La Nétrine-1, un facteur de guidage et de survie neuronale pendant le développement du système nerveux central

Nicolas Rama

▶ **To cite this version:**

Nicolas Rama. La Nétrine-1, un facteur de guidage et de survie neuronale pendant le développement du système nerveux central. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10059 . tel-01245254

HAL Id: tel-01245254
https://theses.hal.science/tel-01245254

Submitted on 17 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 59 - 2011 Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 11 Avril 2011

par

M. Nicolas RAMA

<u>TITRE</u> : La Nétrine-1, un facteur de guidage et de survie neuronale pendant le développement du système nerveux central.

Directeur de thèse : Patrick MEHLEN

JURY	Jérôme HONNORAT	Président du Jury
	Isabelle DUSART	Rapporteur
	Fanny MANN	Rapporteur
	Alain CHEDOTAL	Examinateur
	Patrick MEHLEN	Directeur de thèse
	Laurent PAYS	Membre invité

Remerciements

Je tiens premièrement à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail. Merci à Fanny Mann et Isabelle Dusart d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail et merci à Alain Chédotal pour avoir accepté d'être examinateur. Merci également à Jérôme Honnorat d'avoir accepté d'être président du jury.

Patrick, je tiens à te remercier chaleureusement pour m'avoir accueilli dans ton équipe. Je te remercie pour m'avoir fait confiance pendant ces 5 années et pour m'avoir permis de participer à de nombreuses études. Je te remercie aussi pour ton eternel enthousiasme qui m'aura permis de développer des techniques que je pensais difficilement réalisables. Merci pour tout !

Laurent, je te remercie pour tout le temps que tu auras passé à corriger mon rapport de M2, ma thèse… et pour toutes les discussions sur les manips qui m'ont permis d'avancer sur mon travail. Je te remercie également pour m'avoir initié à l'enseignement.

Je remercie mon maître jedi, Véro. Tu m'as presque tout appris en dissection et en culture primaire ! Je n'oublierai pas tout les bons moments que l'on a passés en pièce dissection et en dehors du laboratoire.

Je remercie également David, Andréa et Julien pour toutes les discussions scientifiques que l'on a eues et tout les grands moments de rigolade ! Je vous remercie aussi pour les cours d'histoire-géographie du repas de midi, plutôt de 13h45 !
David, je te remercie aussi pour avoir relu une partie de ma thèse et pour toutes les discussions que l'on a pu avoir. Merci pour ton aide et tes idées quand j'étais bloqué ! Je pense que j'ai appris beaucoup de choses avec toi !

Je tiens également à remercier Céline, ma première maître de stage qui m'a mis le pied à l'étrier ! J'ai appris beaucoup de choses avec toi. Merci pour tout !

Je remercie aussi Bérangère pour toute les commandes de dernière minute qui m'ont sauvé. Je remercie aussi Sylvie, la gardienne de l'animalerie, pour tous les post-it « bouchon »!
Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du laboratoire. La liste est un peu longue. Donc, je ne vais pas l'énumérer !

Je remercie aussi Alain Chédotal et Valérie Castellani pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et pour toutes les solutions que vous m'avez apportées.

Ensuite, je remercie toute ma famille. Je remercie évidemment mes parents qui m'ont permis de faire des études et mon frère avec qui je passe toujours de bons moments.
Je tiens également à remercier tous mes amis pour toutes les aventures passées ensemble.

Enfin le dernier mot pour Justine. Je te remercie pour ta patience ! Je te remercie aussi pour l'équilibre de vie que tu m'apportes. Merci !

Résumé

Le développement du système nerveux central fait intervenir de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la migration neuronale et le guidage axonal. Ces processus sont finement régulés et aboutissent à la formation d'un système nerveux central fonctionnel.

Au cours de cette thèse, je me suis principalement intéressé à une molécule chimiotropique, la Nétrine-1 et à ses récepteurs APP (Amyloïd-β Precursor Protein) et DCC (Deleted in Colorectal Cancer). La Nétrine-1 est impliquée à la fois dans le contrôle de la navigation neuronale (*ie* migration neuronale et guidage axonal) et dans celui de la survie neuronale. Un premier aspect de mon travail a consisté à étudier le rôle d'un nouveau récepteur à la Nétrine-1 : APP. Nous avons donc démontré que APP est un récepteur à la Nétrine-1 impliqué dans le guidage des axones commissuraux. En effet, APP collabore avec DCC afin de stimuler la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1. Le second aspect de mon travail a été l'étude du rôle de la Nétrine-1 en tant que facteur de survie neuronale. En effet, son récepteur DCC appartient à la famille des récepteurs à dépendance. En absence de Nétrine-1, DCC ne reste pas inactif, mais déclenche une signalisation pro-apoptotique qui va éliminer la cellule. Nous avons démontré que pendant le développement du système nerveux, la Nétrine-1 inhibe cette signalisation et contrôle la survie des neurones commissuraux. Le contrôle de la signalisation pro-apoptotique de DCC par la Nétrine-1 pourrait ainsi réaliser un contrôle qualité des projections axonales et faciliter l'orientation du cône de croissance lors du guidage du cône de croissance.

Mots clefs : Nétrine-1, DCC, APP, Guidage Axonal, Apoptose

Summary

The development of the central nervous system requires several cellular processes such as proliferation, differentiation, apoptosis, neuronal migration and axon guidance. This whole process is finely regulated and leads to the formation of a functional central nervous system.

During my thesis, I have mainly worked on a chemotropic molecule, Netrin-1 and its receptors APP (Amyloid-ß Precursor Protein) and DCC (Deleted in Colorectal Cancer). Netrin-1 is involved in both neuronal navigation (neuronal migration and axonal guidance) and neuronal survival. I have firstly investigated the role of a new Netrin-1 receptor, APP during axonal guidance. We have shown that APP is involved in the guidance of commissural axons. Indeed, APP collaborates with DCC in order to promote axonal outgrowth in response to Netrin-1. Thereafter, I have investigated the role of Netrin-1 as a neuronal survival factor. In fact, the Netrin-1 receptor DCC belongs to the dependence receptor family. In absence of Netrin-1, DCC does not remain inactive, since it triggers a pro-apoptotic signalling pathway. During the development of the central nervous system, we have shown that Netrin-1 blocks the pro-apoptotic signalling pathway and promotes neuronal survival. The Netrin-1 control of DCC pro-apoptotic signalling might carry out a "quality control" of the axonal projection or/and it could promote the steering of the growth cone during axonal guidance.

Keywords : Netrin-1, DCC, APP, Axonal Guidance and Apoptosis

Abréviations

Abl : Abelson tyrosine kinase

ADD : Addiction Dependence Domain

ABP : Actin Binding Protein

ACs : Adénylate Cyclase soluble

ADAM : A Disintergrin And Metaloprotease

ADF : Actin Depolymerisation Factor

AGE-1 : ARF GAP Effector-1

AICD : APP Intracellular Domain

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

APAF-1 : Apoptosis Protease Activatin Factor 1

APP : Amyloid-β Precursor Protein

ARP2/3 : Actin Related Protein 2/3

Bcl-2 : B Cell Lymphoma 2

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

BIR : Baculovirus IAP Repeat

BMP7 : Bone Morphogenetic Protein 7

CAD : Caspase Activated DNase

CAM : Cell Adhesion Molecule

caMKII : Ca^{2+} CalModulin-dependent protein Kinase II

Caspase : Cysteinyl ASPartate protéASE

cdc42 : Cell Division Cycle 42

CDO : Cell-adhesion-molecule-releated/ Downregulated by Oncogenes

CGR : Cellules Ganglionnaires Rétiniennes

CICR : Calcium Induced Calcium Release

Clr-1 : CLeaR family member-1

CTF : C-Terminal fragment

DB : DCC Binding

DCC : Deleted in Colorectal Cancer

DICD : DCC IntraCellular Domain

DIP13-α: DCC Interacting Protein-α

DISC : Death Inducing Signaling Complex

DR : Récepteur à Dépendance

DRAL-1 : Downregulated in RhAbdomyosarcoma LIM-domain protein

DRG : Dorsal Root Ganglia

DSCAM : Down Syndrome Cell Adhesion Molecule

EGF : Epidermal Growth Factor

ENA/VASP : Enabled/vasodilatator Stimulated Phosphoprotein

Erk1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2

FAK : Focal Adhesion Kinase

GAP : GTPase Activating Protein

GDF-7 : Growth Differentiation Factor-7

GEF : Guanine Nucleotide Exchange Factor

GL : Glie Longitudinale

GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique

GnRH :Gonadotropin-Releasing Hormone

GPI : GlycosylPhosphatidylInositol

GRB7 : Growth factor Receptor Bound protein-7

GSK-3β : Glycogen Synthase Kinase 3β

HGF : Hepatocyte Growth Factor

IAPs : Inhibitor of Apoptosis Protein

ICAD : Inhibitor of CAD

IP3 : Inositol tri-Phosphate

IR : Ischémie-Reperfusion

KPI : Kunitz-type Protease Inhibitor

LCCs : L-type Ca^{2+} Channels

LHRH : Luteinising Hormone-Releasing Hormone

LRi : Lèvre Rhombique inférieure

MAP : Microtubule Associated Protein

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

Max- : Motor AXon

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MLCK : Myosin Light Chain Kinase

Mnk1 : MAPK interacting Kinase1

N-CAM : Neural- Cell Adhesion Molécule

Nck-1 : Non-Catalytic region of tyrosine Kinase

NCL : Noyau du Cunéatus Externe

NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells

NGF : Nerve Growth Factor

NOI : Noyau de l'Olive Inférieure

NP : Noyau Pontin

NRL : Noyau Réticulaire Latéral

$p130^{CAS}$: p130 Crk Associated Substrate

Pak1 : P21 Activated Kinase

PDZ : Post Synaptic Density/Disc large/ Zona occludens-1

PG : Précurseurs des cellules Gliales

PI3K : PhosphoInositide-3 Kinase

Pick1 : Protein Interacting with C-Kinase

PITP-α: PhosphatidylInositol Transfer Protein-α

PKA : Protéine Kinase A

PKC-α : Protein Kinase C-α

PLCγ : phospholipase Cγ

PO : Précurseurs des cellules Oligodendritiques

PS1 : Préséniline-1 (PS1)

Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxinsubstrate 1

RGM : Repulsive Guidance Molecule

ROCK1/2 (Rho Associated Coiled-coil-containing protein Kinase 1/2

ROBO : ROund aBOut protein

RVO : Reflexe Vestibulo-Occulaire

SKF : Src Kinase Family

SNC : Système Nerveux Central

TAG-1 : Transient Axonal Glycoprotein-1

TIMP : Tissue Inhibitor of MetalloProtease

TRPCs : Transient Receptor Potential Channel

Unc- : Uncoordinated-

Vg1RBP : Vg1 RNA Binding Protein

WASP : Wiscott-Aldrich-Syndrome Protein

ZU5 : Zona occludens-1/Unc5 homology domain

Table des matières :

INTRODUCTION : **9**

1 LA NETRINE-1 ET SES RECEPTEURS **12**
1-1 LA NETRINE-1 12
1-1-1 La découverte de la famille des Nétrines *12*
1-1-2 Evolution et structure des Nétrines *13*
1-1-3 Rôles de la Nétrine-1 ..... *15*
1-1-4 Le patron d'expression de la Nétrine-1 ..... *16*
1-1-4-1 Système nerveux central 17
1-1-4-1-1 La moelle épinière 17
1-1-4-1-2 Dans les autres régions du SNC 17
1-1-4-2 A l'extérieur du SNC 18
1-1-5-La Nétrine-1, une molécule diffusible *18*
1-2 LES RECEPTEURS A LA NETRINE-1 19
1-2-1 DCC et néogénine *20*
1-2-1-1 DCC 20
1-2-1-2 Néogénine 22
1-2-2 La famille des récepteurs Unc5 ..... *24*
1-2-3 DSCAM *25*
1-2-4 Les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$ *26*
1-2-4 Les récepteurs putatifs à la Nétrine-1 ..... *27*
1-2-4-1-A2b 27
1-2-4-2-APP 29

2 ROLE DE LA NETRINE-1 DANS LE DEVELOPPEMENT DU SNC **32**
2-1 LA NETRINE-1 ET LE GUIDAGE AXONAL 32
2-1-1 LE GUIDAGE AXONAL 32
2-1-1-1 Généralités 32
2-1-1-2-La structure effectrice : le cône de croissance 33
2-1-1-3 Les facteurs de guidage axonal 37
2-1-1 4-Modèle d'étude du guidage axonal : les neurones commissuraux 38
2-1-2 Rôle de la Nétrine-1 dans le guidage axonal *40*
2-1-2-1 La Nétrine-1 est une molécule chimioattractive 41
2-1-2-2 La Nétrine-1 est aussi une molécule chimiorépulsive 44
2-2 LA NETRINE-1 ET MIGRATION NEURONALE 47
2-2-1 La migration neuronale *47*
2-2-2 La Nétrine-1 guide la migration neuronale *48*
2-2-3 La Nétrine-1 et la migration des cellules non neuronales *50*
2-3 NETRINE-1 RAMIFICATION NEURITIQUE ET SYNAPTOGENESE 52
2-4 LA SIGNALISATION EN AVAL DE LA NETRINE-1 ET DE SES RECEPTEURS 52
2-4-1 La réception du signal *53*
2-4-1-1 DCC 53
2-4-1-2- Les récepteurs de la famille Unc5 54
2-4-1-3 Modulation de la réception du signal constitué par la Nétrine-1 par d'autres récepteurs 55
2-4-1-4 Trafic et régulation des récepteurs de guidage 56
2-4-2- L'intégration du signal via des protéines adaptatrices *58*
2-4-3 La transduction du signal *61*
2-4-3-1 la voie des petites Rho GTPases 61
2-4-3-2 La voie des MAPKs : 64
2-4-3- 3 La Nétrine-1 et les seconds messagers 66
2-4-3-4 La Nétrine-1 contrôle la transcription, la traduction et la dégradation protéique dans le cône de croissance 71
2-4-4 Les signalisations en aval de la Nétrine-1 convergent vers le cytosquelette *73*

3 NETRINE-1 ET APOPTOSE NEURONALE **75**
3-1 L'APOPTOSE 75
3-1-1 Généralités sur l'apoptose *75*
3-1-2 Les protéines clefs de l'apoptose : les caspases *76*

3-1-3 Principales voies d'activation de l'apoptose *78*
3-1-3-1 la voie extrinsèque 78
3-1-3-2 la voie intrinsèque 79
3-1-4 Les autres types de mort cellulaire *80*
3-2 L'APOPTOSE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU SNC 81
3-2-1 L'apoptose précoce *81*
3-2-2 La théorie neurotrophique *83*
3-3 LA NETRINE-1 EST UN FACTEUR DE SURVIE 84
3-3-1 Les récepteurs à dépendance *85*
3-3-2 la signalisation pro-apoptotique de DCC *86*
3-3-3 La Nétrine-1 est un facteur de survie neuronale *87*
3-3-4 La Nétrine-1 est un facteur de survie pour des cellules non neuronales *89*

RESULTAS **90**

RESULTATS **91**
PUBLICATION N°1 : THE AMYLOID PRECURSOR PROTEIN REGULATES NETRIN-1-MEDIATED COMMISSURAL AXON GUIDANCE 93
PUBLICATION 2 : NETRIN-1 IS A SURVIVAL FACTOR DURING COMMISSURAL AXON NAVIGATION. 96
ETUDE DES SOURIS DCC-D1290N 99

DISCUSSION **103**

DISCUSSION : LA NETRINE-1, UN REGULATEUR CLEF DU DEVELOPPEMENT DU SNC **104**

1 APP COLLABORE AVEC DCC LORS DU GUIDAGE AXONAL **104**
1-1 APP, UN COLLABORATEUR DE DCC 105
1-2 APP UN RECEPTEUR AUTONOME A LA NETRINE-1 ? 106
1-3 APP CONTROLE LE CLIVAGE DE DCC PAR LES SECRETASES 107
1-4 APP, POURRAIT-IL ETRE IMPLIQUE DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR DCC ? 109

2 LA NETRINE-1 EST UN FACTEUR DE SURVIE NEURONALE **111**
2-1 LA NETRINE-1 EST UN FACTEUR DE SURVIE POUR LES NEURONES COMMISSURAUX 111
2-2 LA SIGNALISATION PRO-APOPTOTIQUE DE DCC CONTROLE LA SURVIE CELLULAIRE 113
2-2-1 les souris DCC-D1290N *114*
2-2-2 Les souris DCC-D1290N ont un nombre de neurones olivaires plus important *115*
2-2-3 La Nétrine-1 contrôle la survie cellulaire chez l'adulte *117*

3 LE COUPLE DCC/NETRINE-1, UN GAGE DE QUALITE **119**
3-1 DCC/NETRINE-1 CONTROLE QUALITE DES PROJECTIONS AXONALES 119
3-2 DCC/NETRINE-1 ET REMODELAGE DU CYTOSQUELETTE DU CONE DE CROISSANCE PAR LES CASPASES 120

CONCLUSION **122**

BIBLIOGRAPHIE **124**

ANNEXES **151**
Annexe N°1 : Netrin-1 and axonal guidance: signaling and asymmetrical translation
Annexe N°2 : The neogenin intracellular domain regulates gene transcription via nuclear translocation.
Annexe N°3 : Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B.
Annexe N°4 : The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex.
Annexe N°5 : The dependence on Sonic Hedgehog for cell survival occurs through the inhibition of CDO pro-apoptotic activity.
Annexe N°6 : Etude comportementale des souris DCCD1290N

Introduction :

Notre capacité à interagir avec notre environnement est gouvernée par le système nerveux. En effet, celui-ci reçoit de nombreux stimuli du milieu environnant. Toutes ces informations sont ensuite analysées et une réponse adéquate est générée. En outre, le système nerveux contrôle aussi les fonctions dites végétatives, nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme, comme la digestion ou la respiration par exemple. L'unité fonctionnelle du système nerveux est le neurone. La cellule neuronale est formée d'un corps cellulaire, ou soma, d'où partent des prolongements que sont les dendrites et l'axone, connectés à leurs cibles par l'intermédiaire d'une synapse. Le neurone reçoit généralement au niveau des dendrites des informations qu'il va intégrer avant finalement de transmettre un signal à sa cible *via* son axone. Généralement, le système nerveux est subdivisé en deux partie : le Système Nerveux Central (SNC) constitué par l'encéphale et la moelle épinière, et le Système Nerveux Périphérique (SNP).

Au cours de cette thèse, je me suis essentiellement intéressé au développement du SNC. Celui-ci est constitué d'une centaine de milliards de neurones qui sont interconnectés en un réseau. Plusieurs mécanismes tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la migration neuronale et le guidage axonal sont nécessaires à l'obtention d'un SNC fonctionnel. Plus en détail, les mécanismes de prolifération et de différenciation génèrent les neurones et les cellules gliales. Puis la migration neuronale et le guidage axonal vont organiser le SNC et permettre l'établissement du réseau neuronal. En particulier, le guidage axonal va permettre la croissance et l'orientation de l'axone vers sa cible en réponse à des signaux environnementaux. C'est un processus cellulaire qui fait intervenir une région spécialisée, localisée à l'extrémité distale de l'axone : le cône de croissance. Il s'agit d'une structure très mobile, capable de percevoir les nombreux signaux présents dans son environnement. Parmi ceux-ci, on peut trouver des molécules capables d'attirer ou de repousser les axones à longue distance, ce sont les molécules chimiotropiques. En outre, il existe des molécules permissives ou non permissives à la croissance axonale. Nous verrons que le chimiotropisme est un processus très important lors du guidage axonal.

Quant à l'apoptose, elle régule le nombre de neurones et élimine ceux en mauvais état physiologique ou ceux qui n'ont pas établi de connexion neuronale correcte.

Pendant ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé au rôle de la Nétrine-1 à la fois dans le guidage axonal et dans le contrôle de l'apoptose. En effet, nous allons voir que cette protéine est impliquée dans ces deux processus cellulaires au demeurant très différents.

La Nétrine-1 est une molécule chimiotropique sécrétée qui fut initialement décrite comme un facteur de guidage pour les axones. Dans la première partie de cette thèse, l'introduction, nous allons explorer les différentes caractéristiques de cette protéine afin de décrire son rôle au cours du développement du SNC.

Dans le premier chapitre, nous verrons que la Nétrine-1 est une protéine conservée au cours de l'évolution, tout comme son rôle de facteur de guidage axonal, notamment lors de l'attraction à la ligne médiane. En outre, la Nétrine-1 présente différents récepteurs impliqués au cours du développement.

Dans le deuxième chapitre, nous verrons que la Nétrine-1 est un facteur de guidage axonal qui contrôle la mise en place de nombreuses structures, notamment celles qui relient les deux hémisphères du SNC : les commissures. Nous verrons également que la Nétrine-1 est une protéine impliquée dans la migration neuronale mais aussi non neuronale. Dans ce contexte, nous décrypterons les différentes voies de signalisation faisant intervenir la Nétrine-1 et l'un de ses récepteurs: DCC (Deleted in Colorectal Cancer).

Dans un troisième chapitre, nous nous intéresserons au rôle de facteur de survie neuronale de la Nétrine-1. En effet, nous verrons que certains récepteurs de la Nétrine-1 appartiennent à la famille des récepteurs à dépendance (DRs). Ces récepteurs présentent la capacité de ne pas être inactifs en absence de leur ligand. En effet, ils vont déclencher une signalisation pro-apoptotique qui va conduire à l'élimination de la cellule. De la sorte, une cellule qui exprime un tel récepteur est dépendante pour sa survie de la présence de son ligand.

Dans la deuxième partie de ce mémoire seront présentés les résultats scientifiques obtenus pendant cette thèse. Ces travaux décrivent essentiellement *via* l'utilisation du modèle des neurones commissuraux spinaux de souris, le rôle de la Nétrine-1 en tant que facteur de guidage d'une part, et facteur de survie d'autre part.

Enfin, ces résultats seront discutés dans la troisième partie où l'on verra notamment que cette apparente dualité de fonction de la Nétrine-1 peut être envisagée sous la forme

d'une théorie intégrative quand on considère les interconnexions entre le rôle de facteur de guidage et celui de facteur de survie.

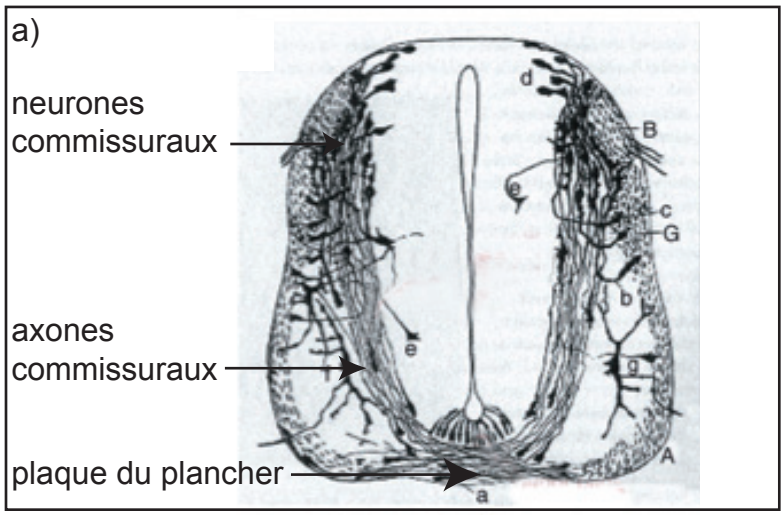


Figure 1 : A la découverte du chimiotropisme.
La figure (a) reproduit un dessin de Ramon y Cajal qui représente une coupe transversale de moelle épinière d'embryon de poulet à E4. De cette observation Ramon y Cajal proposa que les neurones commissuraux projettent leurs axones en direction ventrale en réponse à la secrétion de molécules par les cellules de la plaque du plancher. (Adaptée de Dickson & Zou, 2010, CSHL)
La figure (b) représente une co-culture de la région dorsale et de la plaque du plancher de la moelle épinière dans une matrice de collagène. Cette expérience suggère que la plaque du plancher, **F**, sécrète une molécule diffusible capable d'attirer les neurones commissuraux situés dans la partie dorsale de la moelle épinière,**R**. (Adaptée de Tessier-Lavigne, 1988, Nature)

1 La Nétrine-1 et ses récepteurs

Au cours de ce premier chapitre, nous allons nous attacher à présenter la famille des Nétrines et plus particulièrement la Nétrine-1. Nous verrons que la Nétrine-1 est une protéine qui participe au développement du SNC, mais aussi à celui de nombreux autres organes. Enfin, nous présenterons les récepteurs à la Nétrine-1. L'ensemble de ces données nous permettra de pouvoir par la suite décrire plus précisément le rôle de la Nétrine-1 au cours du développement du SNC.

1-1 La Nétrine-1

1-1-1 La découverte de la famille des Nétrines

Les prémices de la neurobiologie furent établies par les travaux de Ramon y Cajal à la fin du XIX^{ème} siècle. En effet, ce dernier découvrit, grâce à l'amélioration de techniques d'histologie, que le système nerveux est composé de milliards de cellules fortement polarisées, les neurones. De l'ensemble de ses observations, Ramon y Cajal proposa que le cône de croissance, qu'il identifia sur des cerveaux en développement, naviguait suivant un trajet stéréotypé en réponse à un gradient de molécules chimioattractives produites par une cible intermédiaire ou finale, jetant ainsi les bases du chimiotropisme (figure 1 a). Le modèle des neurones commissuraux représenté dans la figure 1-a sera explicité dans le paragraphe 2-1-1.

Il aura toutefois fallu attendre les années 1980 pour avoir la démonstration de l'existence du chimiotropisme. Dans un premier temps, Gundersen et Barret démontrèrent en 1979 qu'*in vitro,* du NGF (Nerve Growth Factor) peut réorienter les axones sensoriels en direction d'une source de ce facteur neurotrophique(Gundersen and Barrett, 1979). Cependant à ce jour, l'activité chimioattractive du NGF *in vivo* n'a toujours pas été confirmée. Ensuite, l'existence du chimiotropisme *in vivo* fut d'abord démontrée au cours du développement du Système Nerveux Périphérique (SNP)(Lumsden and Davies, 1986), puis dans le Système Nerveux Central (SNC)(Tessier-Lavigne et al., 1988). En effet, le groupe de Thomas Jessell utilisa le modèle des neurones commissuraux spinaux de rats, dont le corps cellulaire est localisé dans la région dorsale de la Moelle Epinière (ME). Ces neurones projettent leur axone en direction de la plaque du plancher, structure ventrale de la ME composée de cellules neuro-épithéliales (figure

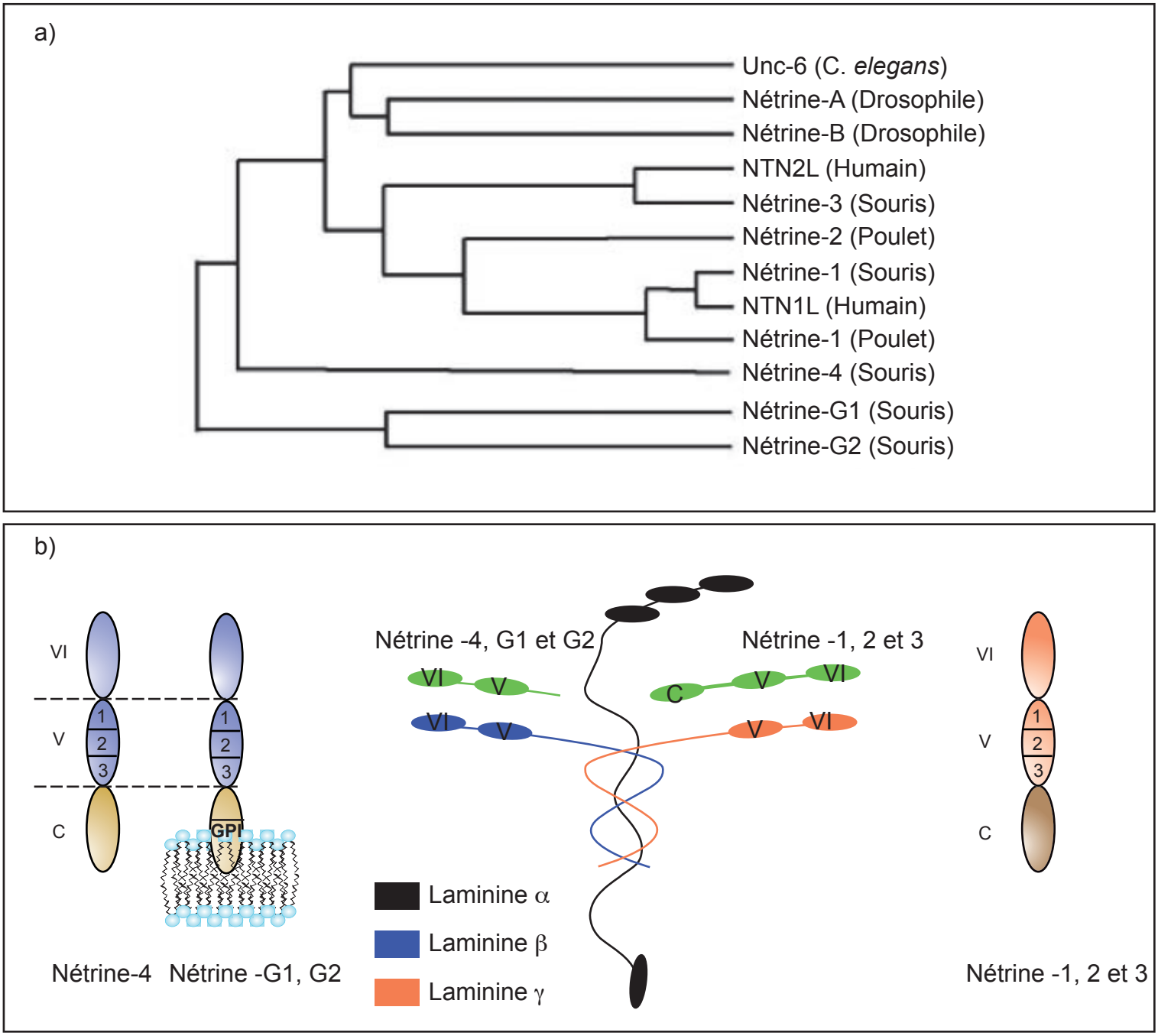


Figure 2 : la famille des Nétrines
(a) Arbre phylogénétique de la famillle des Nétrines (Adapté de Nakashiba et *al*, 2002)
(b) Organisation structurale des nétrines.
Les Nétrines possèdent 3 domaines structuraux: un domaine VI, un domaine V et un domaine C. Les domaines VI et V des Nétrines -1, -2 et -3 sont homologues aux domaines VI et V de la chaine γ des lamininines. En revanche, les domaines VI et V des Nétrine -G1, -G2 et -4 sont homologues aux domaines VI et V de la chaine β des laminines. Le domaine V des Nétrines possède trois répétitions EGF. Contrairement aux autres Nétrines, les Nétrines -G1 et -G2 sont liées à la membrane *via* une ancre GPI.

1 a). Grace à une expérience élégante, ils démontrèrent que les cellules de la plaque du plancher sécrètent un facteur diffusible capable d'influencer la croissance et l'orientation des axones commissuraux(Placzek et al., 1990; Tessier-Lavigne et al., 1988)(figure 1 b).

Parallèlement à ces études chez les Vertébrés, le groupe d'Edward Hedgecock réalisa un crible génétique chez *Caenorhabditis elegans* qui permit l'identification du gène *Unc-6* (Uncoordinated-6), codant pour une protéine homologue aux laminines(Ishii et al., 1992), impliquée dans la migration des axones pionniers dorsaux et ventraux(Hedgecock et al., 1990). Dans le même temps à partir de milliers de cerveaux embryonnaires de poulet, le groupe de Marc Tessier-Lavigne purifia et clona deux protéines homologues à Unc-6, la Nétrine-1 et la Nétrine-2, du sanskrit *netr* « Celui qui guide », capables de promouvoir la croissance des axones commissuraux(Serafini et al., 1994). Ces études permirent donc l'identification du premier facteur de guidage axonal appartenant à la famille des Nétrines.

