Cell Spreading by Activating Cdc42 and Rac1. *Molecular and Cellular Neuroscience* 19(1):1-17.
- Shekarabi M, Moore S, Tritsch N, Morris S, Bouchard J, Kennedy T. 2005. Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci* 25(12):3132-3141.
- Skarnes WC, Moss JE, Hurlley SM, Beddington RS. 1995. Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development. *PNAS* 92(14):6592-6596.
- Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L. 2003. Netrin-1/Neogenin Interaction Stabilizes Multipotent Progenitor Cap Cells during Mammary Gland Morphogenesis. *Developmental Cell* 4(3):371-382.
- Stein E, Zou Y, Poo M-m, Tessier-Lavigne M. 2001. Binding of DCC by Netrin-1 to Mediate Axon Guidance Independent of Adenosine A2B Receptor Activation. *Science* 291(5510):1976-1982.
- Strähle U, Fischer N, Blader P. 1997. Expression and regulation of a netrin homologue in the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development* 62(2):147-160.
- Sugimoto Y, Taniguchi M, Yagi T, Akagi Y, Nojyo Y, Tamamaki N. 2001. Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. *Development* 128(17):3321-3330.
- Tanikawa C, Matsuda K, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. 2003. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5:216-223.
- Togari A, Mogi M, Arai M, Yamamoto S, Koshihara Y. 2000. Expression of mRNA for axon guidance molecules, such as semaphorin-III, netrins and neurotrophins, in human osteoblasts and osteoclasts. *Brain Research* 878(1-2):204-209.
- Tsai H-H, Tessier-Lavigne M, Miller RH. 2003. Netrin 1 mediates spinal cord oligodendrocyte precursor dispersal. *Development* 130(10):2095-2105.
- Van Raay TJ, Foskett SM, Connors TD, Klinger KW, Landes GM, Burn TC. 1997. The NTN2L Gene Encoding a Novel Human Netrin Maps to the Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Region on Chromosome 16p13.3. *Genomics* 41(2):279-282.
- Verderber L, Johnson W, Mucke L, Sarthy V. 1995. Differential regulation of a glial fibrillary acidic protein-LacZ transgene in retinal astrocytes and Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(6):1137-1143.
- Vielmetter J, Kayyem JF, Roman JM, Dreyer WJ. 1994. Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely

- related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *J Cell Biol* 127(6):2009-2020.
- Wadsworth WG, Bhatt H, Hedgecock EM. 1996. Neuroglia and Pioneer Neurons Express UNC-6 to Provide Global and Local Netrin Cues for Guiding Migrations in *C. elegans*. *Neuron* 16(1):35-46.
- Wang H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, 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(12):4938-4947.
- Wang W, Brian Reeves W, Ramesh G. 2008. Netrin-1 and kidney injury. I. Netrin-1 protects against ischemia-reperfusion injury of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(4):F739-747.
- Weber P, Kula-Eversole E, Pyza E. 2009. Circadian control of dendrite morphology in the visual system of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 4(1):e4290.
- Wehrle R, Camand E, Chedotal A, Sotelo C, Dusart I. 2005. Expression of *netrin-1*, *slit-1* and *slit-3* but not of *slit-2* after cerebellar and spinal cord lesions. *European Journal of Neuroscience* 22(9):2134-2144.
- Williams ME, Lu X, McKenna WL, Washington R, Boyette A, Strickland P, Dillon A, Kaprielian Z, Tessier-Lavigne M, Hinck L. 2006. UNC5A promotes neuronal apoptosis during spinal cord development independent of netrin-1. *Nat Neurosci* 9(8):996-998.
- Xie Y, Hong Y, Ma X-Y, Ren X-R, Ackerman S, Mei L, Xiong W-C. 2006. DCC-dependent Phospholipase C Signaling in Netrin-1-induced Neurite Elongation. *J Biol Chem* 281(5):2605-2611.
- Yamagata M, Sanes JR. 2008. Dscam and Sidekick proteins direct lamina-specific synaptic connections in vertebrate retina. *Nature* 451(7177):465-469.
- Yamakawa K, Huot Y, Haendelt M, Hubert R, Chen X, Lyons G, Korenberg J. 1998. DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Hum Mol Genet* 7(2):227-237.
- Yebrá M, Montgomery AMP, Diaferia GR, Kaido T, Silletti S, Perez B, Just ML, Hildbrand S, Hurford R, Florkiewicz E, Tessier-Lavigne M, Cirulli V. 2003. Recognition of the Neural Chemoattractant Netrin-1 by Integrins $[\alpha]6[\beta]4$ and $[\alpha]3[\beta]1$ Regulates Epithelial Cell Adhesion and Migration. *Developmental Cell* 5(5):695-707.
- Yetnikoff L, Labelle-Dumais C, Flores C. 2007. Regulation of netrin-1 receptors by amphetamine in the adult brain. *Neuroscience* 150(4):764-773.
- Yin Y, Miner JH, Sanes JR. 2002. Laminets: Laminin- and Netrin-Related Genes Expressed in Distinct Neuronal Subsets. *Molecular and Cellular Neuroscience* 19(3):344-358.
- Yin Y, Sanes JR, Miner JH. 2000. Identification and expression of mouse netrin-4. *Mechanisms of Development* 96(1):115-119.
- Zhang C, Meng F, Wang C, Guo H, Fan M, Liu S, Zhou R, He F. 2004. Identification of a novel alternative splicing form of human netrin-4 and analyzing the expression patterns in adult rat brain. *Molecular Brain Research* 130(1-2):68-80.