1-1-2 Evolution et structure des Nétrines

Depuis la découverte des Nétrines chez *C. elegans*(Ishii et al., 1992), la pléthore d'études qui leurs sont consacrées, démontre clairement la conservation de certaines fonctions des Nétrines au cours de l'évolution des animaux à symétrie bilatérale. En particulier, les Nétrines jouent un rôle majeur au cours du développement du SNC en guidant les axones vers la ligne médiane. Cette conservation de fonction se retrouve également au niveau de la structure comme l'illustre les études qui permirent en particulier d'identifier des orthologues de Unc-6, d'une part chez les Invertébrés comme la drosophile (Nétrine A/B)(Harris et al., 1996), la sangsue (Nétrine)(Gan et al., 1999) et même chez l'anémone de mer (Nv nétrine)(Matus et al., 2006) qui présente les prémices de la bilatéralité. D'autre part, l'étude des Nétrines chez les Vertébrés démontra qu'elles appartiennent à une famille multigénique. En effet, les Nétrines -1a, -1b, -2 et -4 ont été identifiées chez le poisson zèbre(Park et al., 2005). Chez le poulet, les Nétrines-1 et -2 (Serafini et al., 1994)ainsi que la Nétrine-4 furent décrites, alors que chez le xénope, seule la Nétrine-1 fut identifiée(de la Torre et al., 1997). Chez la souris, le rat et l'homme, les Nétrines -1, NTN2L/ -3, -4, -G1 et –G2 sont décrites(Nakashiba et al., 2002) (figure 2 a).

Les Nétrines sont des protéines secrétées de 60-80 kDa à l'exception des Nétrines -G1 et -G2 qui sont attachées à la membrane *via* une ancre GlycosylPhosphatidylInositol (GPI) à leur extrémité C-terminale.

Les Nétrines sont composées d'un peptide signal et de trois domaines distincts, deux domaines homologues aux laminines appelés domaine VI et domaine V, et le domaine C (figure 2 b).

Les domaine VI et V des Nétrines sont respectivement homologues aux domaines VI d'une part et V-1, 2 et 3 de la chaine b2 des laminines d'autre part(Harris et al., 1996; Ishii et al., 1992; Serafini et al., 1994). Toutefois, concernant les Nétrines G1, G2 et -4, il semble que ces mêmes domaines soient homologues à la chaine b1 des laminines(Nakashiba et al., 2000; Nakashiba et al., 2002; Yin et al., 2000). Plus en détail, la superfamille des laminines est constituée de protéines hétérotrimériques composées par les sous-unités A (α), B1 (β) et B2 (γ) (figure 2 b)(Ishii et al., 1992). Ces sous-unités présentent six domaines. A partir du N-ter, le domaine VI est un domaine globulaire formant un bras court. Les domaines V jusqu'à III forment aussi un bras court avec des répétitions de régions riches en cystéines rappelant le motif EGF (Epidermal growth Factor), notamment pour les domaines V et III. Par exemple, le domaine V présente cinq répétitions EGF appelées : V-1, V-2, V-3, V-4 et V-5. Les domaines V et III sont interrompus par un domaine globulaire, le domaine IV. Quant aux domaines I et II, ils forment une hélice α qui constitue une super hélice lors de l'assemblage des trois sous-unités *via* des ponts disulfures. (figure 2 b)

Pour en revenir à la structure modulaire des Nétrines, leur domaine C, aussi appelé module NTR (NeTRin), est riche en acides aminés basiques et présente plusieurs homologies. C'est le cas en particulier avec les protéines du complément C3, C4, C5 et avec le domaine N-terminal de la protéine TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProtease)(Banyai and Patthy, 1999). D'autre part, le domaine C contient le motif RGD (Arginine- Glycine- Acide Aspartique) qui est une séquence de reconnaissance pour plusieurs membres de la famille des intégrines(Serafini et al., 1994). Cependant, les Nétrines G1 et G2 ne présentent pas ces homologies et ont un domaine C riche en acides aminés hydrophobes(Nakashiba et al., 2000; Nakashiba et al., 2002). En outre, elles ne reconnaissent pas les récepteurs classiques des Nétrines. La Nétrine-G1 par exemple, se lie à une protéine transmembranaire, NGL-1 (Netrin-G1 Ligand) contenant des séquences LRR (Leucine rich Region) et des domaines immunoglobulines(Lin et al.,

2003).

Les Nétrines sont des protéines dont l'une des fonctions principales, à savoir le guidage axonal, semble avoir été conservée au cours de l'évolution. Mais avec la complexification des organismes, nous allons voir que les Nétrines participent aussi au développement d'autres organes apparus avec l'évolution, comme, par exemple, les organes branchés.

1-1-3 Rôles de la Nétrine-1

Au cours du développement, la Nétrine-1 a plusieurs rôles. Elle fut initialement découverte comme étant capable de favoriser la croissance et l'orientation axonale dans le SNC(Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). En particulier, elle fut décrite comme une molécule chimioattractive (*ie*. capable d'attirer les axones)(de la Torre et al., 1997; Serafini et al., 1996) notamment au niveau de la ligne médiane lors de la formation de nombreuses commissures. Néanmoins, elle fut identifiée un peu plus tard comme une molécule chimiorépulsive (*ie*. capable de repousser les axones), notamment pour les neurones trochléaires et les DRGs (Dorsal Root Ganglion)(Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995a; Masuda et al., 2008). Outre son rôle dans le guidage axonal, la Nétrine-1 fut décrite comme étant également impliquée dans la migration neuronale, par exemple lors du trajet vers la ligne médiane de neurones précérébelleux comme ceux du pont ou de l'olive inférieure(Bloch-Gallego et al., 1999; Serafini et al., 1996). Le rôle de la Nétrine-1 au cours du développement du SNC sera détaillé plus précisément au cours du chapitre 2. Par ailleurs chez l'adulte, la Nétrine-1 pourrait prévenir la régénération axonale après une lésion du SNC(Wehrle et al., 2005).

En dehors de sa participation à la mise en place du développement du SNC, la Nétrine-1 est également décrite comme étant impliquée dans la morphogenèse des organes branchés. Par exemple, lors de la mise en place de la glande mammaire, la Nétrine-1 faciliterait l'agrégation cellulaire. En l'occurrence, la Nétrine-1 stabiliserait l'adhésion de certaines couches cellulaires entres-elles, maintenant ainsi l'organisation structurale de la glande mammaire(Srinivasan et al., 2003). De plus, la Nétrine-1 favoriserait la différenciation fonctionnelle de la glande mammaire en vue de la lactation(Strizzi et al., 2008). La Nétrine-1 est aussi impliquée dans la morphogenèse du poumon où elle module la croissance et la forme des bourgeons épithéliaux émergents(Liu et al., 2004b). D'autre part, la Nétrine-1 participe à la migration et à l'adhésion des progéniteurs pancréatiques(Yebra et al., 2003).

Plus récemment, le rôle des facteurs de guidage neuronal au cours de l'angiogenèse a émergé. Si la Nétrine-1 fut identifiée comme étant impliquée dans ce processus, son rôle est toutefois controversé. En effet, le groupe de Dean Ly propose que la Nétrine-1 serait un facteur pro-angiogénique(Park et al., 2004), alors que le groupe de Anne Eichmann suggère qu'elle serait au contraire anti-angiogénique(Lu et al., 2004). Toutefois, il semblerait que ces résultats contradictoires puissent s'expliquer par la concentration de Nétrine-1 utilisée lors des protocoles expérimentaux. En effet, une étude montre qu'à faible concentration la Nétrine-1 est pro-angiogénique, tandis qu'à forte concentration, elle est anti-angiogénique(Yang et al., 2007).

Le développement du SNC ou la morphogenèse des organes branchés, mais aussi l'angiogenèse, sont donc des mécanismes qui requièrent des informations extracellulaires de guidage. En ce sens, la Nétrine-1, initialement décrite comme un facteur de guidage axonal, module l'adhésion et la migration cellulaire au cours de ces différents processus.

Cependant d'autres mécanismes cellulaires sont également influencés par la Nétrine-1. C'est par exemple le cas de la prolifération cellulaire que la Nétrine-1 stimule au cours du développement de l'oreille interne(Salminen et al., 2000).

Outre l'ensemble de ces activités, la Nétrine-1 présente aussi une activité de facteur de survie, liée en particulier à son statut de ligand de récepteur à dépendance. Celle-ci sera approfondie dans le chapitre 3 et on verra par exemple qu'elle peut fournir une autre explication aux rôles contradictoires de la Nétrine-1 dans l'angiogenèse.

1-1-4 Le patron d'expression de la Nétrine-1

La Nétrine-1 est fortement exprimée au cours du développement, notamment dans le SNC, mais aussi dans d'autres structures. Nous détaillerons ici plus particulièrement les patrons d'expression se rapportant aux structures ayant servi de modèles expérimentaux au cours de cette thèse.

1-1-4-1 Système nerveux central

1-1-4-1-1 La moelle épinière

Chez les Vertébrés, la Nétrine-1 est principalement exprimée au niveau de la ligne médiane par une population de cellules gliales : les cellules de la plaque du plancher(Kennedy et al., 1994), où elle joue un rôle majeur dans l'établissement des projections dorso-ventrales(Serafini et al., 1996). Chez la souris, la Nétrine-1 commence à être exprimée à E9.5 par les cellules de la plaque du plancher, de manière concomitante avec le début des projections commissurales. A la ligne médiane, le niveau d'expression de la Nétrine-1 perdure jusqu'à ce que les projections commissurales atteignent la ligne médiane à E11.5 et diminue ensuite jusqu'à la naissance. Il devient alors rapidement indétectable(Livesey and Hunt, 1997). Chez la souris entre E9.5 et E11.5, l'expression de la Nétrine-1 s'étend aux 2/3 ventraux de la région ventriculaire(Serafini et al., 1996). En revanche chez le poulet, la Nétrine-1 est exprimée par la plaque du plancher, tandis que la Nétrine-2 s'exprime plus faiblement dans les 2/3 ventraux(Kennedy et al., 1994).

Outre son expression à la ligne médiane, la Nétrine-1 est légèrement exprimée entre E12.5 et E13.5 à proximité de la zone d'entrée de la racine dorsale (DREZ)(Watanabe et al., 2006).

D'autre part, la Nétrine-1 est largement exprimée par les neurones et les oligodendrocytes de la moelle épinière de rat adulte où elle est associée aux membranes et à la matrice extracellulaire(Manitt et al., 2001). Dans ce cas, la Nétrine-1 semble jouer un rôle dans la maintenance de l'interaction entre les axones et les oligodendrocytes.

1-1-4-1-2 Dans les autres régions du SNC

Tout au long du développement, la Nétrine-1 est présente dans diverses régions du cerveau embryonnaire(Livesey and Hunt, 1997). C'est le cas au niveau des cellules du plancher du ventricule latéral, puis ensuite de l'éminence ganglionnaire où se développent les neurones qui migreront dans le striatum. De plus, la Nétrine-1 est exprimée dans la région présomptive du striatum(Livesey and Hunt, 1997). La Nétrine-1 s'exprime également dans le plancher du mésencéphale de part et d'autre de la ligne médiane, région correspondant à la substance noire et au tegmentum ventral(Livesey and Hunt, 1997). Au niveau du quatrième ventricule, la Nétrine-1 est exprimée par la

région superficielle du plancher incluant la plaque du plancher. Au cours du développement du cervelet, la Nétrine-1 est exprimée par la couche externe des cellules granulaires(Livesey and Hunt, 1997).

D'autre part, la Nétrine-1 s'exprime au niveau du disque optique(Deiner et al., 1997) et au niveau du tractus olfactif(Kawasaki et al., 2006). Elle est aussi exprimée dans la vésicule otique au cours de la mise en place des canaux semi-circulaires de l'oreille interne(Salminen et al., 2000).

Dans le SNC adulte, la Nétrine-1 est plus faiblement exprimée que lors du développement, notamment dans la région du striatum(Shatzmiller et al., 2008), au niveau de la substance noire(Livesey and Hunt, 1997), par les cellules ganglionnaires rétiniennes(Ellezam et al., 2001). On constate aussi que la Nétrine-1 est exprimée par les oligodendrocytes de la moelle épinière adulte(Manitt et al., 2001) ; l'ensemble de ces résultats suggérant que la persistance à l'état adulte d'un niveau significatif de Nétrine-1 pourrait participer à la maintenance et à la plasticité des connections dans le cerveau.

1-1-4-2 A l'extérieur du SNC

La Nétrine-1 est aussi présente dans un modèle classique d'étude du système nerveux périphérique ; à savoir le nerf sciatique, où on la retrouve exprimée chez l'adulte par les cellules de Schwann(Madison et al., 2000).

Comme décrit précédemment, la Nétrine-1 participe aussi à la morphogenèse de certains organes branchés. En effet, la Nétrine-1 est exprimée par les cellules épithéliales pulmonaires(Liu et al., 2004b), par les cellules pré-lumenales de la glande mammaire(Srinivasan et al., 2003) et les cellules de l'épithélium pancréatique(Yebra et al., 2003). Chez l'adulte, la Nétrine-1 est exprimée dans de nombreux organes comme le rein, le cœur, le foie, l'intestin grêle, le colon, les ovaires, le muscle squelettique…(Kennedy et al., 1994; Meyerhardt et al., 1999).

1-1-5-La Nétrine-1, une molécule diffusible

Les travaux initiaux qui aboutirent à l'identification de la Nétrine-1, suggéraient qu'il existait un facteur tropique diffusible capable de diriger la croissance axonale(Tessier-Lavigne et al., 1988). En effet, il fut démontré que la Nétrine-1 diffuse dans une matrice de collagène, puisqu'une source ectopique de Nétrine-1, disposée au

maximum à 250 μm, est capable de réorienter la croissance d'axones commissuraux(Kennedy et al., 1994). En revanche, un explant de plaque du plancher est lui capable de réorienter cette croissance à une distance de 330 μm, suggérant ainsi que d'autres facteurs pourraient aussi être impliqués, comme le NSA (Netrin Synergizing Activity)(Serafini et al., 1994). D'autre part, la quantité de Nétrine-1 semble importante puisque une concentration de Nétrine-1 supérieure à 125 ng/ml inhibe la croissance axonale(Serafini et al., 1994).

Néanmoins, il n'existait aucune preuve directe de l'existence *in vivo* du gradient de nétrine-1 jusqu'en 2006 où le groupe de Marc Tessier-Lavigne démontra la présence d'un gradient ventro-dorsal de Nétrine-1 s'étendant sur les 2/3 ventraux du tube neural embryonnaire de poulets et de souris (Kennedy et al., 2006).

Outre son action à longue distance, la Nétrine-1 joue aussi un rôle à courte distance. En ce sens, la matrice extracellulaire (MEC) est composée d'un éventail de molécules capables d'interagir avec et de piéger la Nétrine-1. C'est par exemple le cas de l'héparine, une molécule très présente à la surface cellulaire, *via* son extrémité C-terminale riche en acides aminés basiques(Kappler et al., 2000). D'autre part, le domaine VI de la Nétrine-1 pourrait participer à son oligomérisation, voir à son hétéro-oligomérisation avec les laminines présentes dans la MEC empêchant de la sorte sa libre diffusion(Serafini et al., 1994). Ainsi, une étude menée chez la drosophile démontre que l'invalidation des *nétrines -A* et *–B* ne perturbe pas l'attraction à la ligne médiane des axones commissuraux, mais les empêche de la franchir (Brankatschk and Dickson, 2006). En outre, cette étude montre que l'expression d'une Nétrine-B ancrée à la membrane restaure le franchissement de la ligne médiane par les axones commissuraux(Brankatschk and Dickson, 2006). Ceci suggère donc que chez la drosophile, les Nétrines joueraient un rôle à courte plutôt qu'à longue distance. Ce rôle à courte distance a également été proposé dans la moelle épinière adulte où elles pourraient participer au maintien des interactions neurones/cellules gliales(Manitt et al., 2001).

1-2 Les récepteurs à la Nétrine-1

La recherche de récepteurs à la Nétrine-1 fut initiée avant même que la Nétrine-1 ne soit elle-même identifiée. En effet, l'analyse chez *C. eIegans* des mutants invalidés

pour *unc-6*, *unc-5* et *unc-40* suggérait que ces trois gènes étaient impliqués dans la même voie puisque leurs invalidations conduisaient à l'observation de phénotypes similaires(Hedgecock et al., 1990). En effet, le gène *unc-5* est impliqué dans la migration circonférentielle en direction dorsale, *unc-40* dans la migration en direction ventrale, et *unc-6* à la fois dans ces deux types de migration(Hedgecock et al., 1990). *Unc-5* et *unc-40* furent caractérisés par la suite: ils codent pour deux récepteurs transmembranaires de type 1 (*ie* possédant un seul domaine transmembranaire et ayant leur extrémité N-ter localisée à l'extérieur de la cellule), exprimés par les neurones qui projettent leurs axones en réponse à Unc-6(Chan et al., 1996; Leung-Hagesteijn et al., 1992). Par ailleurs, *unc-5* et *unc-40* possèdent des orthologues chez les mammifères, respectivement les récepteurs appartenant à la famille Unc-5h et le récepteur DCC (Deleted in Colorectal Cancer)(Keino-Masu et al., 1996; Leonardo et al., 1997). Le récepteur Unc-40 est décrit comme étant impliqué dans la migration dorso-ventrale (*ie.* attraction vers Unc-6), alors que Unc-5 participe à la migration ventro-dorsale (*ie.* répulsion par Unc-6)(Leung-Hagesteijn et al., 1992). De plus, Unc-40 est requis lors de la répulsion par Unc-5, puisque l'expression ectopique de Unc-5 par des neurones qui expriment Unc-40 suffit à convertir l'attraction en répulsion(Chan et al., 1996; Hamelin et al., 1993).

Enfin, la recherche de nouveaux récepteurs à la Nétrine-1 permit l'identification des récepteurs néogénine, A2b (récepteur à l'adénosine), intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$, et plus récemment de DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule) et APP (Amyloid-β Precursor Protein).

1-2-1 DCC et néogénine

1-2-1-1 DCC

Au début des années 1990, Fearon *et coll* décrivirent que 70% des cancers colorectaux présentaient sur la région du chromosome 18q une perte d'hétérozygotie (LOH)(Fearon et al., 1990), mécanisme connu pour participer à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. L'analyse de cette région permit l'identification du gène *DCC* (Deleted in Colorectal Cancer) qui fut ainsi proposé comme étant un gène suppresseur de tumeur(Fearon et al., 1990).

DCC est codé par un gène de 1,4 millions de bases, présentant 29 exons(Cho et al., 1994). Ce gène produit à l'issue d'un épissage alternatif des isoformes d'environ 180 kDa pouvant subir des modifications post-traductionnelles(Reale et al., 1994). Chez l'homme,

l'isoforme majoritaire de DCC présente 1446 acides aminés. DCC est une protéine transmembranaire de type 1 avec un grand domaine extracellulaire d'environ 1100 acides aminés, suivi d'un domaine transmembranaire, puis d'un domaine intracellulaire de 325 acides aminés(Reale et al., 1994). Le domaine extracellulaire est composé de quatre domaines immunoglobuline, suivis de six domaines fibronectine de type III (figure 3). Il présente donc une forte homologie avec les molécules d'adhésion cellulaire neuronale (N-CAM), L1, Tag-1 (Transient axonal glycoprotein-1)(Vielmetter et al., 1994). Concernant le domaine intracellulaire, il ne présente pas d'homologie évidente. Toutefois, il semble que trois courts motifs (appelés P1, P2 et P3) soient conservés au cours de l'évolution(Kolodziej et al., 1996) et soient fonctionnellement importants(Hong et al., 1999; Stein et al., 2001).

DCC est conservé au cours de l'évolution. On retrouve des orthologues chez *C. elegans* (*unc-40*)(Chan et al., 1996), la drosophile (*frazzled*)(Kolodziej et al., 1996) et le xénope (*DCC*)(Pierceall et al., 1994). De plus, DCC s'apparente à une protéine structurellement proche: la néogénine(Vielmetter et al., 1994).

DCC fut identifié comme récepteur à la Nétrine-1 par trois approches différentes. Tout d'abord chez *C. elegans*, les auteurs ont démontré que Unc-40 est homologue à DCC et qu'il est exprimé par les cellules en migration ou par les neurones qui projettent leurs axones en réponse à Unc-6(Chan et al., 1996). Ensuite, Kolodzeij et *col.* ont démontré que Frazzled est l'homologue de DCC chez la drosophile et qu'il est exprimé par les neurones commissuraux. Cette expression est essentielle pour que les axones commissuraux atteignent la ligne médiane en réponse aux Nétrines -A et –B(Kolodziej et al., 1996). Enfin, le groupe de Marc Tessier-Lavigne a démontré que DCC lie la Nétrine-1 avec un Kd d'environ 10 nM(Keino-Masu et al., 1996). Ces mêmes travaux mirent aussi en évidence que chez le rat, les neurones commissuraux expriment DCC, et que sur des explants de moelle épinière dorsale, l'ajout simultané de Nétrine-1 et d'un anticorps bloquant l'interaction DCC/Nétrine-1 abolit la croissance des axones commissuraux habituellement observée en réponse à la Nétrine-1(Keino-Masu et al., 1996). Ce résultat démontre donc que l'effet de la Nétrine-1 sur la croissance des axones commissuraux est médié par DCC.

Des études ont ensuite cherché à déterminer les régions d'interaction entre DCC et la Nétrine-1. Une première étude en 2003 a proposé que DCC interagirait avec la Nétrine-1 *via* son 5ème domaine fibronectine(Geisbrecht et al., 2003). Plus précisément, cette

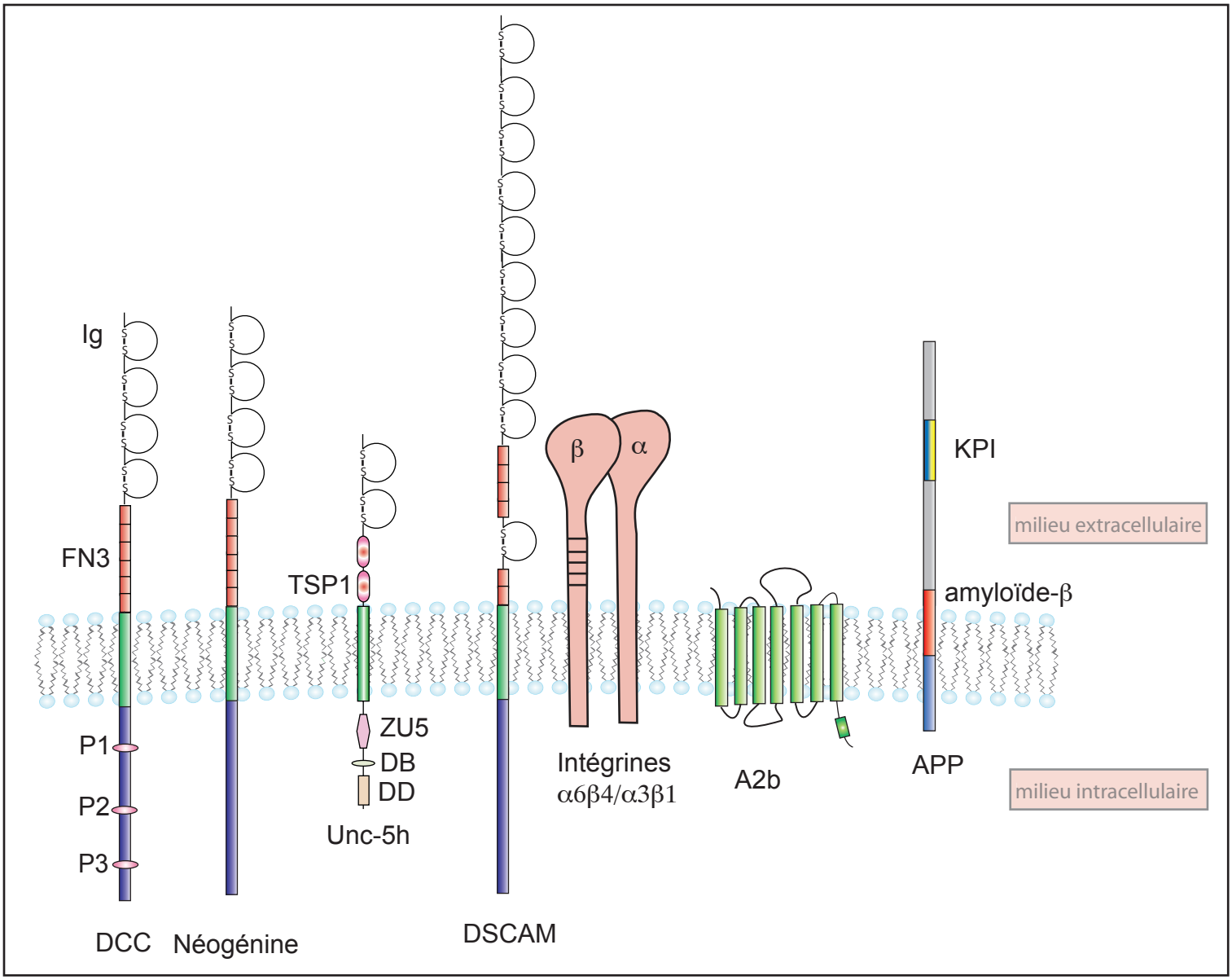


Figure 3 : Les récepteurs à la Nétrine-1

- DCC présente dans son domaine extracellulaire quatre domaines immunoglobuline, suivis de 6 domaines fibronectine de type III, puis un domaine transmembranaire suivi d'un domaine intracellulaire avec trois régions conservées P1, P2 et P3. La néogénine présente la même organisation extracellulaire que DCC, sans homologie dans son domaine intracellulaire.
- Les récepteurs appartenant à la famille Unc5h présentent dans leur domaine extracellulaire deux domaines immunoglobuline suivis par deux domaines thrombospondine. Dans leur domaine intracelullaire, ils possèdent un domaine ZU5, un domaine DB (DCC Binding Protein) et un domaine de mort (Death domain-DD)
- DSCAM possède un grand domaine extracellulaire avec neuf domaines immunoglobuline, suivi de 6 domaines fibronectine de type III interrompus entre le domaine 4 et 5 par un dixième domaine immunoglobuline. Le domaine intracellulaire de DSCAM ne présente pas d'homologie particulière.
- Les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$ sont composées de deux sous-unités: α et β. La sous unité β présente une succession de régions riches en cystéines.
- A2b est un récepteur transmembranaire sans domaine d'homologie particulier. Il est constitué de sept domaines transmembranaires connectés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires.

APP est un récepteur transmembranaire possédant dans son domaine extracellulaire un domaine KPI (Kunitz type Protease Inhibitor) et un domaine correspondant au peptide amyloïde-β.

interaction serait médiée par une boucle de onze acides aminés préalablement décrite comme interagissant avec l'héparine(Bennett et al., 1997). Toutefois, une seconde étude en 2004 identifia uniquement le 4ème domaine fibronectine de DCC comme domaine d'interaction avec la Nétrine-1(Kruger et al., 2004). Cette différence peut éventuellement s'expliquer par l'utilisation de techniques différentes. Au laboratoire grâce à des tests ELISA, nous avons observé que le 4ième ou le 5ième domaine fibronectine interagissent avec la Nétrine-1. D'autre part, la liaison de DCC avec les héparines pourrait stabiliser la liaison avec la Nétrine-1(Bennett et al., 1997).

Au cours du développement du SNC de la souris, DCC est fortement exprimé par la majorité des neurones post-mitotiques. Son patron d'expression spatio-temporelle dans différentes régions du SNC au cours du développement est résumé dans la figure 4. Il faut noter qu'à l'exception du ganglion sympathique cervical supérieur, DCC ne s'exprime jamais dans le système nerveux périphérique. Enfin, DCC est exprimé par les cellules des crêtes neurales et participe à leur migration de l'intestin vers le pancréas(Jiang et al., 2003).

Chez l'adulte, DCC est exprimé par des neurones dopaminergiques de la substance noire(Osborne et al., 2005), mais aussi dans les régions où perdurent de la neurogenèse, comme dans le bulbe olfactif, le cervelet et l'hippocampe(Gad et al., 1997).

Enfin, DCC s'exprime aussi dans des régions non neurales comme par exemple dans le futur cartilage, au niveau du système urogénital, dans l'intestin et le poumon (figure 4).

1-2-1-2 Néogénine

Le récepteur Néogénine fut identifié lors d'un crible de molécules membranaires présentes à la surface du tectum de poulet(Vielmetter et al., 1994). Ce nom lui fut attribué car ce récepteur est toujours exprimé par des tissus nouvellement formés. Les auteurs ont isolé un ADNc de 4326 pb qui code pour un récepteur transmembranaire de type 1 de 1442 acides aminés. Son domaine extracellulaire possède quatre domaines immunoglobuline, six domaines fibronectine de type 3 (figure 3), et huit sites putatifs de glycosylation. Le domaine intracellulaire de la Néogénine possède 331 acides aminés et ne présente pas d'homologie particulière de structure. La taille du domaine intracellulaire peut varier car la Néogénine possède des variants d'épissage uniquement dans son domaine intracellulaire(Vielmetter et al., 1994).

Contrairement à DCC, l'expression de la Néogénine est faible dans le SNC précoce et augmente au cours du développement (figure 4). En effet, la Néogénine est exprimée dans les régions dites de maturation neuronale (axogenèse et arborisation dendritique), notamment dans la rétine(Gad et al., 2000; Vielmetter et al., 1994), dans le néocortex(Gad et al., 1997), dans le bulbe olfactif, dans l'hypothalamus et le thalamus(Gad et al., 1997). Il est cependant à noter que la Néogénine est exprimée par des cellules souches neuronales dans les régions ventriculaires du mésencéphale, du rhombencépahe(Gad et al., 1997; Keeling et al., 1997), et aussi du tube neural(Keino-Masu et al., 1996). D'autre part, la Néogénine s'exprime bien plus largement que DCC à l'extérieur du SNC. En effet, elle est exprimée dans des tissus d'origine mésodermique comme : le cartilage des bourgeons de membres, les mésentères, les cartilages nasaux, les mâchoires, et les *primordia* dentaires(Gad et al., 1997). Elle est aussi présente dans l'intestin et les glandes mammaires(Gad et al., 1997; Srinivasan et al., 2003). Chez l'adulte, la Néogénine est exprimée de manière ubiquitaire(Meyerhardt et al., 1999).
La Néogénine est une protéine homologue à DCC(Vielmetter et al., 1994) retrouvée chez les Vertébrés, notamment chez le rat(Keino-Masu et al., 1996), la souris(Keeling et al., 1997) et chez l'Homme(Meyerhardt et al., 1997). *Dcc* et *néogénine* semblent avoir divergé à partir d'un unique gène ancestral, puisque chez *C. elegans*, leur seul homologue commun est *unc-40*. De plus, la complémentarité d'expression de DCC et Néogénine chez la souris suggère que DCC « s'est spécialisé » dans les étapes précoces du développement du SNC, alors que la Néogénine participerait aux étapes plus tardives.

Outre son homologie de structure et sa complémentarité d'expression avec DCC, la Néogénine est aussi capable de lier la Nétrine-1(Keino-Masu et al., 1996), ainsi que d'autres protéines impliquées dans le guidage axonal comme RGM (repulsive guidance molecule)(Rajagopalan et al., 2004). Cette molécule, liée à la membrane par une ancre GPI a été initialement décrite comme un facteur de guidage répulsif pour les axones rétiniens de poulet(Monnier et al., 2002). Chez la souris, trois orthologues ont été identifiés: RGM-a, -b et –c. Ces protéines sont également impliquées dans la fermeture du tube neural(Niederkofler et al., 2004). La Néogénine se lie à RGM avec un Kd de 230 pM, alors qu'elle se lie à la Nétrine-1 avec un Kd de 2 nM. RGM et la Nétrine-1 pourraient donc être en compétition pour interagir avec la Néogénine, mais il semble que l'ajout de Nétrine-1 en excès ne modifie pas le Kd de RGM pour la Néogénine(Rajagopalan et al.,

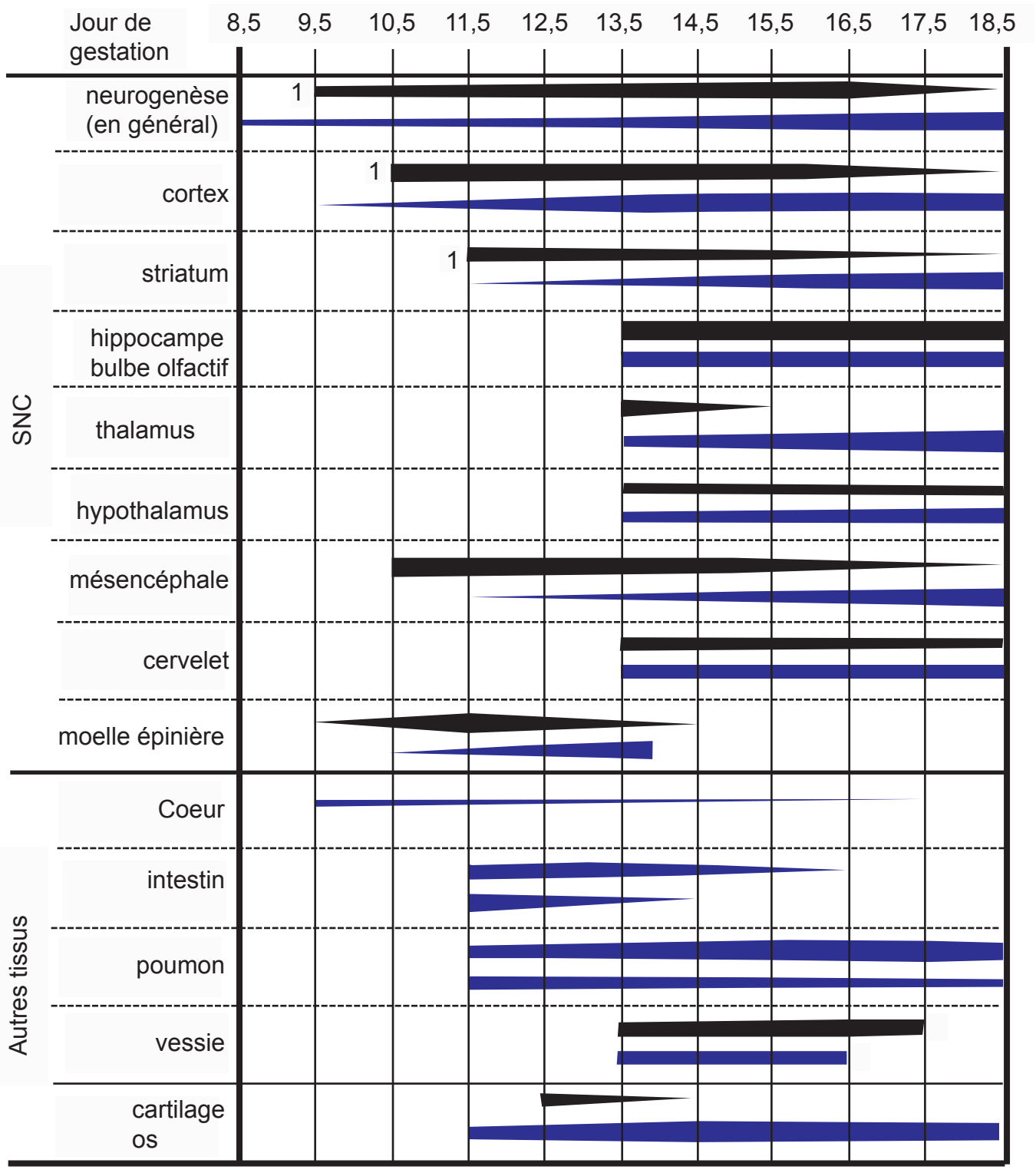


Figure 4: Représentation schématique du patron d'expression chez la souris de l'ARNm de DCC ■ et de l'ARNm de néogénine ■ entre E8,5 et E18,5 dans et à l'exterieur du SNC. La longueur de la barre indique le temps d'expression et sa largeur l'intensité d'expression.
(1) indique que l'expression n'est pas localisée dans les région ventriculaire. m: mésenchyme, e: épithélium. (Adaptée de Gad et *al*, 1997)

2004). Il est toutefois possible qu'il existe une interaction fonctionnelle entre Nétrine-1 et RGM lors de l'interaction avec la Néogénine.

1-2-2 La famille des récepteurs Unc5

Les récepteurs appartenant à la famille Unc5 furent initialement identifiés chez *C. elegans*. En effet, l'observation d'un phénotype mutant caractérisé par des défauts de migration ventro-dorsale permit l'identification du gène *unc5* et son clonage(Leung-Hagesteijn et al., 1992). D'autres études permirent l'identification d'orthologues chez la souris. En effet, Leonardo et Coll. identifièrent Unc5h1 et h2 et Akerman et Coll. Unc5h3(Ackerman et al., 1997; Leonardo et al., 1997). Plus tard, fut décrit Unc5h4(Engelkamp, 2002)et des membres de cette famille furent retrouvés chez les Vertébrés comme le xénope (Anderson and Holt, 2002), le poulet, et le poisson zèbre. Chez l'Homme, ces récepteurs sont respectivement nommés Unc5A, B, C et D.

Les membres de la famille Unc5 sont des récepteurs transmembranaires de type 1. Leurs domaines extracellulaires sont composés de deux domaines immunoglobuline et de deux domaines thrombospondine. Leurs domaines intracellulaires possèdent un domaine ZU5 (Zona occludens-1/Unc5 homology domain), un domaine de mort (DD), un domaine DB (DCC Binding) contenant des motifs PDZ (Post Synaptic Density/Disc large/ Zona occludens-1)(Ackerman et al., 1997; Engelkamp, 2002; Leonardo et al., 1997; Leung-Hagesteijn et al., 1992)(figure 3).

Ces récepteurs sont conservés au cours de l'évolution et doivent probablement dériver d'un ancêtre commun puisque que chez *C. elegans* et la drosophile, il existe seulement Unc5.

Les membres de la famille unc5 sont décrits comme des récepteurs à la Nétrine-1. Unc5h1, 2 et 3 sont effectivement capables de lier la Nétrine-1 *via* leurs domaines immunoglobuline avec des Kd respectifs de 19 ; 3,4 et 6,8 nM(Leonardo et al., 1997). Toutefois, il semble que le domaine IgG2 ait une contribution plus importante lors de l'interaction(Kruger et al., 2004).

En réponse à la Nétrine-1, les récepteurs de la famille unc5 ont une activité répulsive(Ackerman et al., 1997; Hamelin et al., 1993; Leung-Hagesteijn et al., 1992; Przyborski et al., 1998). Cependant dans la plupart des cas étudiés, cette répulsion requiert la présence de DCC(Hong et al., 1999; Keino-Masu et al., 1996), même s'il

semble que plus rarement, comme par exemple lors de la migration des interneurones cérébelleux, cette répulsion puisse être indépendante de DCC(Guijarro et al., 2006).
Les récepteurs Unc5h1 à 3 sont exprimés dans le SNC en développement. En effet, ils sont présents au niveau du cerveau embryonnaire dans la plaque basale du mésencéphale et du rhombencéphale, dans l'hypothalamus, le thalamus, l'hippocampe, le cortex enthorinal, dans la rétine et dans le cervelet. Ils sont aussi exprimés dans le tube neural en développement, notamment par les motoneurones et la plaque du toit(Ackerman et al., 1997; Leonardo et al., 1997). Alors que l'expression de unc5h1 est restreinte au SNC, les récepteurs Unc5h2, 3 et 4 sont aussi exprimés à l'extérieur du SNC, notamment au cours du développement du bourgeon de membre. Unc5h2 et unc5h4 sont aussi respectivement exprimés au cours de la mise en place du système vasculaire et de la glande mammaire(Engelkamp, 2002). De plus chez l'adulte, les récepteurs Unc5h1, 2 et 3 continuent à s'exprimer dans la moelle épinière(Manitt et al., 2004).

1-2-3 DSCAM

DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule) est un récepteur transmembranaire de type 1 qui appartient à la famille des N-CAMs(Yamakawa et al., 1998). Son domaine extracellulaire présente dix domaines immunoglobuline et six domaines fibronectine de type III, tandis que son domaine intracellulaire ne présente pas d'homologie particulière(Yamakawa et al., 1998)(figure 3). DSCAM fut initialement décrit comme contribuant aux déficits cognitifs observés chez les individus affectés de trisomie 21(Yamakawa et al., 1998).
Au cours du développement du SNC, DSCAM est largement exprimé par les neurones en différenciation(Yamakawa et al., 1998). De plus chez la souris, l'identification d'une mutation spontanée invalidant DSCAM mit en lumière la contribution de DSCAM au cours de la navigation axonale(Fuerst et al., 2009; Fuerst et al., 2008). Par ailleurs, le rôle de DSCAM est clairement établi chez la drosophile(Chen et al., 2006; Schmucker et al., 2000; Yamagata and Sanes, 2008)où son invalidation conduit par exemple, à de sévères défauts de guidage au niveau des commissures(Schmucker et al., 2000). Contrairement aux mammifères chez lesquels on a deux paralogues : *DSCAM* et *DSCAM-like1*, chez la drosophile, les DSCAMs sont codés par quatre gènes, dont l'un présente l'étonnante capacité de générer 38016 isoformes par épissage alternatif(Schmucker et al., 2000). Ces isoformes participent à la formation du réseau neuronal pendant le

processus de guidage axonal. En effet, chaque neurone exprime une isoforme spécifique qui interagit de manière homophilique. Cette interaction permet l'auto-évitement (self avoidance) qui est un mécanisme important lors de la formation des synapses, notamment dans le système olfactif(Hattori et al., 2008).

Chez les mammifères, même s'il est capable de se lier de manière homophilique, DSCAM subit peu ou pas d'épissage alternatif, Dans ces conditions, DSCAM ne peut donc pas participer au guidage axonal *via* le mécanisme observé chez la drosophile.

Par ailleurs, deux études réalisées l'une chez la souris et l'autre chez le poulet, ont identifié la Nétrine-1 comme ligand de DSCAM(Liu et al., 2009; Ly et al., 2008). Que ce soit chez la souris ou chez le poulet, la nétrine-1 se lie à DSCAM *via* les domaines IgG 7 à 9 avec un Kd proche de celui observé pour DCC. En outre, ces deux études montrent *in vivo* l'importance de DSCAM lors du guidage des axones commissuraux à la ligne médiane en réponse à la Nétrine-1. En effet, le knock-down de DSCAM conduit à des défauts d'attraction et de franchissement de la ligne médiane par les axones commissuraux.

1-2-4 Les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$

Les intégrines sont des protéines hétérodimériques composées d'une sous-unité α, d'une masse moléculaire allant de 120 à 180 kDa, et d'une sous unité β de 90 à 110 kDa(Hynes, 1992)(figure 3). Ces molécules sont capables de reconnaître des composants de la matrice extracellulaire et de transduire à la cellule un signal d'adhésion, de migration, et/ou de prolifération(Hynes, 1992).

Au cours d'une étude où les auteurs investiguaient le rôle de la Nétrine-1 dans le développement du pancréas, il fut observé que les cellules épithéliales pancréatiques étaient capables d'adhérer à la Nétrine-1 se trouvant dans la lame basale, associée à différents composants de la MEC(Yebra et al., 2003). En outre, cette adhésion est médiée par le domaine C de la Nétrine-1 suggérant ainsi que les récepteurs « classiques » de la Nétrine-1 ne sont pas impliqués. Les auteurs identifièrent les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$ comme récepteurs à la Nétrine-1 et démontrèrent aussi que cette interaction favorise la migration des cellules épithéliales pancréatiques. Cependant, il serait intéressant de réaliser des expériences avec des protéines recombinantes pour vérifier que l'interaction intégrines/Nétrine-1 est bien directe.

Par ailleurs, il n'est pas inutile de remarquer que le domaine C de la Nétrine-1 présente des motifs RGD(Serafini et al., 1994). Or, ces motifs sont connus pour interagir avec certaines intégrines(Hynes, 1992).

Plus récemment, une étude montre que l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ participe à la migration tangentielle des interneurones corticaux en réponse à la Nétrine-1 de leur lieu de production l'éminence ganglionnaire, vers le cortex (Stanco et al., 2009). Les auteurs ont montré que l'abolition de l'interaction Nétrine-1/intégrine $\alpha 3\beta 1$ conduit à des défauts de migration de ces interneurones.

D'autre part, les domaines d'interaction de la Nétrine-1 avec DCC et les intégrines étant différents, il est envisageable que l'interaction Nétrine-1/intégrine autorise la formation d'un complexe avec DCC. Ceci pourrait alors aboutir à l'activation renforcée de voies de signalisation communes telles que celles de FAK (Focal Adhesion Kinase) et Fyn(Nikolopoulos and Giancotti, 2005).

1-2-4 Les récepteurs putatifs à la Nétrine-1

D'autres études permirent l'identification de plusieurs récepteurs à la Nétrine-1. Toutefois à ce jour, il existe peu ou pas d'évidences quant au rôle de ces récepteurs en réponse à la Nétrine-1 pendant le développement du SNC.

1-2-4-1-A2b

Le récepteur A2b appartient à la famille des récepteurs à l'adénosine. Ils sont classés selon quatre sous types : A1, A2a, A2b et A3. Ces récepteurs modulent le niveau intracellulaire d'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique), puisque selon le type, ils stimulent ou inhibent l'adénylcyclase(Feoktistov and Biaggioni, 1997). Concernant A2b, il stimule la production d'AMPc.

A2b est un récepteur couplé à la protéine-G de 36-37 kDa qui possède sept domaines transmembranaires connectés par trois domaines extracellulaires et trois domaines intracellulaires, eux-mêmes bordés par un domaine N-ter extracellulaire et un domaine C-ter intracellulaire(Feoktistov and Biaggioni, 1997)(figure 3).

Une étude visant à identifier des partenaires de DCC mit en exergue l'interaction entre DCC et A2b(Corset et al., 2000). Dans cette étude, les auteurs montrent qu'A2b se comporte comme un récepteur à la Nétrine-1. En effet, l'interaction Nétrine-1/A2b, d'un

Kd de 11 nM équivalent à celui de DCC/Nétrine-1(Keino-Masu et al., 1996), stimule la production d'AMPc. En outre, cette voie de signalisation stimule la croissance axonale, puisque l'addition d'un antagoniste de A2b diminue la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1. Cette étude suggère donc que A2b régule le niveaux d'AMPc en réponse à la Nétrine-1, or le niveau d'AMPc joue un rôle majeur dans le guidage axonal puisque selon sa concentration, il peut convertir l'attraction en répulsion(Ming et al., 1997). De plus, A2b pourrait participer à un complexe protéique membranaire faisant intervenir d'autres récepteurs à la Nétrine-1.

Néanmoins, l'étude de Corset et Coll; est controversée. En effet, quelque mois après sa publication, le groupe de Marc Tessier-Lavigne publia que l'activation d'A2b par la Nétrine-1 n'est pas nécessaire à la croissance et l'orientation axonale(Stein et al., 2001). Cette étude sans toutefois exclure l'existence de co-récepteurs, indique que seul DCC est requis afin de favoriser la pousse et l'orientation axonale en réponse à la Nétrine-1.

La différence de résultats entre ces travaux peut vraisemblablement s'expliquer du fait de la source de Nétrine-1 utilisée : des cellules ou des explants dans l'étude de Corset et Coll., *versus* de la Nétrine purifiée pour l'article de Stein et Coll. Dans le premier cas de figure, on obtient une concentration en Nétrine-1 plus physiologique que les doses utilisées dans les travaux de Stein et Coll., pour lesquels on peut supposer qu'une désensibilisation vis à vis de la Nétrine-1 serait à l'origine des résultats obtenus.

Par ailleurs, il n'est pas inutile de remarquer que ces deux études utilisent des inhibiteurs peu spécifiques de A2b. Seule l'étude du knock-out de A2b devrait donc permettre de conclure. Cependant, également en accord avec un lien entre A2b et Nétrine-1, on peut citer une étude sur les neurones rétiniens de xénope qui montre qu'en réponse à la Nétrine-1, A2b pourrait participer à l'orientation du cône de croissance indépendamment ou en tant que co-récepteur de DCC(Shewan et al., 2002). D'autre part, une étude récente montre que la stimulation d'A2b par des agonistes diminue la quantité de récepteurs Unc5A à la surface cellulaire *via* la voie PKC-α (Protein Kinase C-α)(McKenna et al., 2008). De plus dans cette étude, les auteurs n'observent pas l'activation d'A2b par la Nétrine-1. Cette étude propose donc que c'est A2b plutôt que la Nétrine-1 qui modulerait la réponse axonale dans ce modèle.

1-2-4-2-APP

APP (Amyloid-β Precursor Protein) est un récepteur transmembranaire de type 1 de 110 kDa comprenant un grand domaine extracellulaire avec un domaine KPI (Kunitz-type Protease Inhibitor), un domaine transmembranaire et un court domaine intracellulaire (figures 3 et 5 a). Initialement, APP fut identifié comme étant impliqué dans la maladie d'Alzheimer qui est une maladie neurodégénérative progressive caractérisée par une perte graduelle de la mémoire, du raisonnement, de l'orientation et du jugement, aboutissant au décès du patient. Au niveau cytologique, la caractéristique principale de la maladie d'Alzheimer est la présence de plaques dans le cerveau des patients. Le composant majoritaire de ces plaques est un polypeptide de 39 à 43 acides aminés, appelé peptide amyloïde-β, issu de la protéolyse du récepteur APP(Beyreuther et al., 1991).

Chez l'Homme, le gène de APP est porté par le chromosome 21(Goldgaber et al., 1987; Tanzi et al., 1987). Ce gène produit par épissage cinq variants, dont trois majoritaires : APP695, APP751 et APP770, et deux minoritaires : APP563 et APP714(Fisher et al., 1991). Seules les trois formes majoritaires sont retrouvées chez la souris(Fisher et al., 1991)où elles présentent des patrons d'expression différents. En effet, APP695 est abondamment exprimée dans les cellules neuronales, alors que APP751 et APP770 sont exprimées de manière relativement ubiquitaire. Par ailleurs chez les Vertébrés, il existe deux homologues à APP : APLP1 et APLP2 (Amyloid-β Precursor Like Protein)(Wasco et al., 1992).

De nombreuses investigations cherchèrent à déterminer les mécanismes aboutissant à la libération du peptide amyloïde-β à partir du récepteur APP. Deux voies de protéolyse furent identifiées, la voie amyloïdogénique (*ie* aboutissant à la production du peptide amyloïde-β) et la voie non amyloïdogénique (*ie* aboutissant à la production d'un peptide P3 dont la fonction est inconnue). Ces voies protéolytiques font intervenir un clivage séquentiel par des protéases : les sécrétases. En effet, la voie amyloïdogénique (figure 5 b) nécessite un premier clivage de APP, appelé clivage β, par une β-secrétase, BACE1, qui est une aspartyl protéase active dans le lumière des vésicules cytoplasmiques(Vassar and Citron, 2000). Ce clivage est ensuite suivi par un clivage γ par une γ-sécrétase qui est un complexe enzymatique intramembranaire dont le site catalytique est un hétérodimère de préséniline associé à trois protéines membranaires : la nicastrine, Aph1 (Anterior Pharynx défectif-1) et Pen2(Presenilin Enhancer-2)(Kimberly et al.,

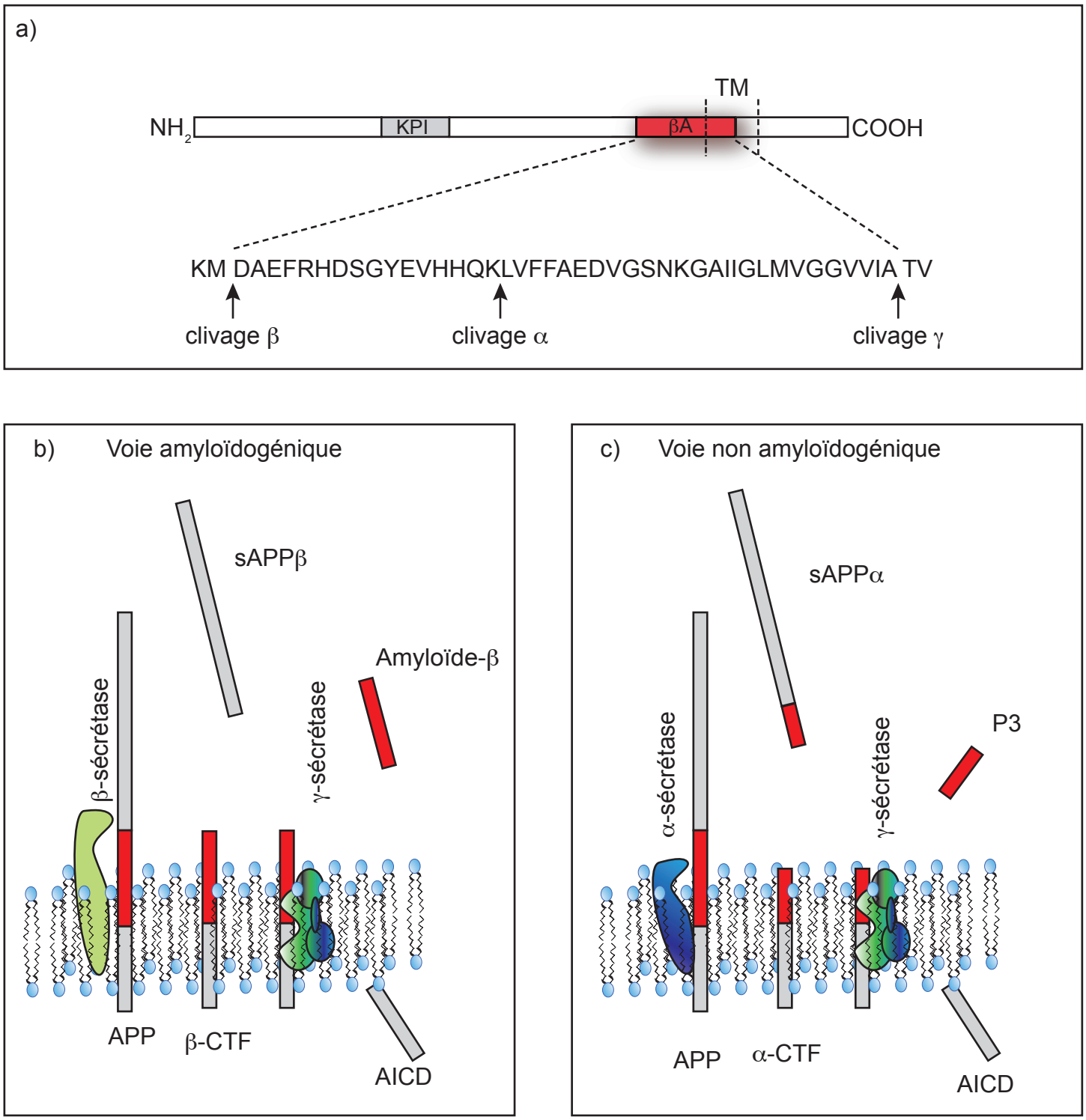


Figure 5 : Le récepteur APP et son processing
(a) Le récepteur APP présente un large domaine extracellulaire avec un domaine KPI, un domaine transmembranaire et un court domaine intracellulaire. La région correspondant au peptide amyloïde-β est à cheval sur les régions extracellulaire et transmembranaire.
Les figures (b) et (c) décrivent réspectivement la voie amyloïdogénique et la voie non amyloïdogénique.

2003). Chronologiquement, le clivage β aboutit d'abord à la formation d'un fragment soluble APP-β (sAPP-β) et d'un fragment C100 (β-CTF). Puis le clivage γ du fragment C100 mène à la formation du peptide amyloïde-β et d'un fragment appelé AICD dont nous verrons le rôle plus tard.

L'autre voie dite « non amyloïdogénique » nécessite aussi un premier clivage de APP, appelé clivage α, par une α-sécrétase au milieu de la séquence du peptide amyloïde-β (figures 5 a et c) produisant un fragment soluble APP-α (sAPP-α) et un fragment C83 (α-CTF). Deux α-sécrétases ont été identifiées : ADAM10 et ADAM17 (A Disintergrin And Metaloprotease)(Buxbaum et al., 1998; Parkin et al., 2002). Le clivage α est ensuite suivi du clivage γ décrit précédemment mais qui concerne ici le fragment α-CTF, libérant un fragment P3 et le fragment AICD.

Le fragment AICD issu des deux voies protéolytiques est capable d'interagir avec la protéine adaptatrice nucléaire Fe65 et l'histone acétylase Tip60 induisant ainsi la transcription de gènes cibles comme par exemple: le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) et des protéines du cytosquelette(Cao and Sudhof, 2001, 2004; Muller et al., 2007; Zhang et al., 2007).

Toutes ces études ont permis de mieux comprendre les mécanismes aboutissant à la maladie d'Alzheimer, cependant le rôle physiologique du récepteur APP est encore relativement inconnu même s'il a été décrit comme médiateur de l'adhésion cellulaire et facteur de croissance pour les fibroblastes(Saitoh et al., 1989; Schubert et al., 1989). Des études ont également permis de montrer que APP pourrait concourir au développement du SNC, notamment en favorisant la pousse axonale(Milward et al., 1992; Small et al., 1994) et en participant à la migration des précurseurs neuronaux dans le cortex(Young-Pearse et al., 2007). D'autre part, l'étude de souris invalidées pour APP mit en lumière le rôle potentiel du récepteur APP au cours du développement du SNC. En effet, ces animaux présentent à la naissance une agénésie du corps calleux, ainsi qu'une diminution de taille des commissures hippocampique ventrale et antérieure(Muller et al., 1994). Néanmoins, le degré de gravité de ces défauts est fortement dépendant du fond génétique des animaux, laissant imaginer un rôle dépendant de la présence d'autres facteurs(Magara et al., 1999). En outre, il est envisageable qu'il y ait redondance fonctionnelle entre APP et APPLP1 et 2, puisque l'invalidation combinée de deux ou des trois homologues conduit à des défauts du SNC

plus graves que ceux obtenus chez les simples mutants, ainsi qu'à la mort post-natale des nouveaux-nés(Herms et al., 2004).

A ce jour, toutes ces études n'ont pas encore pu mettre en évidence un ligand majeur de APP, même s'il a été récemment décrit que la molécule d'adhésion neuronale TAG-1 (Transiently expressed Axonal Glycoprotein) (Ma et al., 2008) ainsi que des sulfates d'héparane(Small et al., 1994) agiraient comme tels. En outre, une étude a démontré que APP serait un récepteur de la Nétrine-1 avec un Kd de 6 nM, équivalent à celui de DCC/Nétrine-1(Lourenco et al., 2009). Cette interaction est médiée *via* la partie N-ter du peptide amyloïde-β. La liaison de la Nétrine-1 active l'activité transcriptionnelle de APP et diminue la production de peptide amyloïde-β. Cette réduction de la quantité de peptide amyloïde-β mise en évidence chez le modèle murin de la maladie d'Alzheimer après injection de Nétrine-1, est associée à une diminution des troubles cognitifs des souris(Lourenco et al., 2009). En outre, APLP1 et APLP2 sont aussi capables d'interagir avec la Nétrine-1(Lourenco et al., 2009).

Il est intéressant de remarquer que l'invalidation de APP et de la Nétrine-1 conduisent à des défauts du corps calleux(Magara et al., 1999; Serafini et al., 1996). Il est donc tentant de supposer que les défauts observés lors de l'invalidation de APP seraient associés à un défaut de signalisation en réponse à la Nétrine-1. Qui plus est, APP est capable d'activer des voies de signalisation importantes dans le guidage axonal(Xu et al., 2009).

Au cours de ma thèse, j'ai testé l'éventualité du rôle de APP dans le guidage axonal en tant que récepteur à la Nétrine-1. J'ai réalisé cette étude sur le modèle des neurones commissuraux, car ils projettent leur axone en réponse à la Nétrine-1 et expriment APP(Nikolaev et al., 2009). Cette étude vous sera présentée dans la partie résultat.

2 Rôle de la Nétrine-1 dans le développement du SNC

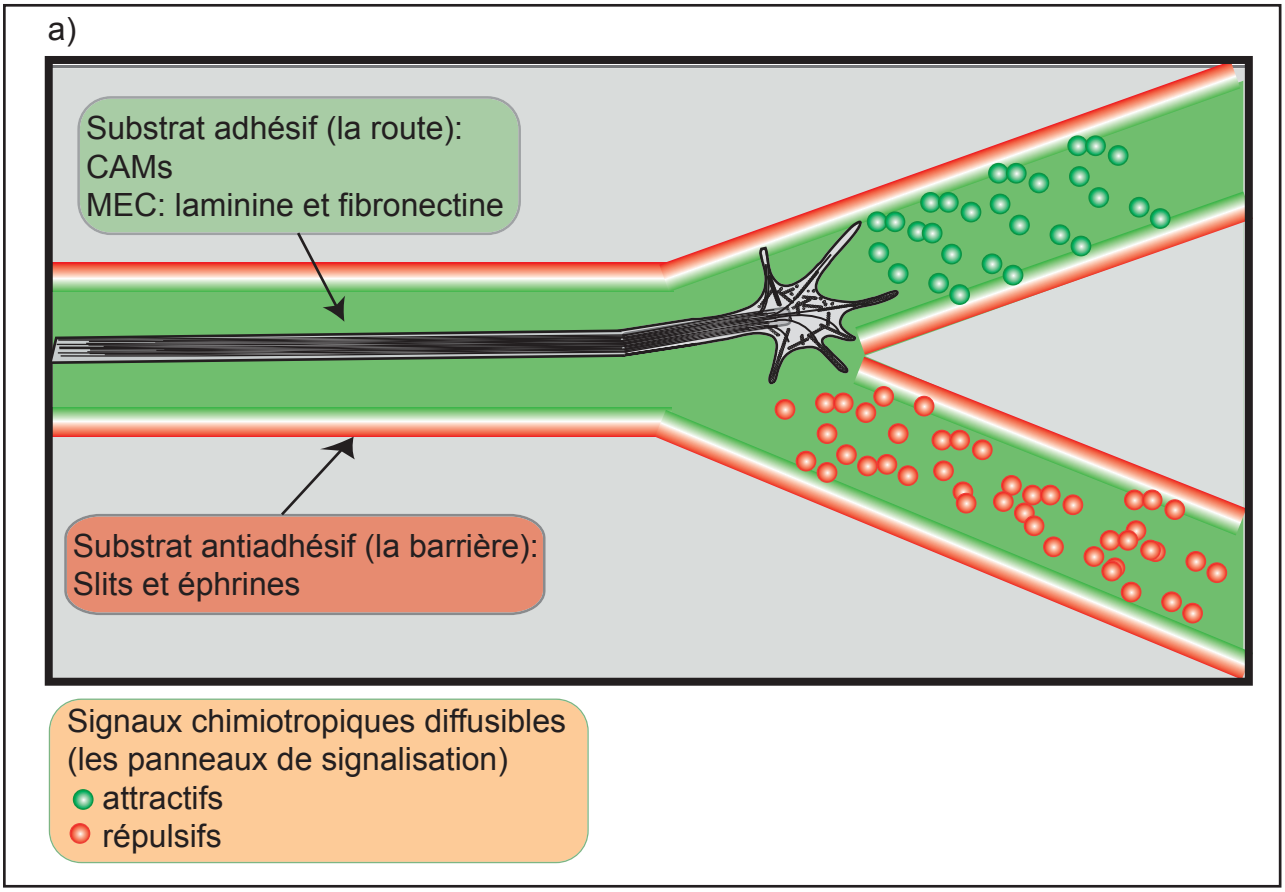
Dans cette deuxième partie, nous allons nous intéresser plus particulièrement au rôle de la Nétrine-1 au cours de la navigation neuronale. En effet chez la souris, l'invalidation de la *nétrine-1* ou de ses récepteurs confirme le rôle de facteur de guidage de la Nétrine-1 lors des processus de guidage axonal et de migration neuronale(Ackerman et al., 1997; Fazeli et al., 1997; Serafini et al., 1996). Nous verrons donc successivement l'implication de la Nétrine-1 dans le guidage axonal, puis dans la migration neuronale. Enfin, nous décrypterons les voies de signalisation en aval de la Nétrine-1 et de ses récepteurs.

2-1 La Nétrine-1 et le guidage axonal

2-1-1 Le guidage axonal

2-1-1-1 Généralités

Au cours du développement, les neurones projettent avec une grande précision leurs axones à travers un environnement changeant et complexe vers leurs partenaires synaptiques. Afin de suivre le chemin approprié, les axones sont terminés par une structure très mobile et sensible à son environnement : le cône de croissance. Tout au long du chemin, celui-ci répond à un ensemble de signaux environnementaux qui le guident jusqu'à sa cible. En effet, le cône de croissance suit un chemin stéréotypé, jalonné par la présence de signaux cellulaires et extracellulaires. En ce sens, le cône de croissance utilise une « route » pour se déplacer (figure 6 a). Cette route est d'abord définie par des molécules d'adhésion telles que les CAMs, exprimées par les cellules avoisinantes, ou encore par des protéines de la MEC comme les laminines et les fibronectines(Evans et al., 2007; Maness and Schachner, 2007). Ces molécules fournissent donc une surface sur laquelle le cône croissance adhère, mais elles peuvent aussi activer des voies de signalisation impliquées dans le guidage. Afin que le cône de croissance ne fasse pas de « sortie de route », son trajet peut être bordé par des molécules antiadhésives, telles que les slits et les éphrines(Dickson, 2002). Enfin, la présence de signaux chimiotropiques diffusibles indique le chemin à suivre, puisqu'ils gouvernent l'orientation du cône de croissance au cours de son trajet. Ces signaux ont



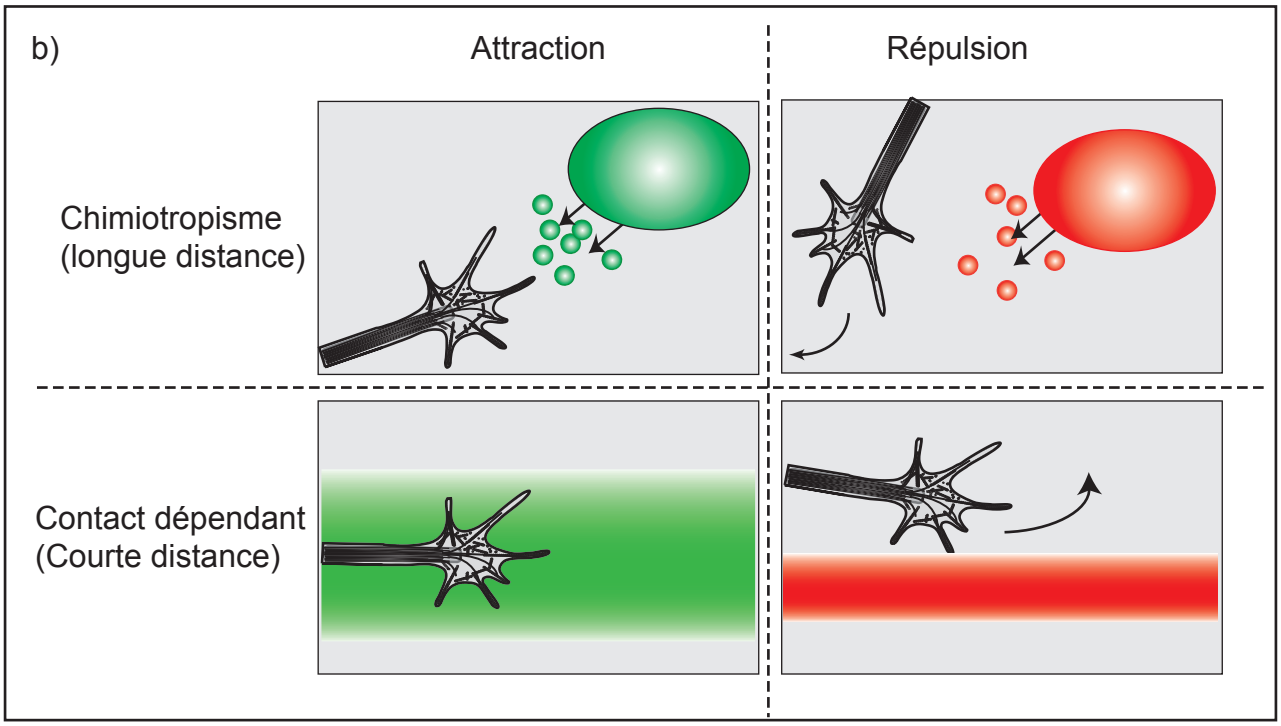


Figure 6: Le guidage axonal et le chimiotropisme
(a) Le cône de croissance rencontre dans son environement de nombreux signaux qui lui permettent de suivre un trajet stéréotypé. Tout d'abord, le cône de croissance adhère sur un substrat (la route), ensuite il rencontre un substrat antiadhésif (les barrières) et enfin des signaux chimiotropiques (panneaux de signalisation) qui lui indiquent dans quelle direction il doit se déplacer.
(b) Les mécanismes de guidage axonal sont classés selon qu'ils sont attractifs ou répulsifs, puis qu'ils agissent à longue (chimioattraction versus chimiorépulsion) ou à courte distance (attraction contact dépendante ou répulsion contact dépendante).(Adaptée de Goodman,1996)

plusieurs origines : les facteurs de guidage axonal identifiés comme tels, les morphogènes, des facteurs neurotrophiques, des facteurs de transcription secrétés et même des neurotransmetteurs(Brunet et al., 2005; Dickson, 2002; Gundersen and Barrett, 1979; Mattson et al., 1988). Ces facteurs de guidage sont doués d'une activité chimioattractive et/ou d'une activité chimiorépulsive et peuvent agir à longue ou courte distance selon qu'ils sont ou non capables de diffuser (figure 6 b).
C'est donc dans cet environnement complexe que le cône de croissance va s'orienter afin d'atteindre sa cible.

2-1-1-2-La structure effectrice : le cône de croissance

Comme nous venons de le voir le cône de croissance est la composante effectrice fondamentale du guidage axonal. Le cône de croissance peut se subdiviser en trois domaines selon la distribution du cytosquelette: P (périphérique), T (transition) et C (central). Le domaine P correspond à la périphérie du cône de croissance où se trouvent des structures très dynamiques qui explorent l'environnement : les filopodes. Ces filopodes sont séparés par de fines membranes appelées lamellipodes. Le domaine P comprend à la fois des filaments d'actine (actine-F pour fibrillaire) sous forme de longs faisceaux dans les filopodes, ou formant un réseau branché dans les lamellipodes. Le domaine P contient également des microtubules très dynamiques qui explorent cette région le long des faisceaux de filaments d'actine. Le domaine C est quant à lui situé au centre du cône de croissance : c'est la région cytoplasmique du cône de croissance. Il contient des faisceaux de microtubules stables qui entrent dans le cône de croissance, des organites, et des vésicules. Enfin, on trouve le domaine T à l'interface des domaines P et C. Cette région contient les structures contractiles d'actomysosine disposées en arc perpendiculairement aux faisceaux d'actine-F des filopodes de la région P (figure 7)(Lowery and Van Vactor, 2009).
La description de la structure du cône de croissance met donc en lumière l'organisation complexe du cytosquelette composé majoritairement d'actine et de microtubules. Les neurofilaments sont eux aussi présents, mais ne semblent pas indispensables au bon fonctionnement du cône de croissance puisque leur invalidation chez la souris ne conduit qu'à peu de défauts du SNC(Eyer and Peterson, 1994).

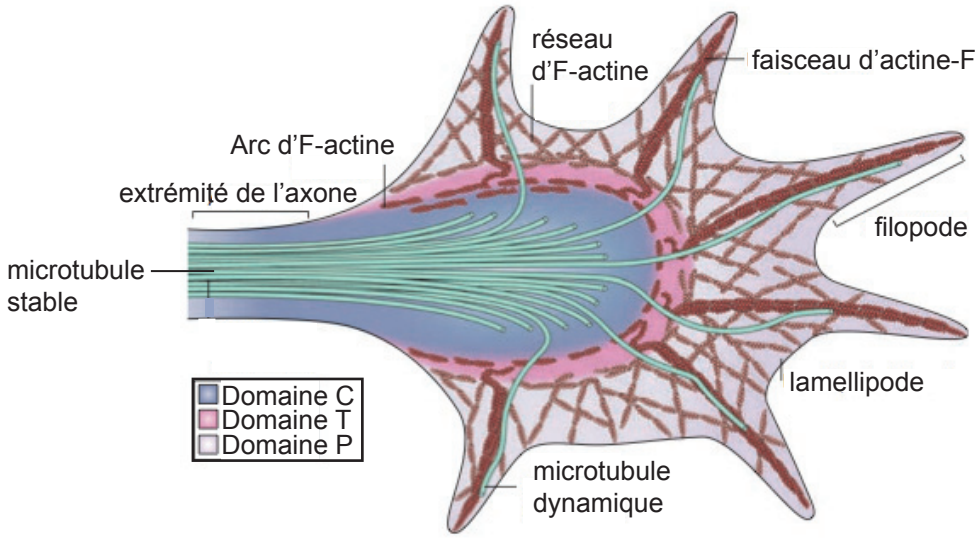


Figure 7: Organisation du cône de croissance (Adaptée de Lowery and Van Vactor, 2009)

Les filaments d'actine sont formés à partir de monomères d'actine globulaire (actine-G) s'associant en un polymère hélicoïdal (actine-F). Les neurones expriment la β et la γ-actine qui sont issus de gènes différents(Choo and Bray, 1978). Ces différentes actines sont produites en monomère sous forme d'actine-G. Dans la cellule, on retrouve l'actine-G associée avec le nucléoside adénosine sous trois formes : l'ATP-actine qui a plus tendance à polymériser, et l'ADP-Pi-actine et l'ADP-actine. Les filaments d'actine sont polarisés, ils présentent une extrémité barbée et une extrémité pointue. L'ATP-actine est préférentiellement ajoutée au niveau de l'extrémité barbée. Une fois incorporée, l'ATP sera progressivement hydrolysée en ADP+Pi. Le phosphate inorganique (Pi) sera alors graduellement libéré puis recyclé, tant et si bien que lorsque l'on se rapproche de l'extrémité pointue, le filament ne contient plus que de l'ADP-actine. Contrairement à l'extrémité barbée où l'incorporation de l'ATP-actine dans le polymère est favorisée, on observe une dépolymérisation au niveau de l'extrémité pointue, et donc une libération d'ADP-actine (ensuite recyclée en ATP-actine(Pak et al., 2008)). On appelle « flux rétrograde » ce mouvement apparent de l'actine-F, de l'extrémité barbée à l'extrémité pointue. Ce flux rétrograde est aussi favorisé par la myosine-2 située dans la région T qui tire sur le filament d'actine(Lowery and Van Vactor, 2009). En général dans le cône de croissance, l'extrémité barbée du filament d'actine fait face à la membrane distale (domaine P), tandis que l'extrémité pointue est dirigée vers le domaine T. La polymérisation de l'actine-F dans la région P, sa dépolymérisation dans la région T, et enfin son recyclage sont à l'origine du phénomène appelé: le « tapis roulant » de l'actine-F. Lorsque le cône de croissance est en pause, le flux rétrograde et les forces de polymérisation se compensent empêchant ainsi la formation de protrusions (figure 8 a). *A contrario*, lorsque le filopode rencontre un substrat qui lie un des récepteurs exprimés à sa surface, il va y avoir formation d'un complexe moléculaire interagissant avec le filament d'actine. L'ancrage du filament d'actine atténue le flux rétrograde et déséquilibre la balance flux rétrograde/force de polymérisation, favorisant ainsi la force de polymérisation, et par conséquent la formation d'une protrusion (figure 8 a).(Dent and Gertler, 2003; Lowery and Van Vactor, 2009)

Les microtubules sont aussi des structures polarisées composées d'hétérodimères de tubuline α et β subissant de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces hétérodimères s'assemblent de manière linéaire et forment un

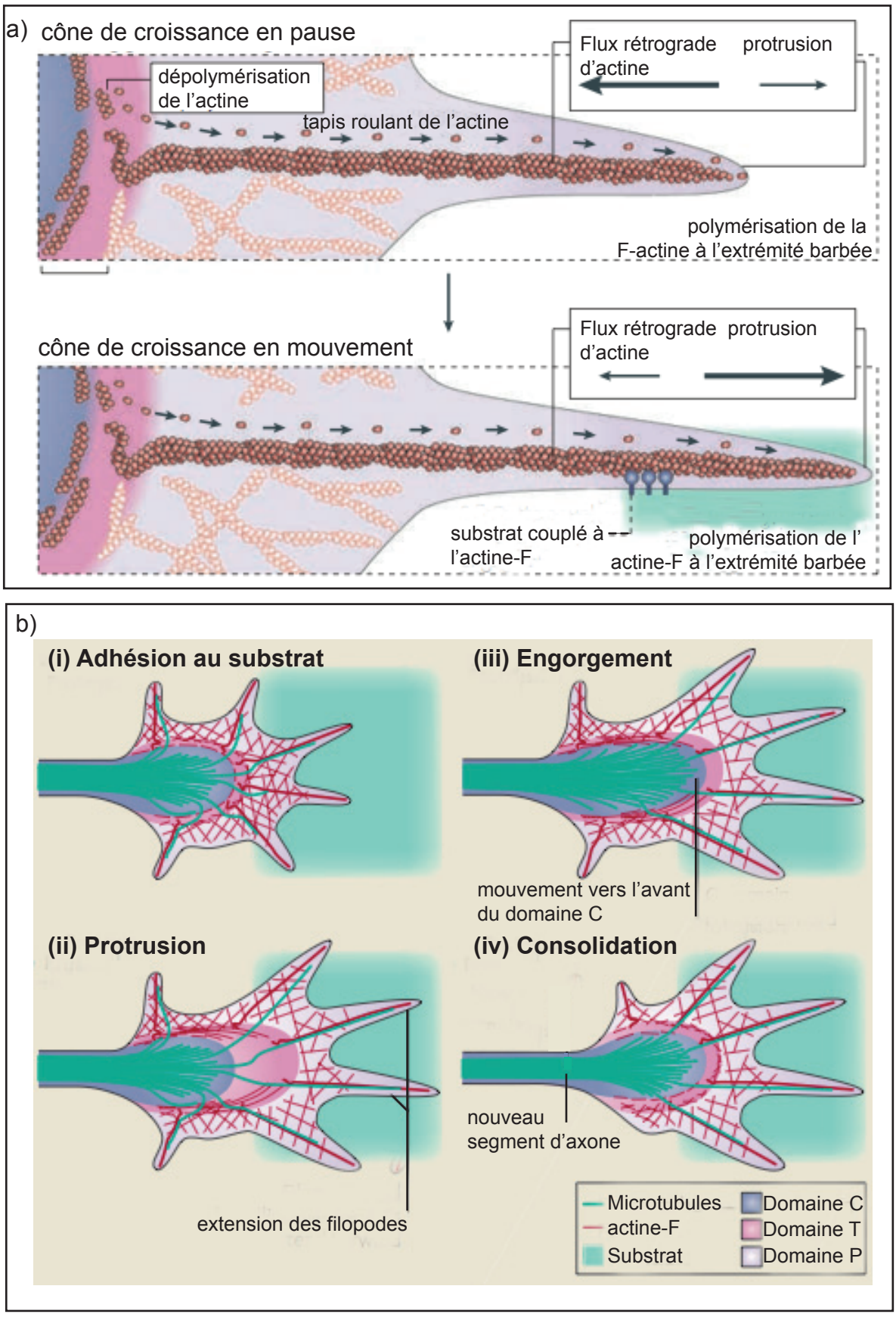


Figure 8: la dynamique du cône de croissance
(a) Explication du tapis roulant et du flux rétrograde de l'actine-F
(b) Modèle expliquant les différentes étapes de la croissance axonale
(Adaptée de Lowery and Van Vactor, 2009)

protofilament. L'assemblage de onze à quinze protofilaments aboutit à la formation d'un microtubule de 25 nm de diamètre (Luduena, 1998). Les microtubules possèdent une extrémité « plus » où se produit la polymérisation et une extrémité « moins » où il y a dépolymérisation. Ils alternent ainsi entre des phases de croissance (sauvetage) et de rétrécissement (catastrophe). Les microtubules forment dans l'axone un dense faisceau cylindrique. Quand celui-ci arrive dans le cône de croissance, les microtubules se séparent et explorent le domaine P. Il a même été proposé que les microtubules pourraient être des capteurs intracellulaire du guidage(Lee and Suter, 2008). En effet, un signal d'adhésion local conduit à l'augmentation du nombre de microtubules interagissant au niveau du site d'adhésion où ils pourraient jouer un rôle lors du remaniement du cytosquelette.

Le guidage axonal fait intervenir deux processus réalisés par le cône de croissance : la croissance axonale et l'orientation de cette dernière. La croissance axonale est habituellement décrite selon une séquence d'évènements : protrusion, engorgement et consolidation(Dent and Gertler, 2003; Lowery and Van Vactor, 2009)(figure 8 b). Lorsque le cône de croissance rencontre un substrat adhésif (i), il y a formation de complexes protéiques qui ancrent les filaments d'actine-F. Ce phénomène conduit à l'expansion des protrusions comme décrit précédemment. Par conséquent, les filopodes s'allongent et le domaine P s'étend vers l'avant, c'est l'étape de protrusion (ii). Ensuite, les arcs d'actine-F se réorientent et les microtubules envahissent le nouveau domaine C en apportant de nombreux organites et vésicules, c'est l'étape d'engorgement (iii). Enfin, la consolidation a lieu dans la région proximale du cône de croissance qui se resserre autour du faisceau cylindrique de microtubules et forme un nouveau segment d'axone (iv).

Au cours de l'orientation du cône de croissance, ce dernier devient asymétrique. Dans le cas d'une chimioattraction, le nombre de filopodes augmente du côté où la molécule de guidage est majoritairement présente. De plus, il va y avoir croissance des filopodes et consolidation par les microtubules qui les envahissent(Dent and Gertler, 2003; Lowery and Van Vactor, 2009).

Le cytosquelette d'actine et de microtubules est fondamental pour la dynamique du cône de croissance. Des études à l'aide de drogues perturbant le cytosquelette montrèrent que l'actine et les microtubules ont des rôles distincts dans cette dynamique. En effet,

l'incubation de neurones avec de la cytochalasine-B (dépolymérisation de l'actine-F) conduit à la rétraction des filopodes, donc à l'écroulement de la forme du cône de croissance. Cependant même s'il ne peut plus s'orienter, ce dernier continue à croitre de manière aléatoire (Chien et al., 1993). En revanche, l'incubation de neurones avec de la colchicine (dépolymérisation des microtubules) aboutit quant à elle, à la rétraction de l'axone(Yamada et al., 1971). Ces études suggèrent donc que globalement, l'actine-F participe au maintient de la forme du cône de croissance et à son orientation, tandis que les microtubules sont essentiels à la structure de l'axone et à sa croissance(Dent and Gertler, 2003). Néanmoins, les microtubules sont également importants pour l'orientation du cône de croissance puisqu'on a vu qu'ils stabilisent la formation asymétrique des filopodes en les envahissant.

Au cours de sa navigation, le cône de croissance reçoit donc des signaux extracellulaires provenant de sources multiples comme des facteurs de guidage et des molécules d'adhésion. Ces signaux vont être hiérarchisés et interprétés au niveau du cône de croissance afin d'aboutir au remodelage de son cytosquelette. En effet, des récepteurs membranaires transmettent au cône de croissance une variété de signaux extracellulaires qui sont transduits par des protéines de signalisation telles que celles de la famille des Rho GTPases (RhoA, Rac1 et Cdc42)(Govek et al., 2005). L'intégration de ces signaux conduit à la coordination des différentes Rho GTPases qui vont activer des protéines effectrices du cytosquelette. Cette intégration du signal est complexe puisqu'elle fait intervenir une multitude de voies de signalisation issues de la combinaison de signaux extracellulaires.

La dynamique d'assemblage du cytosquelette d'actine et de microtubules est modulée par de nombreuses protéines appelées respectivement ABP (Actin Binding Protein) et MAP (Microtubule Associated Protein)(Lowery and Van Vactor, 2009; Pak et al., 2008). Il existe différents types d'ABPs. Certaines d'entre elles comme le complexe ARP2/3 (Actin Related Protein 2/3), les protéines formines et Spir, ENA/VASP (Enabled/vasodilatator Stimulated Phosphoprotein) sont capables de favoriser la nucléation de l'actine-F. D'autres au contraire inhibent la formation d'actine-F en séquestrant les monomères d'actine : calbindin, ou en se fixant sur l'extrémité barbée du filament d'actine-F : CAPG (CApping Protein-Gelsolin like). En outre, certaines protéines coupent les filaments d'actine-F comme le complexe ADF-cofiline (Actin Depolymerisation Factor).

Néanmoins, la cofiline est aussi capable de favoriser la nucléation de l'actine-F(Andrianantoandro and Pollard, 2006). Enfin, d'autres protéines ABPs comme WASP (Wiscott-Aldrich-Syndrome Protein), ancrent le cytosquelette d'actine à la membrane par l'intermédiaire de la protéine ARP2/3 et les protéines ERM (Ezrin/Radixin/Moesin).
Les MAPs comprènent également une variété de protéines qui jouent des rôles différents(Lowery and Van Vactor, 2009). La famille des « plus end tracking protein » (TIPs) polymérise avec les microtubules et favorise l'interaction entre l'actine et les microtubule. La protéine MAP1B (microtubule Associated Protein) stabilise l'extrémité «plus» des microtubules et permet l'interaction entre l'actine-F et les microtubules. En revanche, APC (Adenomatous Polyposis Coli) et Lis1 (Lissencephaly1) favorisent leur désassemblage.

2-1-1-3 Les facteurs de guidage axonal

La complexité du réseau neuronal suggère que son établissement nécessite une variété de signaux extracellulaires afin de guider le cône de croissance jusqu'à sa cible. En ce sens, l'identification des nétrines, en tant que facteurs de guidage, a ouvert la voie à de nombreuses investigations qui permirent la découverte de quatre autres grandes familles de molécules de guidage axonal : les éphrines, les sémaphorines, les slit et certains morphogènes (voir pour revue(Chilton, 2006; Dickson, 2002)).
Les éphrines furent identifiées lors d'études analysant les projections rétinotectales(Drescher et al., 1995). Ce sont des molécules de guidage axonal attractives ou répulsives attachées à la membrane(Drescher et al., 1995; Wilkinson, 2001). Les récepteurs aux éphrines (Eph Receptors) sont des récepteurs à activité tyrosine-kinase et sont classés en deux catégories EphA et EphB selon que leurs ligands sont ancrés à la membrane respectivement *via* une ancre GPI (Ephrines A), ou *via* un domaine transmembranaire (Ephrines B)(Wilkinson, 2001).
Les sémaphorines ont quant à elles été initialement identifiées comme des molécules induisant le « collapse » ou effondrement du cône de croissance(Luo et al., 1993). Elles s'avèrent en fait jouer un rôle principalement répulsif au cours du guidage axonal. Elles appartiennent à une famille de facteurs de guidage axonal sécrétés composée de huit classes qui partagent un domaine conservé d'environ 420 acides aminés : le domaine Sema. Les récepteurs aux sémaphorines sont multimériques. Ils incluent les pléxines, les

neuropilines, mais aussi NCAM-L1 et le récepteur à tyrosine kinase MET(Chilton, 2006; Dickson, 2002).

Concernant les Slits, il s'agit de protéines sécrétées identifiées lors d'un crible génétique pour des défauts de franchissement de la ligne médiane chez la drosophile. Les slits ont une activité répulsive qui est médiée *via* les récepteurs ROBO (Roundabout Protein). Leur rôle au niveau de la ligne médiane, est d'empêcher les axones commissuraux de la franchir de nouveau lorsqu'ils ont projeté en controlatéral, prévenant ainsi les projections ipsilatérales(Chilton, 2006; Dickson, 2002).

Outre les Nétrines, l'identification des trois familles de facteurs de guidage décrites ci-dessus ne permettait pas à elle seule d'expliquer la complexité du « câblage neuronal ». Par exemple, les neurones commissuraux ne se projettent pas uniquement en réponse à la Nétrine-1 en direction ventrale, puisque certains d'entres eux atteignent la ligne médiane en absence de Nétrine-1. Dans ce cas précis, un des facteurs incriminés s'est avéré être la protéine Shh, sécrétée tout comme la Nétrine-1 par les cellules de la plaque du plancher(Charron et al., 2003). De la même manière, d'autres études mirent en exergue le rôle en tant que facteurs de guidage, de molécules sécrétées, initialement décrites comme des morphogènes contrôlant la différenciation cellulaire et tissulaire. Hormis Shh, c'est ainsi également le cas de: Wingless/Wnt(Lyuksyutova et al., 2003) et Decapentaplegic/bone Morphogenic Protein/Transforming Growth Factor β (Dpp/BMP/TGFβ)(Augsburger et al., 1999).

2-1-1 4-Modèle d'étude du guidage axonal : les neurones commissuraux

L'étude *in vivo* du guidage axonal fut favorisée par l'utilisation de différents modèles, notamment ceux des neurones rétiniens et des neurones commissuraux spinaux. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé le modèle des neurones commissuraux spinaux qui est à l'origine du paradigme du guidage axonal. Ces neurones sont des interneurones dont la fonction la plus connue est la coordination bilatérale permettant ainsi la synchronisation motrice. Il faut cependant noter qu'ils sont également impliqués par ailleurs, comme par exemple dans la voie sensitive cutanée(Grillner, 2003; Kjaerulff and Kiehn, 1997; Li et al., 2004b). Les neurones commissuraux spinaux projettent leur axone controlattérallement et se projettent soit en direction rostrale (ils sont dits ascendants),

soit en direction caudale (ils sont dit descendants)(Eide et al., 1999). Les axones commissuraux ascendants vont pour certains atteindre le thalamus, la formation réticulée ou le cervelet(Altman and Bayer, 1984; Arakawa et al., 2008).

Dans la moelle épinière adulte, il existe plusieurs sous-populations d'axones commissuraux répartis tout le long de l'axe dorso-ventral. Au cours du développement, les progéniteurs dorsaux donnent naissance à six sous-populations : dI1 à 6 (dorsal Interneuron), tandis que les progéniteurs ventraux donnent naissance à quatre sous-populations : V0 à V3(Goulding et al., 2002; Jessell, 2000). Certains progéniteurs comme les dI2 forment des neurones commissuraux se projetant majoritairement controlatérallement, alors que d'autres comme les interneurones dI1 par exemple, se projettent à la fois ipsilatérallement et controlatérallement(Avraham et al., 2009).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux neurones commissuraux localisés dans la région dorsale de la moelle épinière et détectables notamment grâce à leur expression du facteur de transcription Math-1(Helms and Johnson, 1998). Ce modèle fut choisi car ces neurones expriment DCC et projettent leur axone en réponse à la Nétrine-1(Keino-Masu et al., 1996); leur étude permit l'établissement du paradigme de la Nétrine-1 comme facteur de guidage à longue distance. Au cours du développement, le trajet emprunté par les axones commissuraux spinaux peut se subdiviser en trois parties (figure 9). D'abord, ces neurones projettent leur axone en direction ventrale vers une cible intermédiaire, la plaque du plancher. Ensuite, les axones commissuraux franchissent la ligne médiane, et enfin ils se projettent en direction rostrale. Le trajet vers la plaque du plancher a été intensément étudié. En particulier, les nombreuses investigations réalisées ont permis d'identifier la Nétrine-1 comme un composant essentiel lors de l'attraction jusqu'à la plaque du plancher, puisque son invalidation prévient l'attraction à la ligne médiane(Serafini et al., 1996). Nous détaillerons plus loin le rôle de la Nétrine-1. Cependant, certains axones commissuraux atteignent la ligne médiane en absence de Nétrine-1 suggérant qu'il existerait d'autres protagonistes impliqués lors de ce trajet. Ainsi, il a été démontré que la plaque du toit secrète des molécules diffusible BMP7 (Bone Morphogenetic Protein 7) et GDF-7 (Growth Differentiation Factor-7) repoussant les axones commissuraux à distance de la zone dorsale(Augsburger et al., 1999; Butler and Dodd, 2003), tandis que ceux-ci sont attirés ventralement par la sécrétion de Sonic HedgeHog au niveau de la plaque du plancher(Charron et al., 2003).

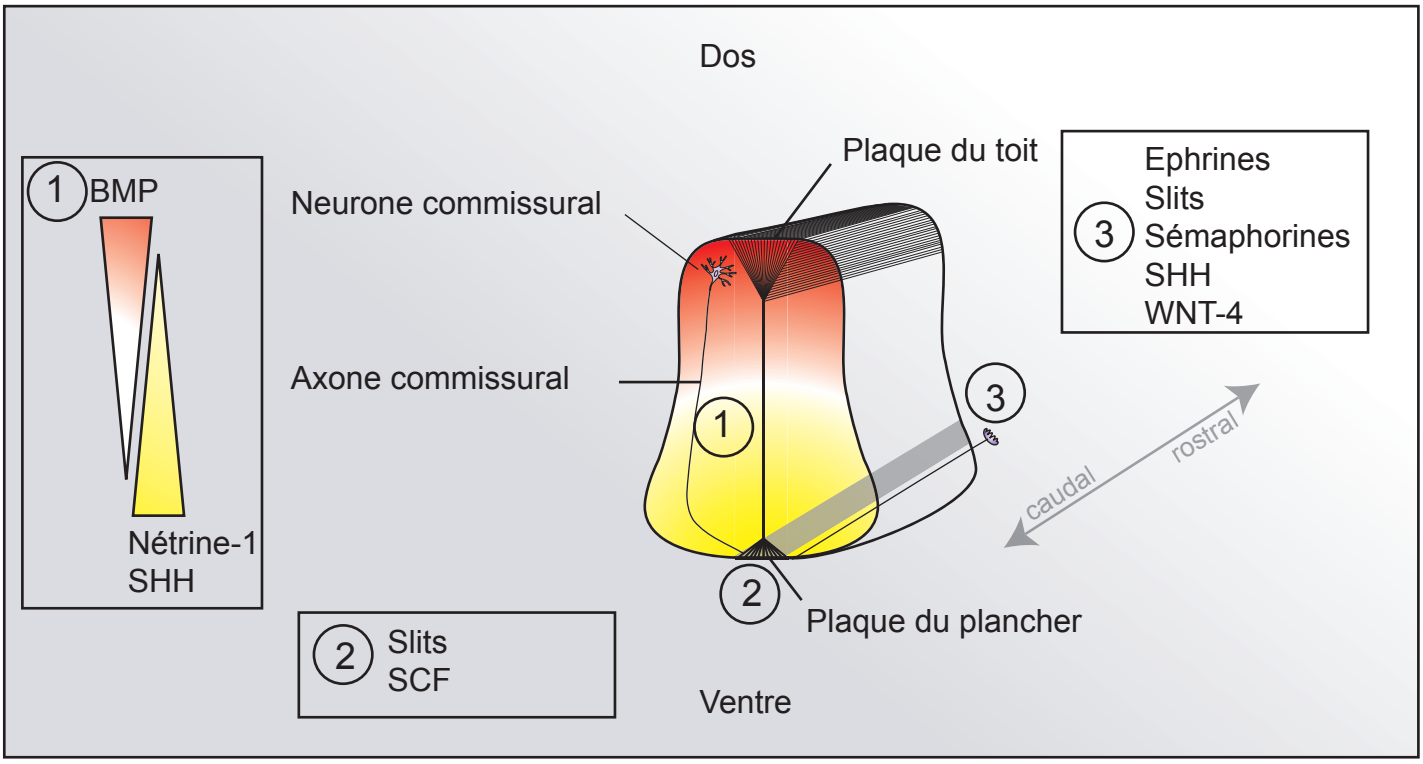


Figure 9: Représentation de la trajectoire des axones commissuraux sur une coupe transversale de moelle épinière.① décrit le trajet dorso-ventral.② décrit le franchissement de la ligne médiane.③ décrit le trajet rostral.

Lors du franchissement de la ligne médiane, le cône de croissance subit une désensibilisation vis à vis de la Nétrine-1 par les Slits secrétés à la ligne médiane(Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999). En outre, la pousse axonale est favorisée par le SCF (Stem Cell Factor) permettant la sortie de la ligne médiane(Gore et al., 2008). Plus récemment, une étude démontre que le couple sémaphorine-3B / plexine-A1 contrôle la sortie et l'orientation des axones commissuraux au niveau de la ligne médiane(Nawabi et al., 2010).

Enfin lors du trajet longitudinal en direction rostrale, les éphrines et Sonic HedgeHog participent au guidage des axones commissuraux. Les Slits et les sémaphorines repoussent les axones de la ligne médiane prévenant ainsi un éventuel refranchissement(Imondi and Kaprielian, 2001; Jaworski et al., 2010; Kadison et al., 2006; Zou et al., 2000). En outre, chez la souris, les axones des neurones commissuraux dorsaux suivent un gradient rostro-caudal de Wnt4 (wingless-type MMTV integration site family, member 4) qui attire les axones commissuraux en direction rostrale(Lyuksyutova et al., 2003). En revanche chez le poulet, SHH forme un gradient caudo-rostral qui repousse les axones commissuraux en direction rostrale(Bourikas et al., 2005). De plus, ce gradient de SHH contrôlerait l'expression de SFRP-1(Secreted frizzled-related protein-1), un antagoniste des Wnts(Domanitskaya et al., 2010). De la sorte, il y aurait un gradient d'activité des WNTs inverse à celui de SHH, qui attirerait les axones commissuraux en direction rostrale(Domanitskaya et al., 2010). Chez le poulet, SHH aurait donc une activité directe en repoussant les axones commissuraux qui ont franchi la ligne médiane, mais aussi indirecte *via* le contrôle de l'activité des Wnts.

Les neurones commissuraux sont donc un modèle de choix pour étudier le guidage axonal, car leurs projections font intervenir de nombreuses familles de facteurs de guidage. De plus, leur trajectoire est facilement analysable car ces neurones expriment spécifiquement une protéine transmembranaire axonale : Tag-1(Dodd et al., 1988).

2-1-2 Rôle de la Nétrine-1 dans le guidage axonal

Les études réalisées après l'identification de la Nétrine-1 suggéraient toutes qu'elle joue un rôle essentiel au cours du guidage axonal. La preuve définitive fut apportée par l'invalidation de la *nétrine-1* chez la souris(Serafini et al., 1996). En effet, cette étude démontra le rôle clef de la Nétrine-1 lors de la mise en place de nombreuses structures du SNC, notamment au niveau de la ligne médiane. Les souris invalidées pour

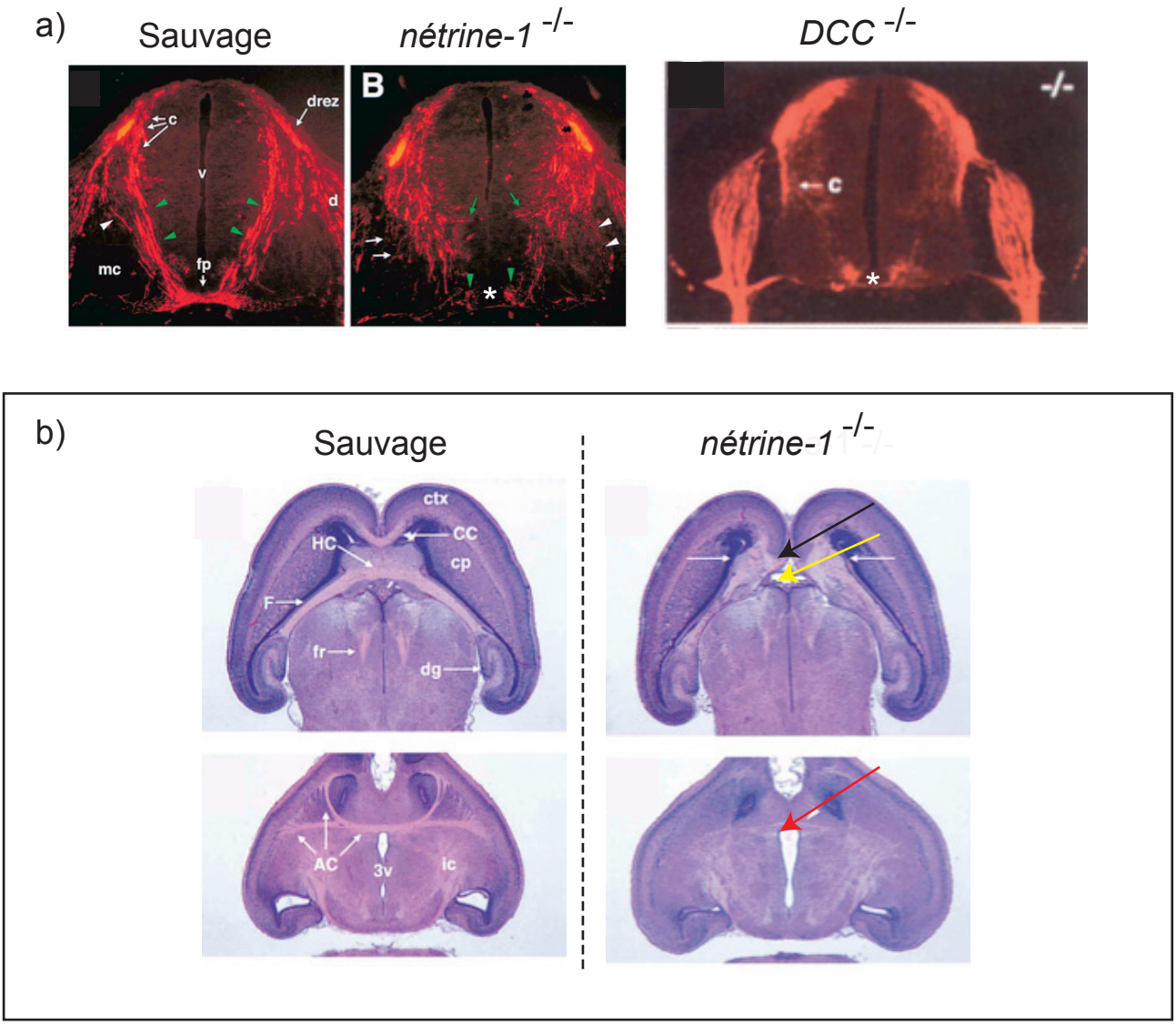


Figure 10 : Défaut des commissures des souris invalidées pour la *nétrine-1* ou *DCC*
(a) Dans la moelle épinière des embryons invalidés pour la *nétrine-1* ou pour *DCC*, on observe l'absence de commissure ventrale (*). Observation en immunohistofluorescence de coupes transversales marquées par un anticorps dirigé contre Tag-1.
(b) L'invalidation de la *nétrine-1* conduit à l'absence de corps calleux (flèche noire), de commissure hippocampique (flèche jaune) et de commissure antérieure (flèche rouge). Observation après coloration à l'hématoxiline/éosine sur des coupes coronales de cerveau. c: neurones commissuraux, mc: colone motrice, drez: zone d'entrée de la racine dorsale, d: racine ganglionnaire dorsal, fp :plaque du plancher, ctx: cortex cérébral, cc: corps calleux, hc: commissure hippocampique, AC: commissure antérieure
(Adapté de Serafini et *al*, 1996; Fazeli et *al*, 1997)

la *nétrine-1* présentent en effet des défauts des projections commissurales. En l'occurrence, le corps calleux ainsi que les commissures hippocampique, antérieure et spinale ventrale sont sévèrement touchés(Serafini et al., 1996)(figure 10). L'analyse approfondie de ces souris permit également d'observer que la Nétrine-1 joue un rôle important pour le guidage axonal d'autres types de neurones comme les neurones rétiniens(Deiner et al., 1997).

D'autre part, l'invalidation que ce soit de la *nétrine-1* ou de son récepteur *DCC*, est à l'origine de défauts très similaires puisque les mêmes commissures sont absentes ou désorganisées chez les deux mutants(Fazeli et al., 1997)(figure 10 a). L'importance du rôle du couple DCC/Nétrine-1 est soulignée par le fait que les nouveaux-nés Knock-out pour l'un ou l'autre de ces gènes meurent à la naissance, suggérant que ce couple récepteur/ligand est fondamental pour le développement.

L'analyse de ces modèles murins et d'autres études ont permis de démontrer que la Nétrine-1 est un facteur de guidage à double facette puisqu'elle peut être chimioattractive ou chimiorépulsive selon les cas.

2-1-2-1 La Nétrine-1 est une molécule chimioattractive

L'hypothèse selon laquelle la Nétrine-1 serait une molécule chimioattractive a été proposée d'après les travaux du groupe de Marc Tessier-Lavigne qui découvrit que des cellules exprimant la Nétrine-1 sont capables de favoriser et réorienter la croissance des axones commissuraux à longue distance(Kennedy et al., 1994). Cette Hypothèse fut définitivement validée par l'analyse phénotypique des souris invalidées pour la *nétrine-1* chez lesquelles on note une absence des commissures spinales ventrales (figure 10). Ce phénotype s'explique par le fait que la grande majorité des axones commissuraux n'est plus capable d'atteindre la ligne médiane(Serafini et al., 1996). De plus, la mise en co-culture de la partie dorsale d'une moelle épinière « sauvage » avec une plaque du plancher issue d'un embryon invalidé pour la *nétrine-1* n'est pas capable de favoriser la croissance des axones commissuraux(Serafini et al., 1996). Ces observations suggèrent que la Nétrine-1 attire les axones commissuraux jusqu'à la ligne médiane *via* un effet à longue distance. En outre, les souris invalidées pour *DCC* présentant globalement le même phénotype (Fazeli et al., 1997), ceci confirme que DCC médie l'attraction en réponse à la Nétrine-1.

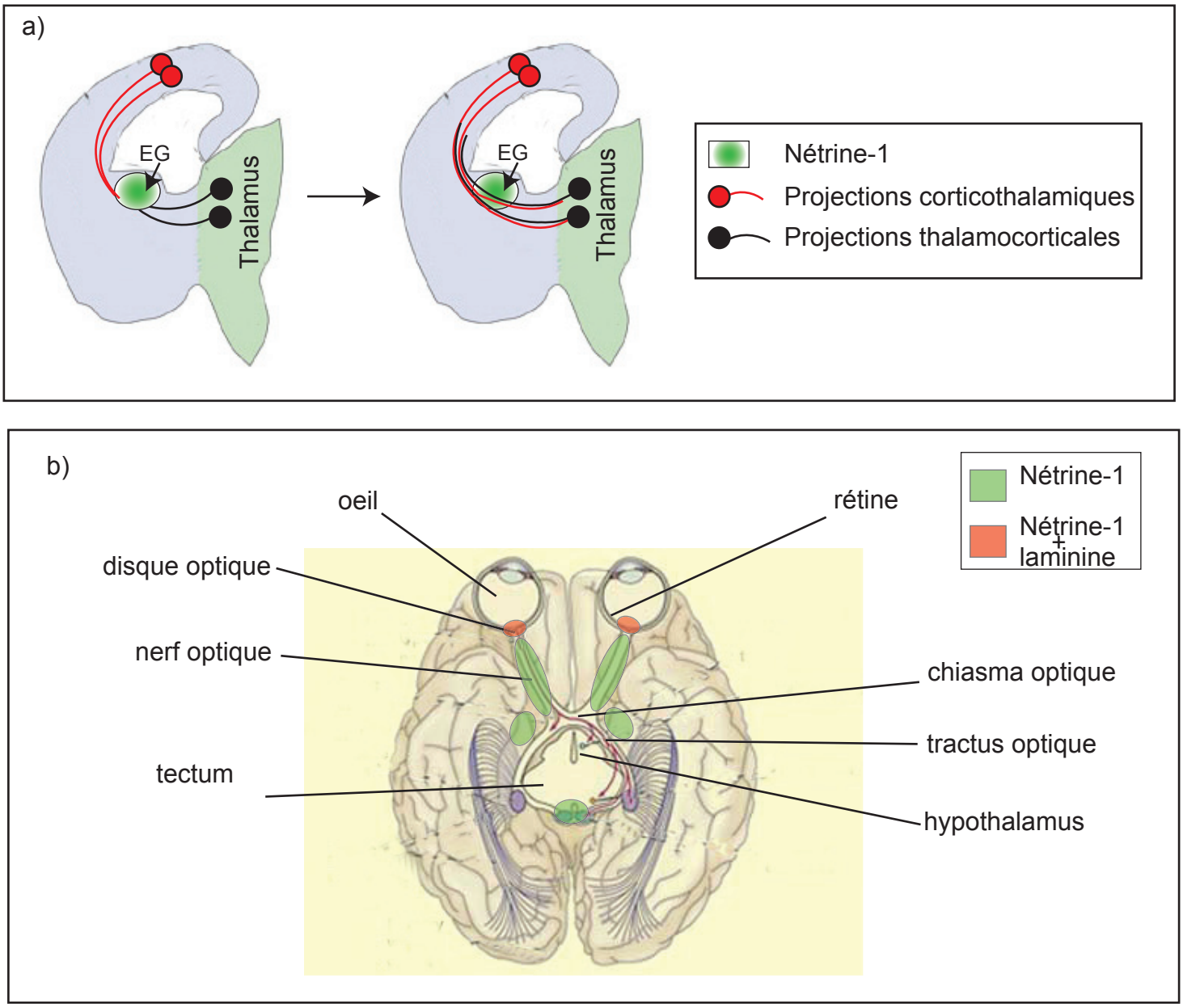


Figure 11 : Rôle de la Nétrine-1 dans le guidage axonal
(a) Rôle de la Nétrine-1 dans la mise en place des projections corticothalamiques et thalamocorticales (EG: Eminence Ganglionnaire)
(b) Rôle de la Nétrine-1 dans le développement du système visuel.

D'autre part, l'invalidation de la *nétrine-1* conduit aussi à des innervations aberrantes, notamment pour la commissure hippocampique, conduisant ainsi à des perturbations de l'activité électrique des neurones(Barallobre et al., 2000; Pascual et al., 2004). De plus dans l'hippocampe, l'invalidation de la *nétrine-1* perturbe aussi les projections ipsilattérales(Barallobre et al., 2000).

En effet, le rôle chimioattracteur de la Nétrine-1 ne se restreint pas uniquement à la mise en place des commissures. La Nétrine-1 guide également différents types de projections corticales comme les projections corticothalamiques/thalamocorticales et les projections corticospinales.

Les projections corticothalamiques et thalamocorticales sont des projections réciproques ipsilattérales entre des aires corticales et des noyaux thalamiques. Chez la souris, lors de leur mise en place, les projections corticothalamiques et thalamocorticales convergent indépendamment vers le télencéphale basal où se trouve l'éminence ganglionnaire (EG) servant de cible intermédiaire pour ces axones (figure 11 a). Une fois au contact les uns des autres, les axones corticothalamiques et thalamocorticaux s'utilisent ensuite les uns/les autres comme substrat pour atteindre leurs cibles respectives, à savoir le thalamus pour les axones corticothalamiques, et le cortex pour les axones thalamocorticaux (figure 11 a). Sachant que l'EG favorise et oriente la pousse axonale corticale(Metin et al., 1997)et qu'elle exprime la Nétrine-1(Serafini et al., 1996), il fut décidé de tester le rôle de cette dernière sur le guidage des axones corticaux. Il s'avère que la Nétrine-1 réoriente la croissance axonale et que cet effet est bloqué par un anticorps titrant la Nétrine-1(Metin et al., 1997). Cette étude suggère donc que la Nétrine-1 pourrait guider les axones corticaux jusqu'à l'EG. De la même manière, une étude a été réalisée afin de tester le rôle de la Nétrine-1 produite par l'EG lors des projection thalamocorticales(Braisted et al., 2000). Les auteurs ont démontré que la Nétrine-1 favorise la pousse des axones thalamiques et les attire *in vitro,* et que cet effet est aboli par l'ajout d'un anticorps bloquant. De plus, l'analyse d'embryons invalidés pour la *nétrine-1* permet d'observer des défauts des projections thalamocorticales. Elles sont désorganisées et réduites suggérant que la Nétrine-1 est nécessaire à leur bon développement.

Les projections corticospinales qui acheminent les informations permettant la coordination des membres, sont également perturbées lors de l'invalidation de la *nétrine-1*(Finger et al., 2002). C'est ce que confirme indirectement l'analyse

phénotypique d'une mutation spontanée de *DCC* (délétion de l'exon 29). Les souris « Kanga » affectées par cette mutation présentent en effet des défauts des fibres corticospinales se traduisant par une symétrie des mouvements des membres droits et gauches aboutissant à une démarche de kangourou(Finger et al., 2002).
Par ailleurs, le couple DCC/Nétrine-1 participe aussi au guidage des axones GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone) dans l'hypothalamus. En effet, l'invalidation de la *nétrine-1* ou de son récepteur *DCC* diminue fortement les projections axonales des neurones GnRHs(Deiner and Sretavan, 1999).

Un autre système dont la mise en place est régulée par le couple DCC/Nétrine-1 est le système visuel dont le développement requiert une innervation appropriée des centres de la vision par les cellules ganglionnaires rétiniennes (CGR). Les axones des CGRs doivent quitter l'œil au niveau du disque optique pour rejoindre le nerf optique (figure 11 b). Les axones des CGRs traversent ensuite la ligne médiane ventrale au niveau de l'hypothalamus, formant une commissure appelée le chiasma optique. Les CGRs s'étendent ensuite sur le tectum. La Nétrine-1 et son récepteur DCC sont impliqués au cours de ces étapes. En effet, les CGRs expriment DCC, et la Nétrine-1 est présente le long de leur trajet(de la Torre et al., 1997; Deiner et al., 1997). Dans ces études, les auteurs ont démontré que la Nétrine-1 favorise la pousse et attire les axones rétiniens, tandis qu'un anticorps bloquant l'interaction DCC/ Nétrine-1 abolit cet effet. Cela démontre que l'activité de la Nétrine-1 est médiée *via* DCC. Chez la souris, l'invalidation de la *nétrine-1* ou de *DCC* conduit à une hypoplasie du nerf optique(Deiner et al., 1997). Celle-ci est due au fait que dans leur grande majorité, les axones rétiniens ne sortent pas du disque optique ; nous en verrons la raison dans le paragraphe suivant. Néanmoins, certains arrivent à quitter le disque optique, mais après leur entrée dans l'hypothalamus, ils se projettent anormalement. Ils franchissent en effet la ligne médiane dans une région postérieure(Deiner and Sretavan, 1999).

Le rôle chimioattracteur de la Nétrine-1 est également conservé chez les Invertébrés. Chez *C. elegans*, Unc-6/Nétrine est exprimée dans la région ventrale et forme donc un gradient ventro-dorsal. Ce gradient attire les axones des neurones qui expriment Unc-40/DCC situés dans la partie dorsale et qui forment les projections circonférentielles dorso-ventrales(Hedgecock et al., 1990; Ishii et al., 1992). La

production ventrale de Unc-6 stimule aussi la croissance dendritique des motoneurones le long de la ligne médiane *via* Unc-40/DCC(Teichmann and Shen). Chez la drosophile, la Nétrine-A oriente également les dendrites des neurones sensitifs de manière dépendante de Frazzled(Mrkusich et al., 2010), D'autre part, toujours chez la drosophile, la formation des commissures est abolie lors de l'invalidation des Nétrines -A, et -B ou de leur récepteur Frazzled(Harris et al., 1996; Kolodziej et al., 1996). Néanmoins, une étude démontre que les Nétrines -A et -B dont on pensait jusque là qu'elles jouaient un rôle chimiotropique, agiraient plutôt à courte distance. En effet, l'invalidation des Nétrines -A et -B n'empêche pas l'orientation des axones vers la ligne médiane, mais prohibe seulement le franchissement de cette dernière. De plus, l'expression d'une forme ancrée à la membrane de Nétrine-B restaure les commissures d'embryons invalidés pour les Nétrines -A et -B(Brankatschk and Dickson, 2006).

L'attraction du cône de croissance médiée par la Nétrine-1 *via* son récepteur DCC est donc clairement établie dans le SNC. De plus, cette activité est conservée au cours de l'évolution avec toutefois quelques subtilités en terme d'activité à longue ou courte distance.

La Nétrine-1 n'est pas seulement une molécule chimioattractive. En effet, la présence de certains récepteurs à la Nétrine-1 peut convertir l'attraction en répulsion. Nous venons de voir que chez *C. elegans*, Unc-6 stimule la croissance des dendrites des motoneurones *via* Unc-40/DCC(Teichmann and Shen). Or, ces mêmes neurones expriment au niveau axonal le récepteur Unc-5 qui repousse dorsalement l'axone en réponse à Unc-6. Nous allons maintenant nous intéresser à l'activité chimiorépulsive de la Nétrine-1.

2-1-2-2 La Nétrine-1 est aussi une molécule chimiorépulsive

Après l'identification de la Nétrine-1, un grand nombre de preuves s'accumulèrent pour dire que la Nétrine-1 est une molécule de guidage bifonctionnelle. En effet chez *C. elegans*, les projections circonférentielles ventro-dorsales requièrent les récepteurs Unc-40 (DCC) et Unc-5 en réponse au gradient ventro-dorsal de unc-6/Nétrine. Cette observation suggérait que les axones exprimant à la fois Unc-40 et Unc-5 sont repoussés par Unc-6(Chan et al., 1996). D'autre part chez le rat, deux études démontrèrent que les axones de certains motoneurones crâniens sont repoussés par la Nétrine-1(Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995a; Varela-Echavarria et al., 1997). Parmi ceux-ci les neurones trochléaires sont un cas particulier puisqu'ils présentent des

projections axonales globalement normales lors de l'invalidation de la *nétrine-1* suggérant que des facteurs chimiotrophiques additionnels pourraient intervenir(Serafini et al., 1996). Pour les autres, les bases moléculaires de cette répulsion furent apportées grâce à des expériences de turning-assay dans lesquelles l'expression ectopique de Unc-5h2 convertit l'attraction médiée par DCC vis à vis de la Nétrine-1 en répulsion(Hong et al., 1999).

Cette action conjointe des récepteurs Unc5 et DCC a également été décrite dans plusieurs autres modèles, comme chez la souris, où les motoneurones spinaux accessoires sont situés dans la région ventrale d'où ils projettent dorsalement pour innerver les muscles du cou. Ces neurones expriment DCC et Unc-5h3. L'invalidation de la *nétrine-1* ou de *DCC* conduit à des défauts de projections puisque certains axones projettent ventralement(Dillon et al., 2005). En outre, la migration dorsale des motoneurones spinaux accessoires est abolie chez les souris invalidées pour *unc-5h3*, suggérant que DCC et Unc-5h3 collaborent pour repousser ces axones(Dillon et al., 2007).

D'autre part, la Nétrine-1 a aussi une activité chimiorépulsive pour certains axones thalamocorticaux(Powell et al., 2008). Si les axones thalamiques rostraux expriment DCC et sont attirés par la Nétrine-1 comme nous avons pu le voir dans le paragraphe précédent, les axones thalamiques caudaux sont quant à eux repoussés par la Nétrine-1. Au niveau moléculaire, il a été montré qu'en dehors de DCC, les axones thalamiques caudaux expriment également les récepteurs Unc-5h1, -2 et -3 qui collaborent avec DCC pour permettre la répulsion par la Nétrine-1(Powell et al., 2008). De la même manière, au cours du développement postnatal du cervelet, les fibres parallèles sont repoussées par la Nétrine-1(Alcantara et al., 2000). Ces fibres expriment DCC, Unc5h -2 et -3 suggérant que la répulsion par la Nétrine-1 pourrait être médiée par le complexe DCC/Unc5h.

Chez la souris, les neurones des ganglions rachidiens (Dorsal root ganglion: DRG) expriment Unc5h3 et sont repoussés par la Nétrine-1. L'invalidation de la *nétrine-1* conduit à des défauts de projections des DRGs vers la moelle épinière(Masuda et al., 2008). D'autre part après avoir atteint la moelle épinière, les axones de ces neurones s'arrêtent et subissent une période d'attente(Watanabe et al., 2006). Cette période d'attente est médiée à la fois par la Nétrine-1 qui est légèrement exprimée dans la région dorsolatérale où entrent les axones des DRGs, ainsi que par son récepteur Unc5h3

exprimé par les axones des DRGs. En effet, l'invalidation de la *nétrine-1* ou de *Unc5h3* conduit à l'invasion anormale des axones des DRGs dans la moelle épinière(Watanabe et al., 2006).

Jusqu'ici, nous avons vu que chez les Vertébrés la répulsion vis à vis de la Nétrine-1 nécessite la présence de DCC et des récepteurs Unc-5. Ce n'est pas le cas chez la drosophile pour laquelle la répulsion médiée par la Nétrine-1 n'est pas obligatoirement associée à la présence de Frazzled/DCC(Keleman and Dickson, 2001). En effet, l'expression ectopique de Unc-5 dans des neurones commissuraux invalidés ou non pour *Frazzled* mène dans tous les cas à la répulsion de ces axones lorsqu'ils atteignent la ligne médiane. Cette observation suggère que Unc-5 est capable de médier seul l'activité répulsive à courte distance de la Nétrine-1(Keleman and Dickson, 2001). En revanche, en travaillant sur une population d'interneurones se projettant ipsilatéralement, les auteurs ont montré que lorsqu'ils expriment Unc-5 de manière ectopique, tous ces axones quittent le SNC, contre seulement la moitié d'entre eux en l'absence de Frazzled. L'activité répulsive à longue distance de la Nétrine-1 requiert donc la présence de Frazzled(Keleman and Dickson, 2001).

Pour en revenir aux Vertébrés, le rôle chimiorépulseur de la Nétrine-1 peut parfois s'expliquer autrement que par l'intervention des récepteurs unc5. C'est par exemple le cas du modèle du système visuel dans lequel, outre son rôle chimioattracteur lors de la mise en place des projections rétinotectales, la Nétrine-1 joue aussi un rôle répulsif. En effet, l'hypoplasie du nerf optique observée lors de l'invalidation de la *nétrine-1* est causée par l'incapacité des axones rétiniens à quitter le disque optique pour entrer dans le nerf(Deiner et al., 1997). Au niveau du disque optique, la Nétrine-1 repousse les axones rétiniens dans le nerf optique afin qu'ils projettent sur le tectum. Cette répulsion est uniquement médiée par DCC puisque le récepteur Unc-5 de xénope est absent dans ces neurones(Anderson and Holt, 2002). En outre, le disque optique contient de la laminine-1, or la présence de laminine-1 est capable de convertir l'attraction du cône de croissance en répulsion en diminuant le niveau d'AMPc intracellulaire(Hopker et al., 1999). En ce sens, la combinaison Nétrine-1/laminine-1 pourrait « pousser » à l'extérieur du disque optique les axones rétiniens vers le nerf optique (figure 11 b).

Après être entrés dans le nerf optique, les axones rétiniens sont repoussés par la nétrine-1. En effet, des axones rétiniens de xénope qui naviguent dans le nerf optique

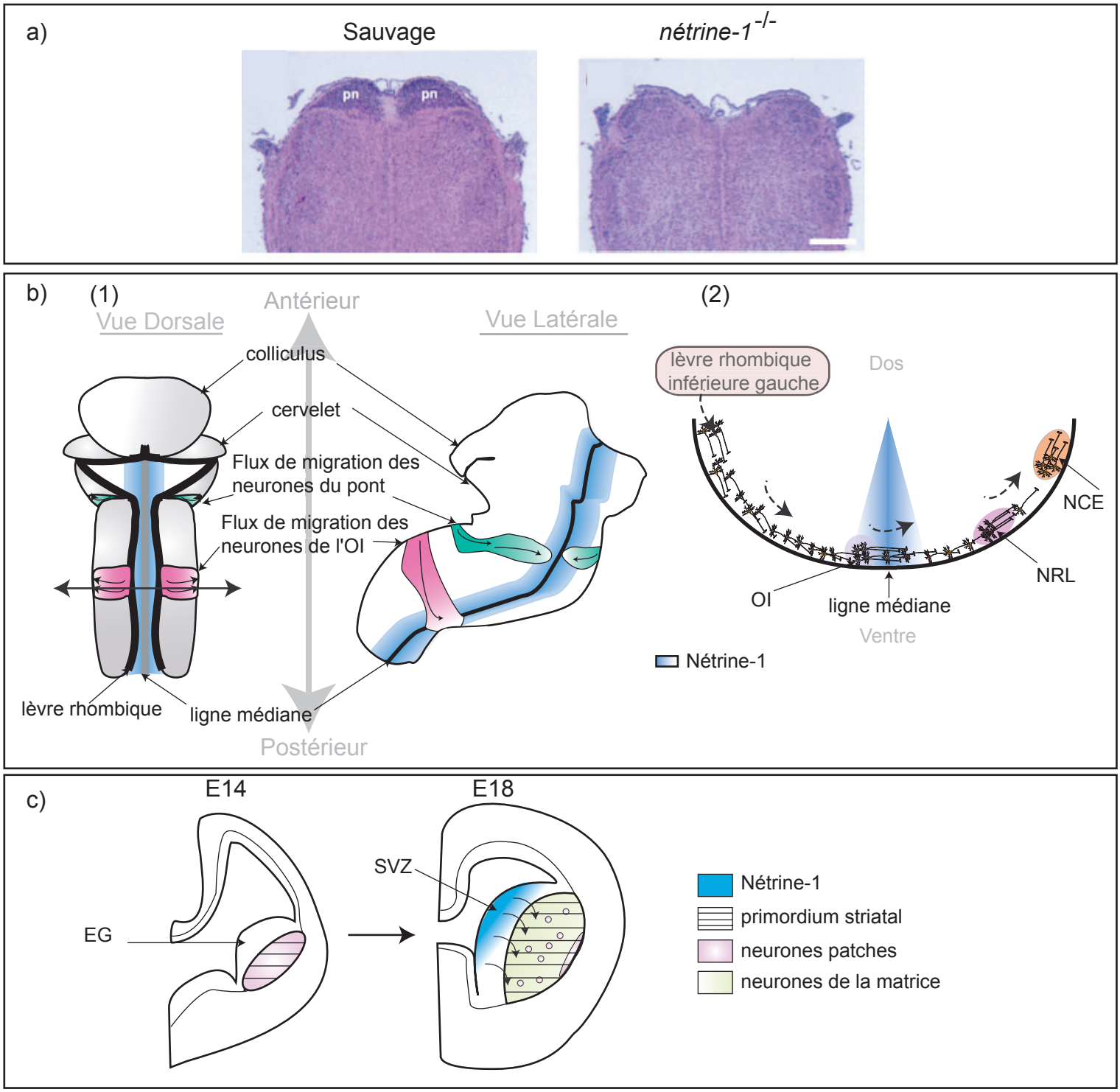


Figure 12: Contribution de la Nétrine-1 à la migration neuronale

(a) Les noyaux pontins (pn) sont complètement absents chez l'embryon invalidé pour la *nétrine-1*. (Adapté de Serafini et *al*, 1996)

(b) Rôle attractif de la Nétrine-1 au cours de la migration des neurones précérébelleux vers la ligne médiane. (1) Représentations en vue dorsale et latérale du tronc cérébral permettant de voir la migration des neurones du pont et de l'olive inférieure (OI). Les neurones de l'OI sont générés au niveau des lèvres rhombiques et migrent vers la ligne médiane en réponse à la Nétrine-1. Les neurones du pont migrent tout d'abord en direction rostrale puis dans un second temps vers la ligne médiane en réponse à la Nétrine-1. (2) Représentation d'une coupe transversale partielle du tronc cérébral au niveau de la double flèche sur (1),permettant de mettre en évidence le flux de migration de trois types de neurones précérébelleux. Les neurones de l'OI s'arrêtent avant la ligne médiane, seuls traversent leurs axones. Les neurones des noyaux réticulaires latéraux (NRL) et les neurones des noyaux cunéatus externe (NCE) franchissent la ligne médiane pour atteindre leurs positions définitives du côté contralatéral. Ne sont représentés que les neurones issus de la lèvre rhombique gauche.

(c) Activité répulsive de la Nétrine-1 sur les neurones de la SVZ au niveau du striatum. Coupes transversales au niveau du télencéphale à E14 et E18 chez la souris. La formation du primordium striatal au niveau de l'éminence ganglionnaire par les cellules patches est suivie de l'envahissement par les cellules de la matrice qui sont repoussées par la Nétrine-1 produite par la zone sous ventriculaire.

sont insensibles à la Nétrine-1, alors que ceux qui ont franchi le chiasma sont repoussés par la Nétrine-1(Shewan et al., 2002). De plus, les axones rétiniens sont exclus des zones d'expression de la Nétrine-1(Shewan et al., 2002). Cette observation suggère que la présence de la Nétrine-1 comme molécule répulsive durant la navigation du cône de croissance contraindrait la croissance des axones rétiniens dans la bonne voie. Le changement de réponse de la part des neurones rétiniens de xénope après le chiasma pourrait s'expliquer par la présence du récepteur A2b. En effet, le niveau d'expression de celui-ci est élevé chez les jeunes axones rétiniens puis diminue au cours du développement. Or A2b stimule la production d'AMPc (dont nous verrons le rôle dans la signalisation de la Nétrine-1 au cours du chapitre 3) en présence de Nétrine-1, favorisant ainsi l'attraction du cône de croissance en réponse à la nétrine-1(Corset et al., 2000; Ming et al., 1997; Shewan et al., 2002). De plus, l'ajout d'un agoniste d'A2b convertit la répulsion par la Nétrine-1 en attraction sur des « vieux » cônes de croissance(Shewan et al., 2002). Ces résultats suggèrent donc que c'est la diminution de l'expression de A2b qui serait responsable de la conversion de l'attraction en répulsion.

L'activité chimiorépulsive de la Nétrine-1 est donc régulée de différentes façons. En effet, elle peut être médiée soit par les récepteurs Unc-5h (seuls ou avec DCC), soit par l'état physiologique du cône de croissance en présence de DCC, et notamment le niveau d'AMPc ; celui-ci puvant être dépendant de différents paramètres, dont par exemple, la présence d'un substrat particulier, comme la laminine-1.

2-2 La Nétrine-1 et migration neuronale

L'implication de la Nétrine-1 au cours de la migration neuronale fut initialement démontrée chez *C. elegans* où le mutant unc-6 présentait des défauts de migration(Hedgecock et al., 1990) puis fut confirmée par l'analyse des souris invalidées pour la *nétrine-1*. Les mutants n'ont plus de noyaux du pont (structures formées de neurones précérébelleux situés dans le tronc cérébral)(Serafini et al., 1996)(figure 12 a).

2-2-1 La migration neuronale

La migration neuronale avec le guidage axonal, est un processus fondamental au cours du développement du SNC, puisqu'elle va permettre la bonne localisation des

neurones et par conséquent l'établissement d'un circuit neuronal fonctionnel. En effet, les neurones post-mitotiques sont produits par l'épithélium proliférateur situé dans une zone au contact de la lumière du tube neural appelée zone ventriculaire (VZ). De la VZ, les neurones vont se disperser afin de coloniser le SNC. Pour ce faire, ils vont adopter deux stratégies principales : la migration radiale ou la migration tangentielle(Huang, 2009; Marin et al.; Nadarajah and Parnavelas, 2002).

La migration radiale consiste au déplacement des neurones le long des fibres de glie radiale qui s'étendent sur toute l'épaisseur du tube neural, perpendiculairement à la surface ventriculaire. En revanche, les neurones migrant tangentiellement suivent quant à eux une trajectoire parallèle à la surface du cerveau.

Quel que soit le type de migration adopté, un neurone en mouvement est polarisé. Dans le sens de son mouvement, il possède dans sa région antérieure une structure appelée : prolongement guide. C'est une structure avec un cytosquelette particulièrement complexe, s'apparentant à celui retrouvé au niveau du cône de croissance. D'ailleurs, tout comme ce dernier, le prolongement guide joue un rôle important dans la détection des signaux extracellulaires, permettant ainsi le guidage des neurones(Yee et al., 1999).

Le mouvement des neurones peut se décomposer en trois étapes se répétant successivement. (i) Le neurone étend son prolongement guide. (ii) Ensuite, le noyau se déplace selon un mouvement saltatoire vers le prolongement guide. Ce processus est appelé nucléokinèse. (iii) Enfin, le neurone rétracte sa partie arrière. Le neurone peut alors reproduire ce cycle d'évènements autant de fois que nécessaire pour continuer sa migration jusqu'à sa destination finale(Huang, 2009; Marin et al., 2010).

Bien qu'apparentés, la migration neuronale et le guidage axonal sont deux processus essentiellement indépendants dont la coordination est nécessaire au développement normal du SNC. Parfois même, le prolongement guide est à l'origine de l'axone du neurone(Gilthorpe et al., 2002). En outre, ces deux processus sont régulés par des molécules de guidage communes comme les Nétrines, les Sémaphorines et les Slits, qui vont aboutir au remaniement du cytosquelette (Marin et al., 2010).

2-2-2 La Nétrine-1 guide la migration neuronale

L'absence de noyaux pontins lors de l'invalidation de la *nétrine-1* chez la souris conduisit plusieurs groupes à étudier le rôle de cette protéine lors de la migration des neurones précérébelleux. Les noyaux pontins (NP), les noyaux du cunéatus externe

(NCE), les noyaux réticulaires latéraux (NRL) et les noyaux de l'olive inférieure (NOI) sont des structures paires et sont générés par le neuroépithélium rhombencéphalique dorsal, appelé aussi lèvre rhombique inférieure (LRi) entre E10 et E14 chez la souris (figure 12 b-1). Les neurones des NCE, des NRL et des NOI vont migrer tangentiellement jusqu'à la ligne médiane. Lorsque les neurones des NOI atteignent la ligne médiane, ils projettent leurs axones controlattérallement vers le cervelet. En revanche, les corps cellulaires des neurones des NCE et des NRL franchissent la ligne médiane et se positionnent du côté controlatéral à leur origine (figure 12 b-2). Les neurones des NPs réalisent une migration rostrale vers leur localisation finale à proximité de la ligne médiane. Comme pour les neurones des NOI, les corps cellulaires des neurones des NP s'arrêtent avant de franchir la ligne médiane (figure 12 b-2).

L'étude de ces différents noyaux précérébelleux chez les embryons invalidés pour la *nétrine-1* a permis de démontrer le rôle fondamental de cette molécule au cours de la migration de ces neurones. En effet, l'absence de Nétrine-1 conduit à une désorganisation des NOI, à la présence de noyaux olivaires ectopiques le long du trajet de migration des neurones olivaires et à une diminution du nombre de neurones olivaires(Bloch-Gallego et al., 1999). De plus, les neurones olivaires qui atteignent la ligne médiane projettent leurs axones ipsilatérallement au lieu de les projeter controlatérallement. Le rôle d'attraction à la ligne médiane est médié par DCC, car il a été montré que ces neurones expriment DCC et que l'invalidation de celui-ci conduit à un phénotype relativement proche de celui des mutants *nétrine-1*(Marcos et al., 2009). Toutefois, le franchissement de la ligne médiane par les axones des neurones olivaires ne semble pas dépendant de DCC car lors de son invalidation, les neurones olivaires ayant atteint la ligne médiane projettent leur axone controlatérallement(Marcos et al., 2009). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'intervention d'un autre récepteur à la Nétrine-1 ou par la présence d'autres facteurs de guidage comme les Slits et leurs récepteurs Robos(Causeret et al., 2002; Di Meglio et al., 2008; Stein and Tessier-Lavigne, 2001). D'autre part, contrairement à l'invalidation de la *nétrine-1*, celle de *DCC* n'entraine pas de diminution du nombre de neurones olivaires, suggérant ainsi un rôle potentiel de facteur de survie pour la Nétrine-1(Marcos et al., 2009). Nous discuterons de ce point dans le chapitre 3.

Une expérience *in vitro* a permis de montrer que les neurones des NRL, des NCE et des NP sont eux aussi attirés par la Nétrine-1(Alcantara et al., 2000; Yee et al., 1999). En

effet, les auteurs de ces articles ont réalisé des co-cultures de lèvres rhombiques et de plaque du plancher ou de cellules exprimant la Nétrine-1 et ont observé que les neurones migrant sont attirés par une source de Nétrine-1. En outre, l'analyse des souris invalidées pour la *nétrine-1* ou pour *DCC* démontre que les prolongements guide des neurones des NP ne sont plus capables d'atteindre la ligne médiane ventrale, confirmant ainsi le rôle clef de la Nétrine-1 lors de la mise en place des noyaux précérébelleux(Yee et al., 1999).

Le rôle de la Nétrine-1 ne s'arrête pas aux neurones précérébelleux puisqu'elle est aussi impliquée dans la migration des neurones cérébelleux. En effet, les interneurones gabaergiques sont repoussés par la Nétrine-1(Guijarro et al., 2006). De plus, la mutation rcm (rostral cerebellar malformation) invalidant le gène *unc5h3* conduit à des défauts de migration des cellules granulaires(Ackerman et al., 1997).

Le couple DCC/Nétrine-1 est aussi impliqué dans la migration des neurones formant le tractus olfactif latéral et dans celle des neurones LHRH (luteinising Hormone-Releasing Hormone)(Kawasaki et al., 2006; Schwarting et al., 2001; Schwarting et al., 2004). Ces neurones sont attirés par la Nétrine-1 de manière dépendante de DCC. En effet, les souris invalidées pour la *nétrine-1* ou *DCC* présentent des défauts de migration de ces neurones. Par ailleurs, les neurones mésencéphaliques dopaminergiques ne sont plus capables de migrer en absence de DCC(Xu et al., 2010).

D'autre part, au cours du développement du striatum (noyau caudé et putamen) deux types de neurones sont générés successivement : les neurones « patches » et les neurones de la matrice (figure 12 c). Les neurones patches sont à l'origine d'un primordium striatal en position latérale de la LEG (éminence ganglionnaire latérale) qui est ensuite envahi par les cellules de la matrice provenant de la zone sous ventriculaire (SVZ) du striatum. En effet, les cellules de la SVZ sont repoussées par la Nétrine-1 exprimée par la zone sous ventriculaire(Hamasaki et al., 2001). De la même manière, le couple DCC/Nétrine-1 repousse les motoneurones spinaux accessoires(Dillon et al., 2005).

2-2-3 La Nétrine-1 et la migration des cellules non neuronales

La Nétrine-1 contrôle aussi la migration des cellules non neuronales du système nerveux. Elle est impliquée dans la migration des précurseurs des cellules gliales (PG).

Chez les mammifères, les PGs sont principalement générés durant la période périnatale. Le SNC étant déjà largement développé, les PGs doivent migrer de leur lieu de production, des foyers restreints du neuroépithélium germinatif, vers l'ensemble du SNC. Ils doivent par conséquent parcourir de très longues distances. Lors de leur migration, les PGs ont une morphologie cellulaire similaire à celle des neurones en migration tangentielle(Tamamaki et al., 1997). En ce sens, des études ont testé le rôle des molécules de guidage au cours de la migration des PGs, notamment l'intervention de la Nétrine-1.

Une première étude s'est intéressée à la migration des PGs dans le nerf optique(Sugimoto et al., 2001)et a notamment démontré que le chiasma a une activité répulsive sur les PGs. Cette activité est médiée par la Nétrine-1 et la sémaphorine 3A. En effet, les auteurs ont démontré grâce à des expériences de co-culture qu'il existe deux types de PGs dans le nerf optique : des PGs repoussés par la Nétrine-1 et non affectés par la Sémaphorine 3A, et des PGs repoussés par la Sémaphorine 3A, mais non par la Nétrine-1(Sugimoto et al., 2001). Toutefois, une autre étude décrit la Nétrine-1 comme une molécule attractive (*via* DCC) pour les PGs dans le nerf optique(Spassky et al., 2002). Si la première étude a été réalisée sur des nouveaux-nés, la seconde l'a été sur des embryons à E18.5. En ce sens, il est possible que lors des étapes précoces, la Nétrine-1 attire les PGs dans le nerf optique, et qu'ensuite elle les repousse afin qu'ils colonisent l'intégralité du nerf optique. En outre, ce changement de comportement des PGs peut s'expliquer par l'augmentation de l'expression du récepteur unc5h1 entre E18.5 et P5(Spassky et al., 2002).

La Nétrine-1 contrôle également la migration des précurseurs des cellules oligodendritiques (PO) de la moelle épinière(Jarjour et al., 2003; Tsai et al., 2003). Les POs sont générés dans la zone ventriculaire ventrale de la moelle épinière d'où ils se dispersent vers la matière blanche et grise. Cette dispersion est en partie médiée par la Nétrine-1. En effet, les auteurs ont démontré que la Nétrine-1 repousse les POs qui expriment à la fois DCC, Unc5h1 et Unc5h2(Jarjour et al., 2003; Tsai et al., 2003). En outre, les souris invalidées pour la *nétrine-1* ou *DCC*, présentent des défauts de migration des POs, démontrant ainsi le rôle du couple DCC/Nétrine-1 dans la migration des POs(Jarjour et al., 2003; Tsai et al., 2006). Ce couple ligand/récepteur participe aussi à la maturation des oligodendrocytes et à la maintenance des jonctions axogliales(Jarjour et al., 2008; Rajasekharan et al., 2009).

Chez la drosophile, les Nétrines participent également à la migration des cellules gliales(von Hilchen et al., 2010). La glie longitudinale (GL) est impliquée dans le guidage des axones pionniers et la fasciculation, notamment pour les axones des neurones sensitifs et ceux des motoneurones entre le SNC et le SNP. Les Nétrines -A et -B contrôlent la migration de la GL *via* DCC. D'autre part, la glie périphérique embryonnaire est quant à elle repoussée par la Nétrine-B *via* unc-5.

Enfin, la Nétrine-1 régule aussi la migration de types cellulaires n'appartenant pas au système nerveux. En particulier, elle contrôle le guidage des cellules endothéliales et des cellules de l'épithélium tubulaire proximal rénal *via* unc5B(Lu et al., 2004; Park et al., 2004; Wang et al., 2009b).

2-3 Nétrine-1 ramification neuritique et synaptogenèse

Une étude réalisée chez le xénope a démontré le rôle du couple DCC/Nétrine-1 dans la phase tardive du développement des projections rétinotectales(Manitt et al., 2009). En effet, la Nétrine-1 induit la formation de sites présynaptiques et favorise la formation de ramifications axonales. Cet effet de la Nétrine-1 sur les axones rétiniens est médié par DCC, puisqu'il est aboli par l'ajout d'un anticorps bloquant l'interaction DCC/Nétrine-1. Cette observation est en accord avec des résultats précédents chez *C. elegans* et la drosophile qui démontraient l'influence de la Nétrine-1 sur la ramification axonale et la synaptogenèse(Colon-Ramos et al., 2007; Lim et al., 1999; Winberg et al., 1998). En outre chez la souris, la Nétrine-1 module les ramifications axonales des neurones corticaux et participe à la formation des épines dendritiques (moins nombreuses chez les souris invalidées pour *DCC*) (Dent et al., 2004; Tang and Kalil, 2005). De plus, des souris hétérozygote pour *DCC* présentent une diminution de 40% de la densité d'épines dendritiques dans le cortex préfrontal(Grant et al., 2007). Dans le même ordre d'idées, une étude plus récente a démontré que la Nétrine-1 *via* DCC, favorise la pousse axonale et la formation de ramifications axonales des neurones mésencéphaliques dopaminergiques(Xu et al., 2010).

2-4 La Signalisation en aval de la Nétrine-1 et de ses récepteurs

Dans cette partie, nous allons décrypter la signalisation en aval de la Nétrine-1 et de ses récepteurs, en particulier DCC. Les récepteurs reçoivent des signaux

extracellulaires qu'ils vont convertir en messages intracellulaires afin que la cellule adopte un comportement spécifique en réponse à son environnement. En l'occurrence, le cône de croissance doit adopter un comportement d'attraction ou de répulsion en fonction des signaux de guidage rencontrés.

Nous allons décrire selon l'ordre chronologique la cascade d'évènements associée à la signalisation de la Nétrine-1. Nous verrons d'abord la réception du signal, puis son intégration, et enfin la transduction de ce signal *via* des effecteurs.

2-4-1 La réception du signal

Afin de transmettre un signal, les récepteurs doivent se trouver dans une situation propice à sa transmission. En effet, la présence des récepteurs au sein des radeaux lipidiques (des microdomaines membranaires dynamiques bien connus pour favoriser les interactions de protéines de signalisation), est essentielle lors de la transmission du signal généré par les facteurs de guidage(Guirland et al., 2004).

2-4-1-1 DCC

L'interaction de DCC avec la Nétrine-1 conduit à sa multimérisation ou dimérisation comme représenté sur figure 13(Mille et al., 2009a; Stein et al., 2001). Celle-ci est réalisée *via* le motif P3 de DCC et est nécessaire à la chimioattraction médiée par la Nétrine-1 (figure 13). En effet, la délétion du domaine P3 abolit à la fois la multimérisation de DCC en présence de Nétrine-1 et la chimioattraction associée(Stein et al., 2001). La multimérisation de DCC doit probablement aboutir à un changement conformationnel du domaine intracellulaire permettant le recrutement de sa machinerie de signalisation.

D'autre part, la localisation de DCC dans les radeaux lipidiques semble essentielle à son rôle. En effet, la détérioration des radeaux lipidiques inhibe l'orientation et la croissance axonale médiées par DCC en réponse à la Nétrine-1(Guirland et al., 2004; Herincs et al., 2005). Néanmoins, il semble que la localisation de DCC dans les radeaux lipidiques ou dans la fraction soluble contribue différemment à la signalisation de DCC. En effet, la localisation dans les radeaux lipidiques pourrait être le lieu de l'initiation de la signalisation de DCC où il serait phosphorylé par Fyn, tandis que les évènements ultérieurs comme l'activation de FAK, pourraient en partie avoir lieu dans la fraction

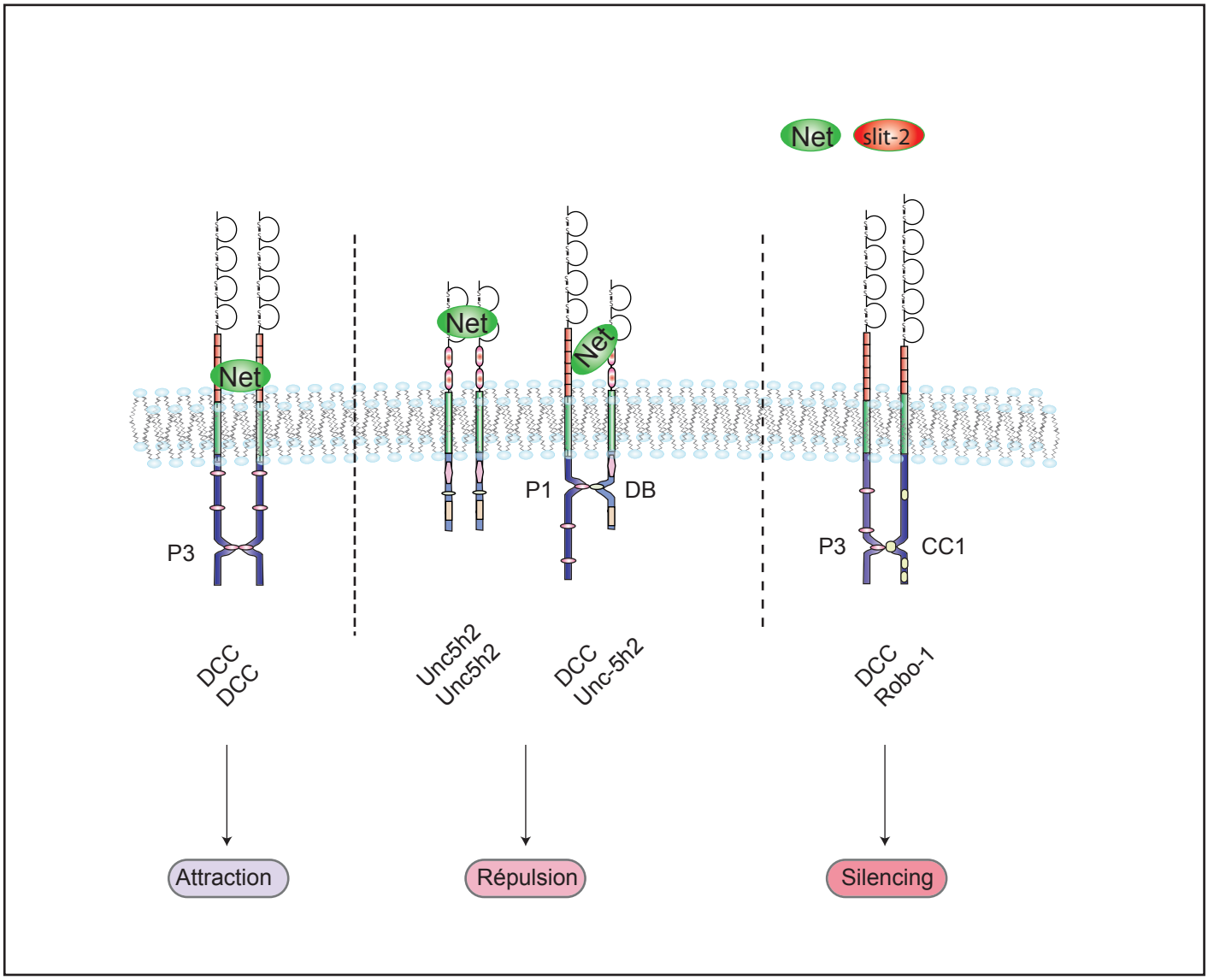


Figure 13: La réception du Signal Nétrine-1
La présence de Nétrine-1 mène à la multimérisation de DCC conduisant à l'attraction du cône de croissance. Cette multimérisation est réalisée *via* le domaine P3.
En présence de Nétrine-1, le récepteur Unc5h2 se multimérise et produit un signal de répulsion pour le cône de croissance. De la même manière, les récepteurs DCC et Unc5h2 se multimérisent respectivement *via* leurs domaines P1 et DB pour aboutir aussi à un signal répulsif.
En présence de Slit-2, le récepteur Robo-1 intéragit avec DCC *via* les domaines P3 de DCC et CC1 de Robo-1. Cette interaction inhibe l'attraction médiée par la Nétrine-1 sans abolir l'induction de croissance. Net: Nétrine-1

soluble(Petrie et al., 2009). Toutefois, ce modèle est en désaccord avec une étude qui démontre que le recrutement de FAK et son activation par le couple DCC/Nétrine-1 stimule la phosphorylation de DCC par Fyn(Li et al., 2004a).

2-4-1-2- Les récepteurs de la famille Unc5

La répulsion médiée par les récepteurs de la famille Unc5 en présence de Nétrine-1 peut être soit autonome, soit réalisée en présence de DCC. En effet chez les Invertébrés, la répulsion autonome de Unc5 est clairement établie(Keleman and Dickson, 2001), tandis que chez les Vertébrés, il existe peu de cas décrits. Parmi ceux-ci, chez la souris, les axones des DRGs, qui expriment unc5h3, sont repoussés par la Nétrine-1(Masuda et al., 2008). Comme DCC, Unc5h2 se multimérise en présence de Nétrine-1 (figure 13)(Mille et al., 2009a). Toutefois, aucune étude sur les domaines d'interaction n'a été réalisée. *A contrario*, la conversion de l'attraction en répulsion par les récepteurs Unc5 en présence de DCC est bien connue. Le groupe de Elke Stein a démontré que l'expression de unc5h2 dans des neurones exprimant DCC est capable de réaliser cette conversion(Hong et al., 1999). La présence de Nétrine-1 conduit à l'hétérodimérisation des récepteurs Unc5h2 et DCC en pontant dans un premier temps les deux récepteurs *via* leurs domaines extracellulaires. Ceci va permettre le rapprochement des domaines intracellulaires de DCC et Unc5h2 qui vont alors interagir respectivement *via* leurs domaines P1 et DB (figure 13). L'interaction entre les domaines intracellulaires est requise pour la conversion de l'attraction en répulsion. En effet, la délétion du DB de Unc5h2 prévient la conversion de l'attraction en répulsion(Hong et al., 1999). La formation de ce complexe DCC/Unc5h2 pourrait permettre le recrutement ou le remplacement de protéines de signalisation convertissant ainsi l'attraction en répulsion.

En outre, le récepteur DCC est capable d'interagir avec les récepteurs Unc5h -1 et -3. Si tout comme Unc5h2, Unc5h1 peut provoquer une répulsion, une différence a toutefois été observée entre ces deux récepteurs. Unc5h1 réduit en effet la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1, tandis que unc5h2 ne la perturbe pas(Hong et al., 1999).

2-4-1-3 Modulation de la réception du signal constitué par la Nétrine-1 par d'autres récepteurs

Le guidage axonal est un processus qui peut être réalisé sur de très longues distances comme par exemple de l'extrémité caudale de la moelle épinière jusqu'au cerveau. Dans ces conditions, le cône de croissance pour atteindre sa cible, suit une série de cibles intermédiaires qui vont successivement l'attirer puis le repousser, ou tout du moins cesser de l'attirer; on parle alors de « silencing ». Pour pouvoir continuer son chemin, le cône de croissance doit donc être capable de changer sa réponse vis à vis d'un facteur de guidage rencontré à une cible intermédiaire. C'est le cas des neurones commissuraux spinaux lorsqu'ils projettent leur axone vers la ligne médiane en réponse à la sécrétion de Nétrine-1 par les cellules de plaque du plancher (la cible intermédiaire). En effet, afin de franchir et naviguer de l'autre côté de la ligne médiane, ils ne doivent plus être attirés par la Nétrine-1. Initialement décrits chez la drosophile, les récepteurs Robos et leurs ligands les Slits, sont responsables de ce changement de comportement(Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999). Chez la souris, les Slits sont exprimés à la ligne médiane. La liaison des Slits aux récepteurs Robos abolit l'attraction par la Nétrine-1 des axones commissuraux. Ce « silencing » permet ainsi le franchissement de la ligne médiane et évite aux axones commissuraux de la retraverser dans l'autre sens(Long et al., 2004). Afin d'élucider les mécanismes moléculaires mis en jeu, des études ont été menées sur les neurones commissuraux de xénope et ont montré que dans ce modèle également, un gradient combiné de Nétrine-1 et de Slit-2 abolit l'attraction du cône de croissance par la Nétrine-1 mais pas la croissance axonale(Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Des expériences de co-immunoprécipitations précisèrent que la liaison Slit2/robo1 permet l'interaction de Robo1 avec DCC. Cette interaction fait intervenir les domaines cytoplasmiques CC1 (domaine Cytoplasmique Conservé) de Robo1 et P3 de DCC (figure 13)(Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Ces résultats furent confirmés par des expériences montrant que le blocage de cette interaction Robo1/DCC abolit le « silencing » de l'attraction par la Nétrine-1(Stein and Tessier-Lavigne, 2001).

Enfin, il faut également noter que, hormis leur rôle dans le guidage axonal, les couples Robos/Slits interviennent également lors des processus de migration neuronale, notamment pour les neurones précérébelleux(Di Meglio et al., 2008).

D'autres exemples moins connus de récepteurs modulant le signal « Nétrine-1 » sont donnés ci-après. Le premier concerne les récepteurs à la sérotonine 5-HT(1B/1D). La

présence de sérotonine (5-HT) dans le milieu extracellulaire peut en effet influencer la réponse à la Nétrine-1. Plus précisément, elle est capable de changer l'influence qu'a la Nétrine-1 vis à vis des axones thalamocorticaux. En présence de 5-HT on observe ainsi non plus de l'attraction, mais une répulsion(Bonnin et al., 2007). Les auteurs ont montré que cet effet était dû à la modulation du niveau d'AMPc, un processus par ailleurs largement mis en œuvre dont nous reparlerons plus loin.

Enfin, on peut citer chez *C. elegans*, le récepteur protéine tyrosine phosphatase clr-1 (CLeaR family member-1) qui inhibe l'attraction par Unc-40/DCC en présence de Nétrine-1 en interférant avec la voie unc34/enabled(Chang et al., 2004).

2-4-1-4 Trafic et régulation des récepteurs de guidage

La régulation de la présence des récepteurs de guidage à la surface membranaire peut fournir un mécanisme potentiel de modulation de la réponse de guidage. En effet chez la drosophile, le contrôle de franchissement de la ligne médiane par les axones commissuraux utilise un tel mécanisme. La protéine commissureless régule la présence à la surface du cône de croissance des récepteurs Robos en les séquestrant dans des endosomes avant le franchissement de la ligne médiane(Keleman et al., 2005). En revanche, du côté contralatéral, l'expression de commissureless diminue, autorisant ainsi la présence à la membrane des récepteurs Robos.

Concernant la quantité de DCC à la surface du cône de croissance, elle est régulée par la Nétrine-1 elle-même. En effet, il existe deux réserves de DCC dans les neurones commissuraux : la réserve membranaire de surface, et une réserve dans des vésicules intracellulaires. La présence de Nétrine-1 mobilise les réserves de DCC intravésiculaire et les envoie à la surface membranaire (figure 14 a)(Bouchard et al., 2004; Matsumoto and Nagashima). L'activation de la PKA (protéine Kinase A) potentialise ce trafic vésiculaire dans les neurones commissuraux de rat, mais ce sont des facteurs encore indéterminés, et non pas la Nétrine-1 qui semblent activer la PKA dans ces neurones(Bouchard et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que l'inhibition dépendante de la Nétrine-1 de RhoA favorise la présence de DCC à la surface membranaire(Moore et al., 2008a). Par ailleurs, un crible génétique chez *C. elegans* a identifié trois protéines : Unc-73 (appartenant à la famille des protéines TRIO), VAB-8 (kinesin related protein) et MIG-2 une petite GTPase de la famille Rac comme participant au contrôle du trafic de DCC à la membrane plasmique(Levy-Strumpf and

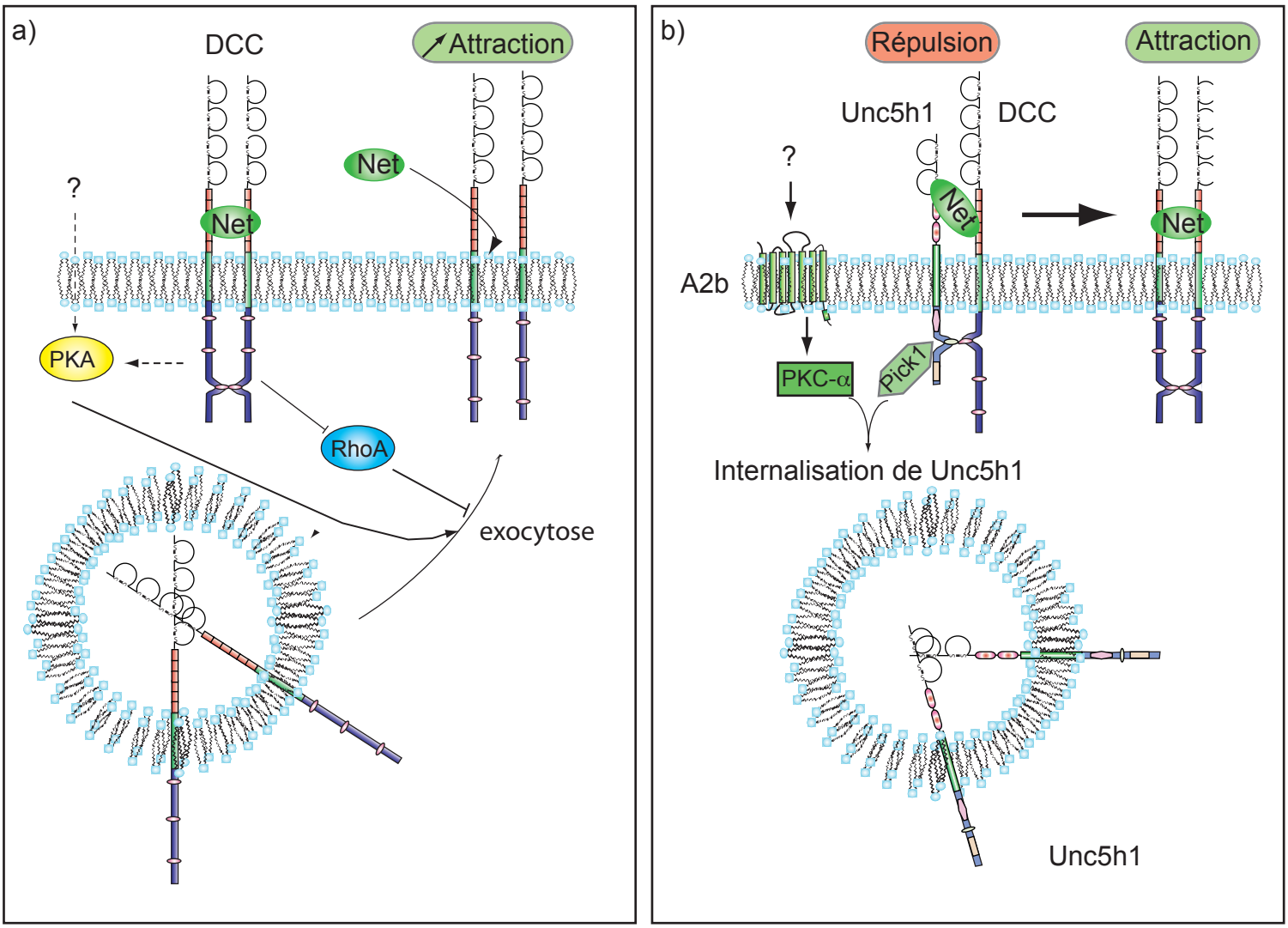


Figure 14 : Trafic membranaire des récepteurs à la Nétrine-1, DCC et unc5h2.
(a) Lors de la multimérisation de DCC en présence de Nétrine-1, les réserves de DCC intracellulaire sont transloquées à la surface cellulaire ce qui augmente l'attraction médiée par la Nétrine-1. Cette translocation est favorisée lorsque la PKA est active. En outre, l'inhibition de RhoA promeut aussi la translocation de DCC à la membrane.
(b) L'activation par A2b de la PKC-α permet son interaction avec Pick1/unc5h1 et conduit à l'internalisation de Unc5h1. Par conséquent, l'effet répulsif du complexe Unc5h1/DCC est converti en attraction puisque DCC reste seul à la membane. Net: Nétrine-1

Culotti, 2007). En effet, Unc-73 activerait sa cible MIG-2 qui collaborerait alors avec VAB-8 pour induire la présence de DCC à la membrane.

D'autre part, un autre moyen de moduler la réponse du cône de croissance est l'internalisation des récepteurs aux facteurs de guidage. L'endocytose du récepteur Unc5h1 est un bel exemple de cette régulation. Des études on montré qu'elle pouvait être artificiellement provoquée par le TPA, une drogue qui active la PKC-α (Protein Kinase C)(Bartoe et al., 2006). Chez ces neurones ainsi dépourvus de Unc5h1 membranaire, voient alors leur répulsion par la Nétrine-1 convertie en attraction. En revanche, des neurones issus de souris invalidées pour *Pick1*(Protein Interacting with C-Kinase) sont toujours repoussés par la Nétrine-1, même en présence de TPA(Bartoe et al., 2006). Tous ces travaux ont mené au modèle présenté en figure 14 b. La PKC-α activée forme un complexe avec le domaine intracellulaire de Unc5h1 et Pick1. Ce complexe induit l'endocytose du récepteur Unc5h1 et donc son élimination de la surface membranaire permettant l'attraction du cône de croissance vis à vis de la Nétrine-1(Bartoe et al., 2006; Williams et al., 2003). Quant à l'activation initiale de la PKC-α, une étude a récemment suggéré que A2b la contrôlerait, mais indépendamment de la Nétrine-1(McKenna et al., 2008).

Un autre moyen de contrôler la réponse du cône de croissance à un facteur de guidage est la dégradation protéolytique des récepteurs. Depuis, les cinq dernières années, ce nouvel aspect de la régulation des récepteurs est en train d'émerger. A l'origine de ces travaux récents, se trouve une étude menée en 1996 qui avait montré qu'une mutation dans le gène *kuzbanian* aboutissait à des défauts de franchissement de la ligne médiane chez la drosophile(Fambrough et al., 1996). Le produit de ce gène est une métalloprotéase appartenant à la famille des ADAMs. Depuis lors, plusieurs études suggérèrent la contribution de ces protéines dans le guidage axonal(Chen et al., 2007; Hehr et al., 2005). Concernant les récepteurs à la Nétrine-1, DCC est décrit comme subissant un clivage protéolytique séquentiel par des sécrétases. En effet, DCC est tout d'abord clivé par une α-sécrétase dans son domaine extracellulaire à proximité de la membrane, libérant ainsi un fragment extracellulaire et un α-CTF (C-Terminal Fragment) ancré à la membrane (figure 15). Ce fragment est ensuite à son tour clivé par une γ-sécrétase, libérant ainsi ce qu'on appelle DICD (pour DCC IntraCellular Domain). Ce fragment DICD est capable de se transloquer dans le noyau et de stimuler la

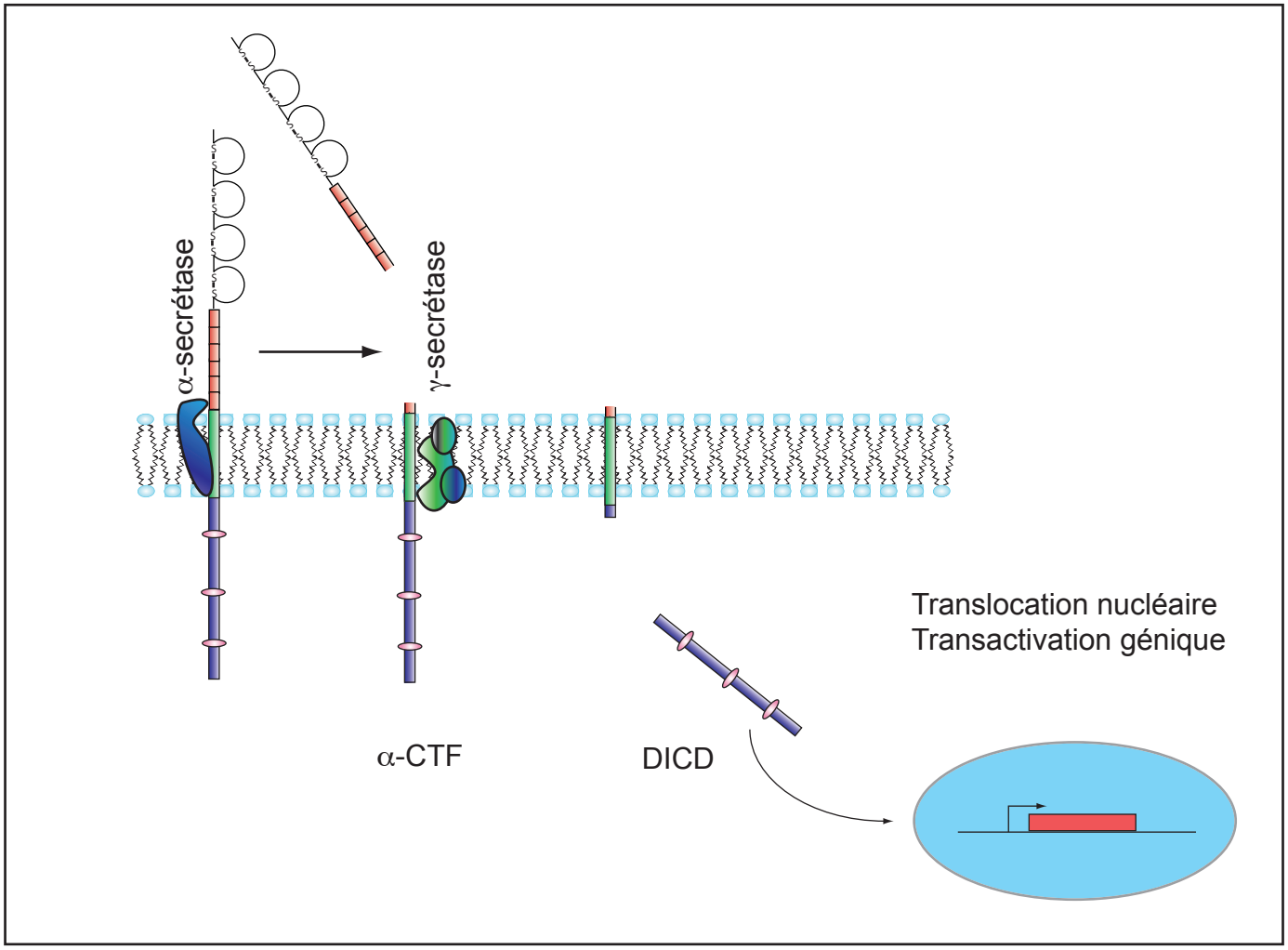


Figure 15: Activité transactivatrice de DCC
DCC est clivé sucessivement par l'α- et la γ- sécrétase. Ces clivages conduisent respectivement à la production d'un α–CTF, suivi d'un DICD. Le DICD se transloque dans le noyau et transactive des gènes cibles.

transcription génique(Taniguchi et al., 2003). A ce jour, aucun gène cible n'a encore été identifié chez les Vertébrés. Toutefois chez la drosophile, il semble que le domaine intracellulaire de Frazzled, soit capable de réguler la transcription de commissureless de manière indépendante de la présence de Nétrine(Yang et al., 2009).

Par ailleurs, il semble que le fragment α-CTF de DCC ait un rôle qui lui soit propre. En effet, il est capable de stimuler la croissance axonale ; résultat qu'on observe suite à l'accumulation à la membrane de ce fragment α-CTF provoquée par l'inhibition des γ-sécrétases (Parent et al., 2005).

Le contrôle de la réponse du cône de croissance à un facteur de guidage peut donc être régulé par le trafic intracellulaire du récepteur, mais aussi *via* son processing qui peut aboutir à une signalisation indépendante de celle du récepteur entier. Par exemple, le clivage par les sécrétases de DCC aboutit à la transactivation de gènes cibles.

2-4-2- L'intégration du signal *via* des protéines adaptatrices

Les régions cytoplasmiques des récep teurs à la Nétrine DCC ou Unc5 n'ont pas de domaines catalytiques connus, rendant compliquée l'étude de leurs voies de signalisation. Toutefois, la signalisation du couple DCC / Nétrine-1 est aujourd'hui relativement bien décrite comme en témoignent les nombreuses revues écrites à ce sujet (Barallobre et al., 2005; Mehlen and Furne, 2005; Round and Stein, 2007), y compris celle que j'ai co-rédigée au cours de ma thèse ((Mehlen and Rama, 2007), annexe n°1). En revanche, la signalisation des récepteurs de la famille Unc5 est assez peu étudiée et donc peu décrite.

En ce qui concerne DCC, nous allons voir que la présence de Nétrine-1 permet à son domaine intracellulaire d'interagir avec des protéines adaptatrices initiant des voies de signalisation différentes. Ces voies de signalisation aboutissent à des effecteurs qui seront responsables de la réponse du cône de croissance. Cette réponse va être modulée par les interactions entre ces différentes voies de signalisation, mais aussi par la présence d'autres facteurs présents dans l'environnement. Le neurone va donc tenir compte de l'ensemble de ces signaux afin d'avoir une réponse appropriée.

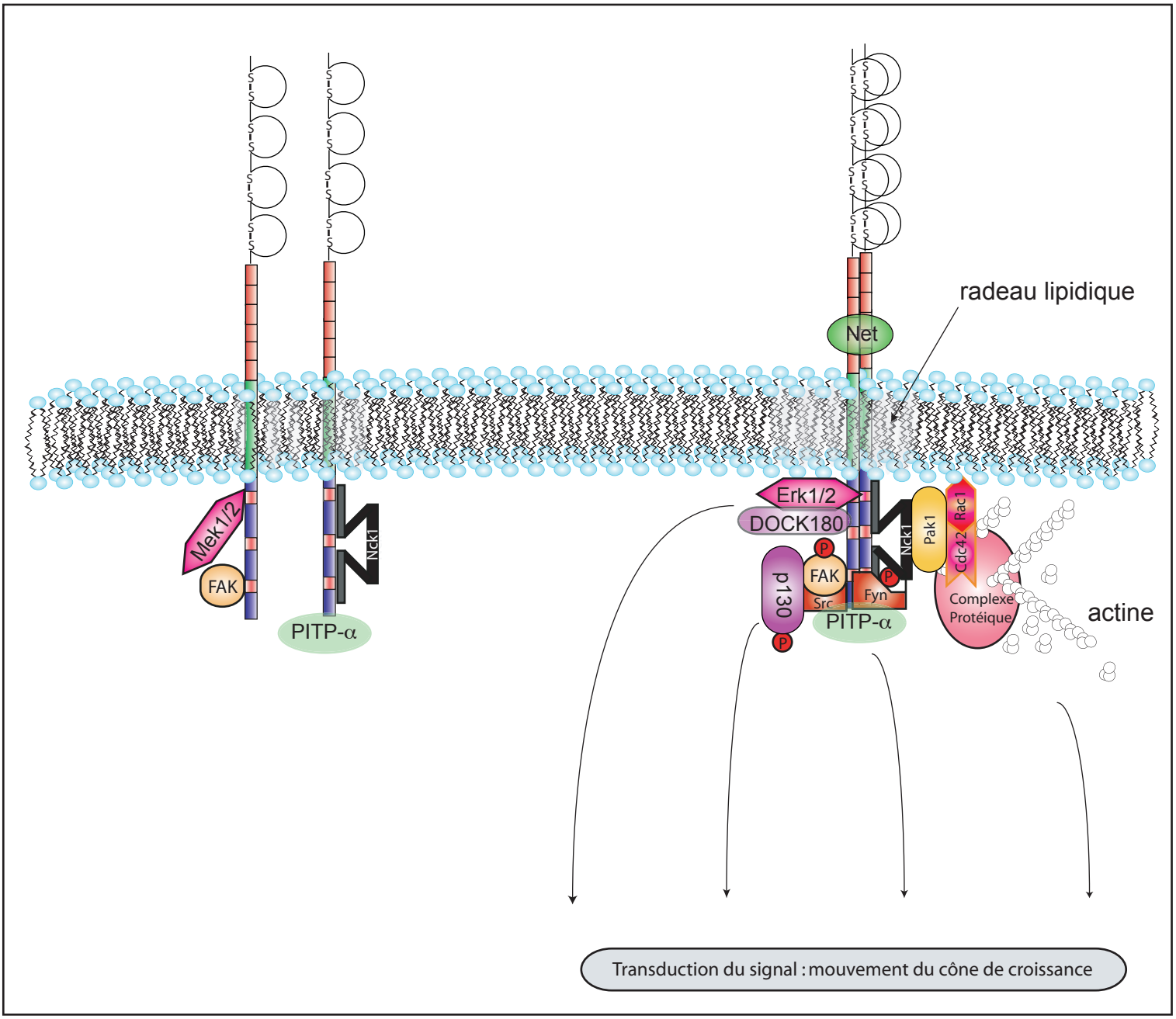


Figure 16: Formation d'une plateforme de signalisation en aval de DCC.
Les protéines FAK, Mek1/2 et PITP-α interagissent constitutivement avec DCC. Après dimérisation en présence de Nétrine-1, les protéines FAK, Src et fyn sont phosphorylées et se complexent sur DCC avec la protéine p130. De la même manière, les protéines Pak1, cdc42 et Rac1 interagissent avec nck-1 et forment un complexe en lien avec l'actine. La PITP-α est également activée. En outre, les protéines Erk1/2 et DOCK180 interagissent avec DCC lors de sa dimérisation. Net: Nétrine-1

Le domaine intracellulaire de DCC est une plateforme sur laquelle vont venir se greffer des protéines adaptatrices ou des protéines possédant une activité catalytique (figure 16).

En ce sens la protéine FAK, appartenant à la famille des Protéines Tyrosine Kinase 2 (PTK2), et les kinases de la famille Src (SKF) participent aux étapes précoces de la signalisation du couple DCC/Nétrine-1. En effet *in vitro*, la Nétrine-1 active FAK, Src et fyn qui vont à leur tour phosphoryler DCC sur la tyrosine 1420(Li et al., 2004a; Liu et al., 2004a; Ren et al., 2004). DCC interagit directement avec FAK de manière constitutive, tandis que son interaction directe avec src et fyn est dépendante de la présence de la Nétrine-1. FAK interagit *via* son domaine C-ter, avec le domaine P3 de DCC, et Src interagit *via* son domaine SH3 (SRC Homology) avec un domaine PXXP commençant à la proline 1400(Li et al., 2004a; Ren et al., 2004). En présence de Nétrine-1, FAK, Src et fyn sont activées et phosphorylent DCC sur le résidu tyrosine 1420. Ces protéines sont requises lors de la pousse ou de l'attraction induite par la Nétrine-1. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur des SKFs, de mutants de FAK ne pouvant plus être phosphorylés, ou encore de souris invalidées pour *FAK*, perturbe ou abolit la réponse à la Nétrine-1 du cône de croissance(Li et al., 2004a; Liu et al., 2004a; Meriane et al., 2004; Ren et al., 2004).

L'activation de FAK et des Src conduit à son tour à celle de p130(Liu et al., 2004a). P130 interagit alors avec le complexe FAK et Src, puis active les petites GTPases Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxinsubstrate 1) et cdc42 (Cell Division Cycle 42)(Liu et al., 2007), et enfin recrute une autre src : lck (Leukocyte C-terminal src Kinase)(Ren et al., 2008).

L'activation de la FAK par la Nétrine-1, conduit aussi au recrutement de GRB7 (Growth factor Receptor Bound proteins7), un régulateur de la traduction(Tsai et al., 2007).

Le domaine intracellulaire de DCC interagit également avec une protéine impliquée dans la voie des MAPKs(Forcet et al., 2002). La Nétrine-1 active la phosphorylation de la MAPK Erk1/2. L'activation de Erk1/2 requiert l'activation en cascade des MAPKKKs qui phosphorylent les MAPKKs qui agissent de même à leur tour sur les MAPKs. Dans cette cascade de signalisation, DCC interagit constitutivement avec la MAPKK : Mek1/2. Même si cette interaction ne semble pas requise pour l'activation de Erk1/2, elle pourrait jouer un rôle de réserve de MEK1/2 « en prévision » de la présence

de Nétrine-1. La protéine Mek1/2 serait ainsi immédiatement disponible et à proximité de DCC lors de la liaison de la Nétrine-1 sur DCC. D'autre part en présence de Nétrine-1, DCC interagit avec Erk1/2(Forcet et al., 2002).

Un autre facteur intéragissant constitutivement avec le domaine intracellulaire de DCC est la protéine Nck-1 (Non-Catalytic region of tyrosine Kinase)(Li et al., 2002a). Il s'agit d'une protéine adaptatrice composée d'un domaine SH2 et de trois domaines SH3 dont le premier et le troisième interagissent directement avec le domaine intracellulaire de DCC. L'utilisation d'un dominant négatif de Nck-1 abolit la croissance neuritique induite par DCC en présence de Nétrine-1, notamment en inhibant l'activation de Rac1(Li et al., 2002a). Nous verrons plus loin que l'activation de Rac1 et des petites GTPases est requise lors de la signalisation du couple DCC/Nétrine-1(Li et al., 2002b; Shekarabi et al., 2005).

A l'intérieur de la région intracellulaire de DCC, des expériences de double hybride ont montré que le domaine P3 en particulier avait plusieurs partenaires. D'une part, il est capable d'interagir avec la myosine X. Le Knock-down de cette dernière perturbant la croissance et l'orientation axonale, il fut ainsi montré que cette interaction participe à ces deux processus(Zhu et al., 2007).

D'autre part, il peut aussi se lier constitutivement à la PITP-α (PhosphatidylInositol Transfer Protein-α)(Xie et al., 2005). Cette protéine transporte les phosphatidylinositols ou les phosphatidylcholines de leur lieu de production à savoir le réticulum endoplasmique, jusqu'à la membrane plasmique(Allen-Baume et al., 2002). De plus en présence de Nétrine-1, l'interaction DCC/PITP-α est augmentée, ce qui a pour effet de stimuler l'activité de la PITP-α. Or, la stimulation de l'activité PITP-α est requise lors de la pousse axonale en réponse à la Nétrine-1, puisque des explants corticaux issus d'embryons de souris exprimant faiblement la PITP-α présentent une faible croissance axonale(Xie et al., 2005).

En ce qui concerne Unc-5, de nombreuses investigations seront encore nécessaires pour décrypter sa signalisation. Cependant, la plupart des études (réalisées chez *C. elegans*.) ont d'ores et déjà permis de mettre en évidence le rôle capital de la

phosphorylation du domaine intracellulaire de Unc-5 en présence de Nétrine-1. En effet, des mutations supprimant les sites de phosphorylation de Unc-5 perturbent le guidage des axones des motoneurones (Killeen et al., 2002). Ces sites sont phosphorylés par Src-1 et FAK(Lee et al., 2005; Li et al., 2006), ce qui permet alors à la protéine tyrosine phosphatase Shp2 d'interagir avec Unc-5 *via* un domaine SH2(Tong et al., 2001).

Nous venons donc de voir que malgré l'absence de domaine catalytique, DCC est capable de recruter toute une panoplie de protéines adaptatrices qui vont transduire le signal : FAK, Src-1, PITP-α, Mek1/2 et Nck-1. Dans le paragraphe suivant, nous allons décrire les voies de signalisation initiées par ces protéines.

2-4-3 La transduction du signal

La transduction du signal en aval du couple DCC/Nétrine-1 fait principalement intervenir la voie des petites Rho GTPases, des MAPKs, la formation de seconds messagers tels que l'AMPc et le Ca^{2+}, et le contrôle localisé de la traduction.

2-4-3-1 la voie des petites Rho GTPases

Les petites Rho GTPases appartiennent à la superfamille des petites GTPases Ras. Elles sont décrites comme des interrupteurs moléculaires qui traduisent un signal extracellulaire vers le cytosquelette d'actine, puis vers le noyau. Les Rho GTPases oscillent d'un état actif, liées au GTP, à un état inactif, non liées au GTP. Le passage d'un état à l'autre est contrôlé par des GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factor) et des GAPs (GTPase Activating Protein). Les GEFs stimulent l'échange de GDP en GTP et donc activent les Rho GTPases, alors que les GAPs inactivent indirectement les Rho GTPases en augmentant l'activité d'autres GTPases endogènes, diminuant ainsi le niveau de GTP intracellulaire.

Les Rho GTPases Rac1, Cdc42 et RhoA (Ras homologous member A) sont bien connues pour contrôler la dynamique des lamellipodes et des filopodes dans les fibroblastes. En effet, Rac1 et Cdc42 stimulent leur formation en diminuant le flux rétrograde d'actine et sa dépolymérisation, tandis que RhoA inhibe leur mise en place en créant des points d'adhésion et des fibres de stress.(Barallobre et al., 2005).

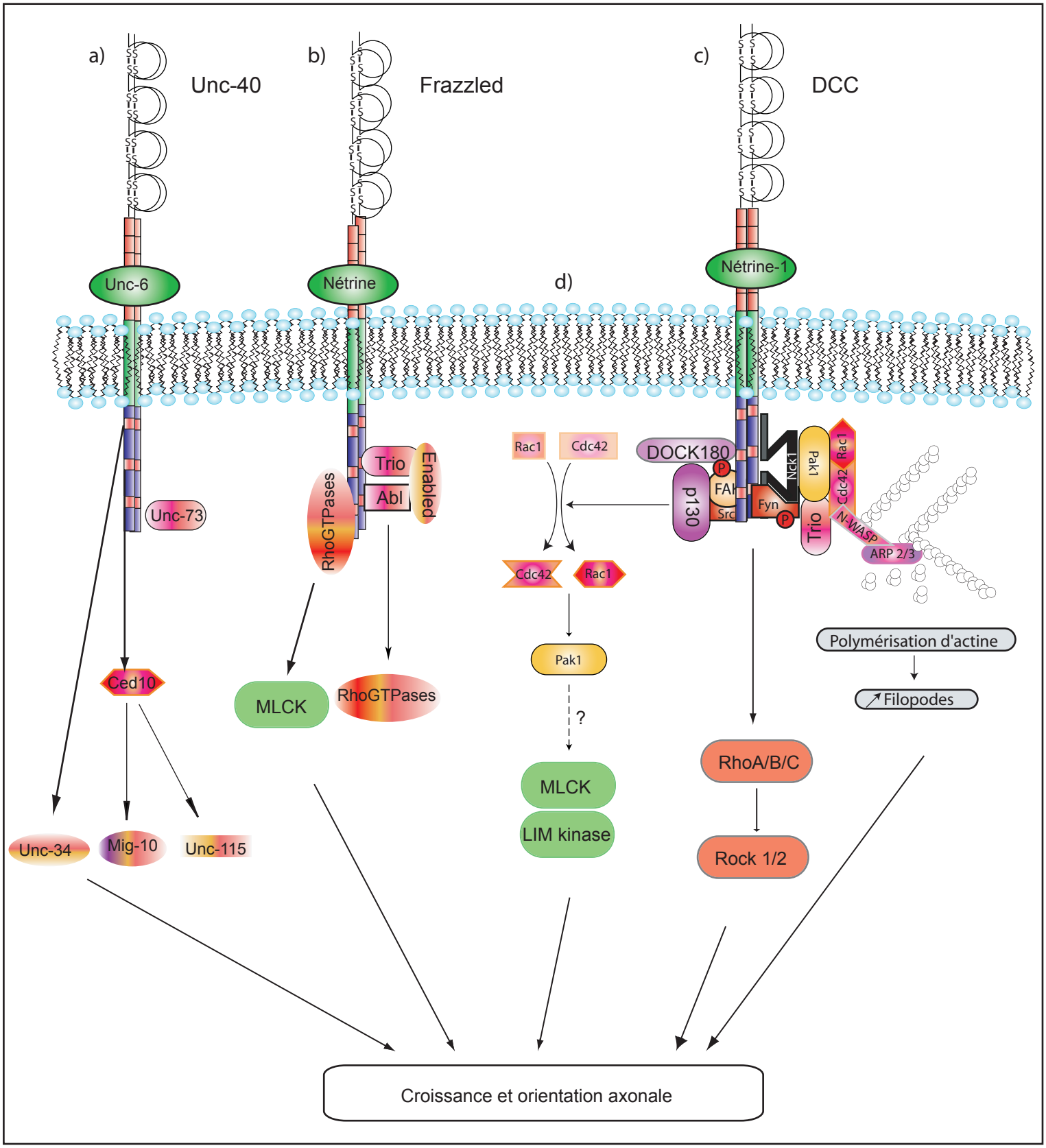


Figure 17: Activation des petites Rho GTPases par le couple DCC/Nétrine-1
Les petites Rho GTPases sont activées par différentes voies de signalisation. Leur contribution est fondamentale pour le bon fonctionnement du cône de croissance puisqu'elles participent au remodelage de son cytosquelette.
(a) signalisation induite par Unc-40, (b) signalisation induite par Frazzled, (C) signalisation induite par DCC et (d) activation de rac-1 et cdc42 en aval de DCC.

En accord avec ces observations, on sait que l'activation de Rac1 et Cdc42 est nécessaire à la promotion de la croissance des axones commissuraux en réponse à la Nétrine-1(Li et al., 2002b). En effet, l'inactivation de ces protéines que ce soit par des drogues ou par des dominants négatifs, inhibe la croissance neuritique (Li et al., 2002b; Shekarabi and Kennedy, 2002). En revanche, l'inhibition de RhoA favorise la pousse axonale en réponse à la Nétrine-1(Li et al., 2002b).

En présence de Nétrine-1, l'activation de Rac1 et Cdc42 semble nécessiter le recrutement et la phosphorylation de $p130^{CAS}$ (Crk Associated Substrate) par FAK et fyn (figures 16 et 17 c et d). Ceci est confirmé par le fait que le knock-down de $p130^{CAS}$ inhibe en présence de Nétrine-1 l'activation de Rac1 et Cdc42, abolissant ainsi la croissance axonale et l'attraction des axones commissuraux(Liu et al., 2007). De la même manière DOCK180, une GEF, interagit avec DCC en présence de Nétrine-1(Li et al., 2008). DOCK180 est connue pour être impliquée dans la voie de signalisation des intégrines *via* $p130^{cas}$(Li et al., 2008), mais semble également intervenir dans la signalisation DCC/$p130^{cas}$. En effet, DOCK180 active aussi Rac1 *via* le complexe DCC/Nétrine-1, et son knock-Down perturbe la croissance et l'attraction médiées par le couple DCC/Nétrine-1(Li et al., 2008).

En outre, nous avons vu précédemment que DCC interagit avec Nck-1(Li et al., 2002a). En présence de Nétrine-1, cette interaction conduirait à l'activation de Rac-1. Plus précisément, en absence de Nétrine-1, Nck-1 interagirait avec DCC et le cytosquelette, tandis qu'en présence de Nétrine-1, un changement conformationnel de Nck-1 permettrait son interaction *via* son domaine SH2 avec des protéines effectrices capables d'activer Rac1, favorisant ainsi la croissance neuritique (figure 17 c)(Li et al., 2002a).

D'autre part, l'interaction de la Nétrine-1 avec DCC conduit au recrutement d'un complexe protéique contenant Rac1, Cdc42, Pak1 (P21 Activated Kinase) et la protéine N-WASP (figure 17 c)(Li et al., 2001; Shekarabi et al., 2005). Le recrutement de N-WASP dans ce complexe est important puisque l'utilisation d'un mutant de ce gène incapable de lier ARP2/3 (*ie* incapable de promouvoir la polymérisation d'actine-F) bloque l'augmentation du nombre de filopodes en réponse à la Nétrine-1(Shekarabi et al., 2005).

Au sein du complexe protéique évoqué ci-dessus figurent les Paks, initialement décrits comme des effecteurs des petites Rho GTPases. La forme active de Rac1 ou de Cdc42 se lie à un dimère de Paks, activant ainsi les domaines kinase de ce dernier(Bokoch, 2003).

Ceux-ci peuvent alors agir sur leurs effecteurs tels que la MLCK (Myosin Light Chain Kinase) ou la LIM-kinase(Lin-11, Isl1, Mec-3-Kinase) (figure 17 d)(Hofmann et al., 2004), qui sont des régulateurs du cytosquelette. Toutefois, l'activation par la Nétrine-1 de la MLCK ou de la LIM-kinase par les Paks n'a pas encore été décrite.

De plus, une étude a démontré que Rac1 est aussi activé par la protéine Trio, une GEF (figure 17 c)(Briancon-Marjollet et al., 2008). En effet, Trio serait liée de manière constitutive au complexe DCC/Nck-1/PAK-1 où il activerait Rac1. Les souris invalidées pour *Trio* présentent des défauts de projections commissurales, confirmant que Trio est impliquée dans la voie de signalisation de la Nétrine-1. De plus *ex vivo* en présence de Nétrine-1, la promotion de la croissance des axones commissuraux prélevés chez ces souris est réduite(Briancon-Marjollet et al., 2008).

Chez la drosophile, l'activation des Rho GTPases fait intervenir un complexe protéique entre Frazzled, Trio (contrôlant l'activité de rac1 et rhoA), Enabled (un orthologue de ENA/VASP, inhibant le coiffage des extrémités barbées des microfilaments d'actine) et Abl (Abelson tyrosine kinase, protéine contrôlant la dynamique du cytosquelette)(Forsthoefel et al., 2005). Dans ce complexe, Abl est capable de phosphoryler Frazzled et Trio. Les mutants pour ces protéines présentent des défauts similaires à ceux observés pour les mutants *Frazzled* ou *Nétrine -A* et *-B*, confirmant ainsi indirectement leur appartenance à la même voie de signalisation. Plus récemment, il a été montré que le domaine P3 de Frazzled est important pour initier l'activation des Rho GTPases et de la protéine Abl. Ces dernières déclencheraient alors une cascade d'activation, intéressant successivement la MLCK puis la myosine II (figure 17 b)(Dorsten et al., 2007).

Similairement chez *C. elegans*, la protéine Unc-73/Trio interagit avec Unc-40 et participe à la régulation du trafic de DCC et au guidage axonal en réponse à la Nétrine-1(Levy-Strumpf and Culotti, 2007; Watari-Goshima et al., 2007). De plus, le domaine P1 de Unc-40 participe à l'activation de Unc-34 (orthologue de Ena/VASP), tandis que le domaine P2 active CED10/rac1 qui activerait à son tour Unc-115/abLIM, une protéine associée au cytosquelette d'actine participant à son remodelage(Garcia et al., 2007; Gitai et al., 2003). En outre, en réponse à la Nétrine-1, CED10/rac1 se lie à la lamellipodine/MIG10 (protéine régulant la polymérisation de l'actine) et entrainerait sa localisation asymétrique dans le cône de croissance vers la source de Nétrine-1(Quinn et al., 2008).

Cette interaction déclencherait un assemblage local du cytosquelette et polariserait la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1 (figure 17 a).
Les petites Rho GTPases sont aussi impliquées dans la migration neuronale. En effet lors de la migration des neurones précérébelleux, Rac1 et Cdc42 participent à l'extension du prolongement guide, alors que RhoA/B/C régule la nucléokinèse et l'orientation des axones. RhoA/B/C activent leurs effecteurs ROCK1/2 (Rho Associated Coiled-coil-containing protein Kinase 1/2)(Causeret et al., 2004)(figure 17 c).
En outre, RhoA est impliqué durant la maturation des oligodendrocytes(Rajasekharan et al., 2010). En effet, les POs sont repoussés par la Nétrine-1; ce phénomène étant associé à de fortes activations de RhoA et de Rock. En revanche sur des oligodendrocytes matures, la Nétrine-1 inhibe l'activité de RhoA et favorise la formation de ramifications. Ce résultat suggère que la Nétrine-1 induit des réponses morphologiques distinctes chez les PO et les oligodendrocytes matures grâce à une régulation différente de l'activité de RhoA.

En ce qui concerne les récepteurs Unc-5, une étude *in vitro* a démontré qu'ils sont eux aussi capables d'activer les petites Rho GTPases RhoA et Rac-1 en réponse à la Nétrine-1(Picard et al., 2009). De plus chez *C. elegans*, la répulsion médiée par la Unc-6/Nétrine-1 en présence de Unc-5 fait intervenir Max-1 et Max-2 (Motor AXon); Max-2 étant une protéine appartenant à la famille des Paks, tandis que Max-1 est encore mal caractérisée(Huang et al., 2002; Lucanic et al., 2006). Les défauts de projections axonales associés à l'expression ectopique de Unc-5 sont supprimés en absence de Max-2 suggérant que celle-ci est un composant essentiel de la voie de signalisation de Unc5 en réponse à la Nétrine-1(Lucanic et al., 2006). Quant à Max-1, il semble qu'elle participe à la signalisation de Unc-5, mais il reste encore à déterminer par quel moyen(Huang et al., 2002).
Enfin, chez la souris, les axones moteurs crâniens sont repoussés par la Nétrine-1 *via* Unc5h1. Cette répulsion semble être médiée par l'activation de la voie de signalisation RhoA et de son effecteur Rock(Murray et al., 2010).

2-4-3-2 La voie des MAPKs :

Suite à sa liaison avec la Nétrine-1, le récepteur DCC active, *via* sa partie intracellulaire, la voie des MAPKs, notamment les protéines Erk1/2 (p42/44)(Forcet et

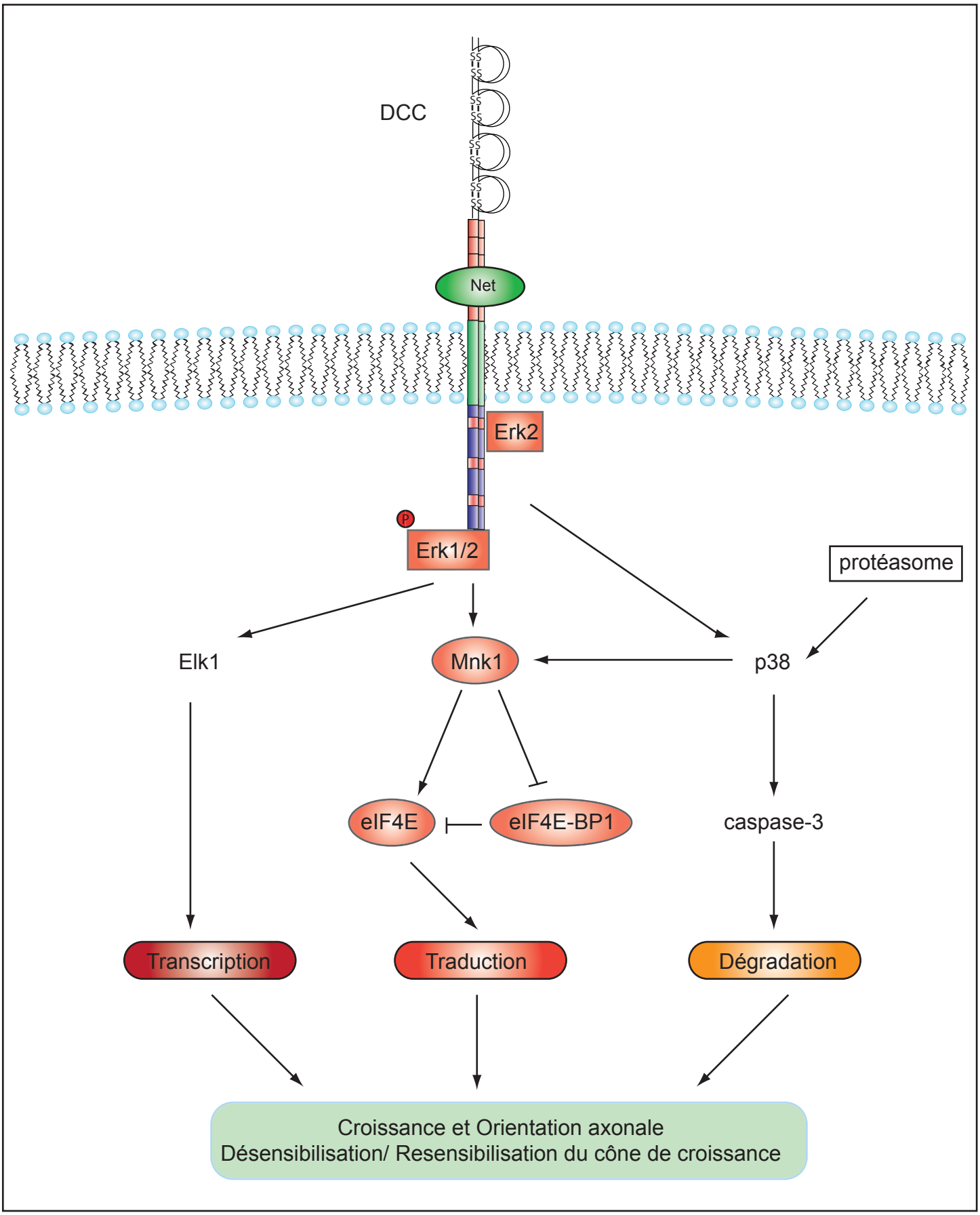


Figure 18: Activation de la voie des MAPKs Erk1/2 par le couple DCC/Nétrine-1
En présence de Nétrine-1, DCC active Erk1/2 qui phosphoryle à la fois Mnk1 et Elk1. Elk1 est un facteur de transcription. Mnk1 aboutit à l'activation de la traduction.
Le protéasome collabore avec p38 pour activer la caspase-3 qui dégrade les protéines.
L'activation des MAPKs peut donc conduire à l'activation de la transcription génique, à la traduction protéique et/ou à la dégradation protéique. L'ensemble de ces activités contribue à la croissance et à l'orientation axonale. Net: Nétrine-1

al., 2002) et possiblement p38(Campbell and Holt, 2003)(figure 18). Alors qu'elle est absente chez des embryons invalidés pour la *nétrine-1* ou pour *DCC,* il a été montré qu'en réponse à la Nétrine-1 dans les neurones commissuraux spinaux sauvages, a lieu la phosphorylation de Erk1/2, aboutissant à l'activation de sa cible: le facteur de transcription Elk1(Forcet et al., 2002). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la voie d'activation de Erk1/2 abolit la croissance axonale et l'attraction médiée par la Nétrine-1(Forcet et al., 2002). Plus en détail, une étude récente démontre que Erk2 interagit directement avec le domaine P1 de DCC(Ma et al., 2010). Cette interaction aboutit à la phosphorylation directe de trois résidus du domaine intracellulaire de DCC pouvant potentiellement servir au recrutement d'autres protéines de signalisation. D'autres études seront nécessaires afin de conclure sur le rôle de cette phosphorylation directe.

Contrairement aux résultats qu'avait obtenus notre groupe et selon lesquels p38 ne semblait pas activée en réponse à la Nétrine-1(Forcet et al., 2002), le groupe de Christine Holt a montré que dans des neurones rétiniens de xénope, à la fois p38 et p42/44 sont phosphorylées en présence de Nétrine-1(Campbell and Holt, 2003). Cette différence peut s'expliquer simplement par l'utilisation de modèles cellulaires différents. Dans les neurones rétiniens de xénope, la Nétrine-1 contrôle positivement certains régulateurs traductionnels comme le facteur d'initiation eucaryotique 4E (eIF4E) et son répresseur eIF4E-BP1 (eIF4E Binding Protein 1), favorisant ainsi la traduction dans le cône de croissance(Campbell and Holt, 2001)(figure 18). Des drogues inhibant l'activation de p38 et p42/44 abolissent d'une part l'activation de ces facteurs, et d'autre part la traduction de protéines dans le cône de croissance. En effet, Erk1/2 et p38 collaborent pour phosphoryler la protéine Mnk1 (MAPK interacting kinase 1) qui phosphoryle à son tour eIF4E et eIF4E-BP1. La phosphorylation de eIF4E-BP1 libère eIF4E qui se lie aux ARNms coiffés et active leur traduction. En outre, p38 active la caspase-3 de manière dépendante du protéasome. L'inhibition de Erk1/2 et de p38 abolit l'attraction et le « collapse » de cônes de croissance rétiniens médiés par la Nétrine-1(Campbell and Holt, 2003)(figure 18).

Ces résultats suggèrent donc que la signalisation des MAPKs est importante pour la croissance axonale et l'orientation du cône de croissance en réponse à la Nétrine-1.

De plus, les MAPKs participent aussi à l'adaptation de la sensibilité du cône de croissance à un facteur de guidage(Ming et al., 2002). En effet, plus le cône de croissance

s'approche de la source d'un facteur de guidage, plus la concentration de celui-ci augmente. A partir d'un certain seuil, le neurone devient alors insensible au facteur de guidage. C'est ce qu'a illustré le groupe de Mu-Ming Poo en montrant que lorsque un cône de croissance cultivé dans un milieu contenant de la Nétrine-1, est soumis à un gradient de Nétrine-1, il y est insensible. En revanche, après une période de deux heures dans ce milieu contenant de la Nétrine-1, le cône de croissance redevient sensible à un gradient de Nétrine-1. En effet, le cône de croissance est attiré par le gradient, alors que la Nétrine-1 est toujours présente dans le milieu suggérant que le cône de croissance est capable réadapter sa sensibilité à la Nétrine-1. Ce processus fait intervenir les MAPKs Erk1/2 et une traduction *de novo*(Ming et al., 2002). Dans des conditions physiologiques, le cône de croissance ajuste en permanence sa sensibilité aux facteurs de guidage, ce qui lui permet ainsi de conserver à tout moment une réponse adaptée. Cette adaptation se traduit *in vitro* par un parcours en zig-zag du cône de croissance reflétant : la désensibilisation ou interférence et la resensibilisation ou adaptation.

Notons enfin que l'activation des MAPKs Erk1/2 participe aussi à la formation des ramifications axonales des neurones corticaux en réponse à la Nétrine-1(Tang and Kalil, 2005).

2-4-3- 3 La Nétrine-1 et les seconds messagers

La signalisation en aval de la Nétrine-1 est à l'origine de la production de seconds messagers qui vont participer à la réponse du cône de croissance. En effet, la concentration en seconds messagers, tels que l'AMPc, le Ca^{2+} et les phosphoinositides, module l'attraction ou la répulsion médiée par la Nétrine-1.

- **Le calcium :**

Il existe deux types de facteurs de guidage, selon que la réponse du cône de croissance est ou non dépendante du taux de Ca^{2+}(Barallobre et al., 2005).

Contrairement par exemple à la Semaphorine 3A, la Nétrine-1 appartient quant à elle à la première catégorie. En effet, la diminution de la concentration de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire ou le blocage des canaux calciques abolit l'attraction ou la répulsion médiée par la Nétrine-1(Hong et al., 2000). Dans cette étude, les auteurs ont démontré qu'un gradient de Nétrine-1 est à l'origine d'un gradient de Ca^{2+} dans le cône de croissance avec la plus forte concentration de Ca^{2+} du côté de la source de Nétrine-1. Ce

gradient de Ca^{2+} résulte de l'activation par la Nétrine-1 des canaux calciques membranaires voltage-dépendants LCCs (L-type Ca^{2+} Channels). Les récepteurs ionotrophiques à la ryanodine et à l'inositol tri-phosphate (IP3) des compartiments de stockage du Ca^{2+} sont aussi sensibles au Ca^{2+}(Berridge, 1998). De la sorte, l'influx calcique active à son tour ces récepteurs qui vont alors libérer le calcium intracellulaire. Ce processus est appelé CICR (Calcium Induced Calcium Release)(figure 19 a). Ce n'est pas l'existence d'un gradient calcique en lui même qui est responsable de l'attraction du cône de croissance, mais son amplitude. En effet, l'utilisation de drogues réduisant les influx de Ca^{2+}, convertit l'attraction en répulsion. En outre, l'expression conjointe de Unc-5 et de DCC en présence de Nétrine-1 est aussi à l'origine d'un gradient calcique lors de la répulsion du cône de croissance dans le modèle des neurones spinaux de xénope. Mais dans ce cas, le gradient est de plus faible amplitude que lorsqu'on a une attraction en la seule présence de DCC(Nishiyama et al., 2003).

L'ouverture des canaux LCCs en présence de Nétrine-1 semble être régulée par les niveaux d'AMPc et de GMPc. En présence de Nétrine-1, DCC activerait une signalisation augmentant le *ratio* AMPc/GMPc qui favoriserait l'ouverture des LCCs et donc l'activation du CICR. En revanche, en présence de Unc-5, le *ratio* AMPc/GMPc serait faible, diminuant l'ouverture des LCCs et par conséquent l'intensité du gradient calcique, conduisant ainsi à la répulsion du cône de croissance(Nishiyama et al., 2003; Nishiyama et al., 2008).

L'influx calcique est aussi médié par d'autres récepteurs : les TRPCs (Transient Receptor Potential Channel). En 2005, deux études ont démontré l'implication de ces récepteurs dans la réponse du cône de croissance à la Nétrine-1(Shim et al., 2005; Wang and Poo, 2005). La Nétrine-1 induit une dépolarisation du cône de croissance qui est générée par un influx calcique *via* les TRPCs. Cette dépolarisation est dépendante de DCC car le blocage par un anticorps anti-DCC, abolit cette dépolarisation. Les TRPCs participent à l'attraction du cône de croissance vers la source de Nétrine-1 puisque leur inhibition par un composé chimique spécifique abolit le « turning ». Cependant, la stimulation de la croissance axonale n'est pas perturbée. En outre, la dépolarisation résultant de l'ouverture des TRPCs pourrait activer les canaux voltages-dépendants LCCs et renforcer l'entrée de Ca^{2+} (figure 19 a).

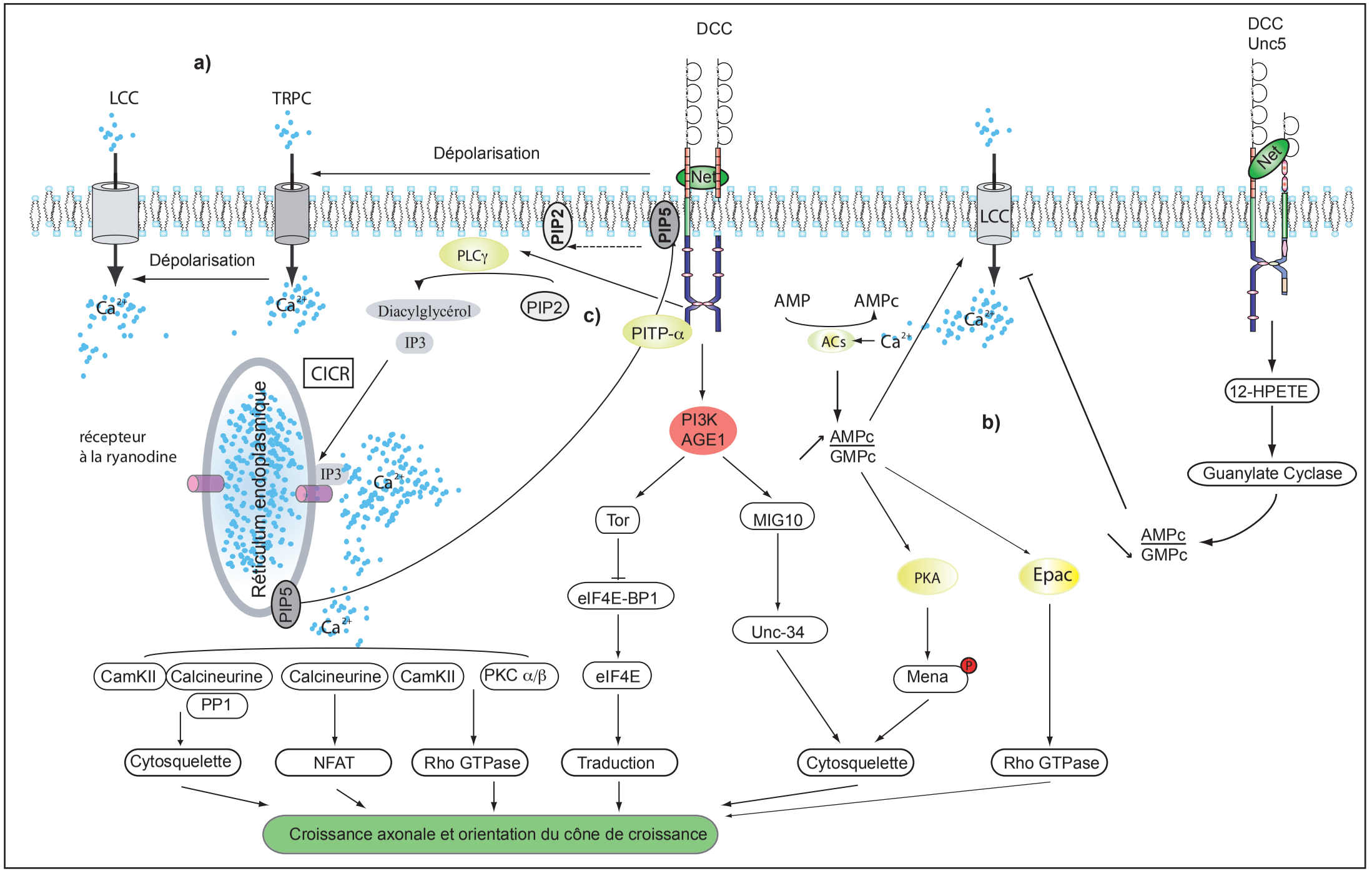


Figure 19: Activation des seconds messagers par la Nétrine-1
La Nétrine-1 active la production de seconds messagers : (a) le calcium, (b) l'AMPc et (c) les phosphoinositides. Les voies de signalisation des seconds messagers sont inter-connectées, aboutissant au remodelage du cytosquelette et donc à la croissance et l'orientation axonale. Net: Nétrine-1

Le rôle de ces récepteurs TRPCs a été confirmé *in vivo*. En effet, chez le xénope, le knock-down de XTRPC1, un récepteur de la famille des TRPCs, a montré que ce gène est nécessaire à la formation des commissures spinales(Shim et al., 2005).

Une fois libéré dans le cytoplasme, le Ca^{2+} va agir sur ses effecteurs : la calmoduline, la CaMKII (Ca^{2+} Calmodulin-dependent protein kinase II), les Rho GTPases, et la calcineurine (figure 19 a).

Lors de l'attraction médiée par la Nétrine-1, c'est son interaction avec la calmoduline qui permet au Ca^{2+} d'activer la CaMKII. En revanche, la répulsion de cônes de croissance cultivés sur la laminine-1 vis à vis de la Nétrine-1, dépend de la calcineurine et de sa phosphatase PP1(Wen et al., 2004). La CaMKII et la calcineurine-PP1 ont comme point commun de pouvoir contrôler la formation des microtubules(Wen et al., 2004). D'autre part, l'activation de la calcineurine stimule la translocation nucléaire des NFATs et déclenche leur activité transactivatrice(Graef et al., 2003). De plus, l'inhibition chimique de la calcineurine ou l'invalidation des NFATs inhibe la croissance axonale des neurones commissuraux médiée par la Nétrine-1(Graef et al., 2003). Enfin, les Rho GTPases sont aussi modulées par l'influx calcique. En effet, ce dernier active la PKC (Protein Kinase C) qui avec la CaMKII, stimule Rac1 et Cdc42 et inhibe RhoA(figure 19 a)(Jin et al., 2005).

-les nucléotides cycliques

Comme nous l'avons vu, les nucléotides cycliques AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) et GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique) interviennent dans la régulation du taux de calcium. Ces nucléotides cycliques sont produits par des adénylates cyclases et contrôlent l'activation de la PKA et aussi l'ouverture des canaux LCCs (figure 19 b).

C'est le groupe de Mu-ming Poo qui a montré le premier l'importance de l'AMPc dans l'attraction du cône de croissance par la Nétrine-1(Ming et al., 1997). En effet, en utilisant des analogues non hydrolysables de l'AMPc ou un inhibiteur de la PKA sur des neurones rétiniens de xénope, les auteurs observèrent que l'attraction médiée par le couple Nétrine-1/DCC est alors convertie en répulsion.

D'autre part, la présence de laminines dans le substrat sur lequel étaient cultivés des neurones de rétiniens de xénope, est associée à une diminution du niveau d'AMPc au niveau du cône de croissance, ce qui explique la répulsion médiée par la Nétrine-1 dans ces conditions(Hopker et al., 1999).

Comme nous l'avons vu précédemment, la signalisation du calcium est intimement liée à celle de l'AMPc, puisque par exemple l'AMPc régule l'ouverture des canaux LCCs(Nishiyama et al., 2003). En effet chez un neurone qui exprime DCC, la Nétrine-1 augmente le *ratio* AMPc/GMPc avec pour conséquence l'influx de calcium qui va entrainer l'attraction du cône de croissance de manière dépendante de la PKA. En revanche en réponse à la Nétrine-1, un neurone qui exprime DCC et Unc-5, va présenter à la fois une diminution du *ratio* AMPc/GMPc et de son calcium intracellulaire, ce qui aboutit à la répulsion du cône de croissance(Nishiyama et al., 2003). En présence de DCC et unc-5, la Nétrine-1 active le 12-HPETE (12—hydroperoxyeicosatetraneoic acid) qui est impliqué dans la voie du GMPc. Cette signalisation aboutit à une inhibition des canaux LCC, à un gradient calcique plus faible et donc *in fine* à la répulsion du cône de croissance (figure 19 b).
A contrario, le calcium pourrait réguler la synthèse de l'AMPc en réponse à la Nétrine-1. En effet, la Nétrine-1 active la production d'AMPc par l'adénylate cyclase soluble (ACs). Or, les ACs sont connues pour être activées par le calcium(Wu et al., 2006). Néanmoins, l'activation de l'ACs par la Nétrine-1 est controversée puisque les souris invalidées pour l'ACs ne présentent aucun défaut du guidage axonal(Moore et al., 2008b).

Plus en aval, la PKA activée par l'AMPc en présence de Nétrine-1, phophoryle la protéine Mena, une ABP de la famille ena/VASP qui contrôle la polymérisation des filaments d'actine et favorise l'extension des filopodes(Lebrand et al., 2004).
Il faut cependant noter que l'activation de la PKA en réponse à la Nétrine-1 est controversée. En effet dans des neurones commissuraux de rat, la Nétrine-1 n'est à l'origine ni d'une augmentation du niveau d'AMPc, ni de l'activation de la PKA(Bouchard et al., 2004; Moore and Kennedy, 2006). Il semblerait dans ce modèle, que l'attraction et la pousse axonale médiées par la Nétrine-1 ne soient que renforcées par l'AMPc et la PKA, mais que la Nétrine-1 ne soit pas capable d'activer ces deux voies de signalisation. Les auteurs suggèrent donc que dans ces neurones, la voie AMPc/PKA n'est pas requise pour la réponse à la Nétrine-1(Moore and Kennedy, 2006).
En dehors de son influence sur la PKA, une étude récente suggère que l'AMPc pourrait également indirectement contrôler des Rho GTpases. En effet, la protéine Epac (Echange Protein directly Activated by cAMP), une GEF connue pour activer la RhoGTPas rap1,

serait activée par l'AMPc produit en réponse à la Nétrine-1 (figure 19 b)(Murray et al., 2009).

Le niveau d'AMPc peut également être modulé par un autre récepteur à la Nétrine-1 : A2b. En effet, la liaison de A2b à la Nétrine-1 conduit à la production d'AMPc probablement *via* les protéines G(Corset et al., 2000); un mécanisme qui pourrait intervenir notamment au niveau des projections rétinotectales du xénope(Shewan et al., 2002).

Pour conclure ce paragraphe, remarquons également que les taux de Ca^{2+} et d'AMPc sont aussi modulés lorsque les neurones ont une activité électrique, ce qui se traduit alors par un renforcement de l'attraction médiée par la Nétrine-1(Ming et al., 2001). Enfin, on peut noter que la sérotonine convertit en répulsion l'attraction « normale » des axones thalamocorticaux vis à vis de la Nétrine-1, ceci en modulant le niveau d'AMPc vraisemblablement *via* le contrôle d'une adénylate cyclase $G_{i/0}$(Bonnin et al., 2007).

- Les phosphoinositides

Les phosphoinositides sont des précurseurs de seconds messagers. Ils sont régulés par la phospholipase Cγ (PLCγ) et par la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) (figure 19 c). La PI3K ajoute des groupements phosphate aux phosphoinositides et produit du phosphatidylinositol, mono-, bi- ou tri-phosphate (PIP, PIP2 et PIP3). Quant à la PLCγ, elle hydrolyse le PIP2 en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4, 5-phosphate (IP3), deux seconds messagers. La PLCγ et la PI3K participent toutes deux à l'attraction du cône de croissance en réponse à la Nétrine-1. En effet, l'inhibition de la PI3K par la wortmannin abolit l'attraction du cône de croissance(Ming et al., 1999). De plus, l'activation par la PI3K stimulerait la traduction dans le cône de croissance en activant la voie TOR(Campbell and Holt, 2001). Concernant la PLCγ, son inhibition par U73122 diminue la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1, suggérant que son activation est importante dans la signalisation du couple DCC/Nétrine-1(Xie et al., 2006). En effet, la liaison de la Nétrine-1 et de DCC déclenche la phosphorylation de la PLCγ. Ainsi activée, celle-ci hydrolyse le PIP2 en IP3, ce qui pourrait participer à la libération du Ca^{2+} contenu dans les compartiments intracellulaires de stockage. Par ailleurs, la PITP-α (phosphatidylinositol transfer protein-α), une protéine qui transporte les phosphoinositides PIP5 (Phosphatidylinositol 5 Phosphate) du réticulum

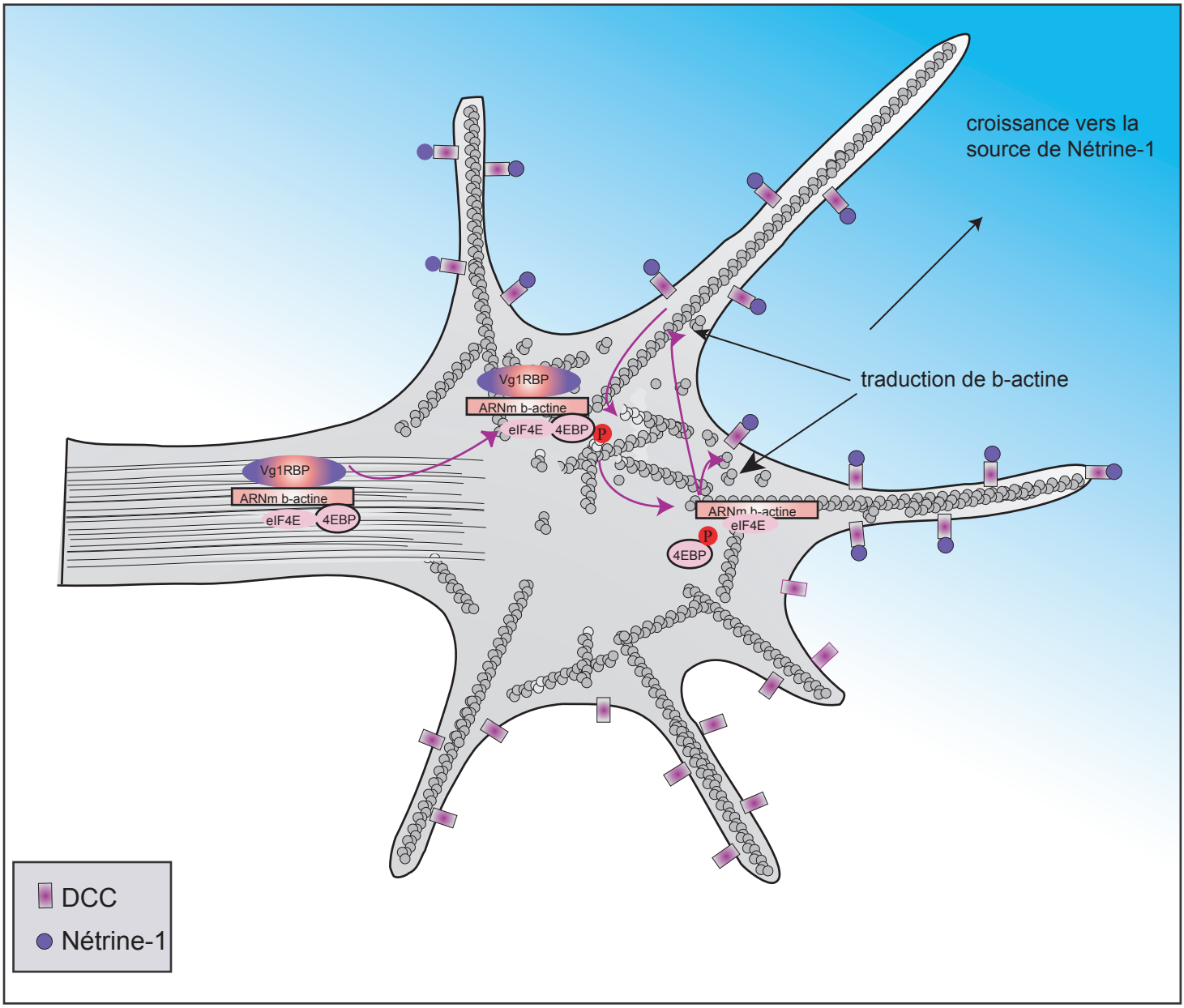


Figure 20 : Traduction polarisée de β-actine au niveau du cône de croissance en présence de Nétrine-1. L'interaction Nétrine-1 / DCC conduit *via* la protéine cargo Vg1RBP à la localisation asymétrique des granules du côté de la source de nétrine-1 . Ceci conduit à la phosphorylation asymétrique du facteur inhibiteur de la traduction 4EBP qui libère eIF4E, permettant la traduction polarisée du transcript de la β-actine. (Adaptée de Mehlen et Rama, Médecines-Sciences, 2007)

endoplasmique à la membrane plasmique, est importante dans la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1(Xie et al., 2005). En effet, la PITP-α se lie au domaine P3 de DCC en présence de Nétrine-1 et stimule l'hydrolyse du PIP2 et donc la production de seconds messagers (figure 19 c).

Enfin, chez *C. elegans*, AGE-1/PI3K (ARF GAP Effector) est aussi impliquée dans le guidage axonal en réponse à la Nétrine-1/Unc-6. En effet, Unc-6 active AGE-1 et produit du PIP2 qui active MIG10, l'orthologue de la lamellipodine. MIG-10 coopérerait alors avec unc-34/enabled pour remodeler le cytosquelette(Chang et al., 2006).

2-4-3-4 La Nétrine-1 contrôle la transcription, la traduction et la dégradation protéique dans le cône de croissance

La Nétrine-1 peut intervenir à toutes les étapes du contrôle de la quantité de certaines protéines, la première d'entre elles étant le niveau transcriptionnel. Par exemple, nous avons vu précédemment que la Nétrine-1 active le facteur de transcription elk-1 *via* l'activation de la voie des MAPKs, Erk1/2(Forcet et al., 2002). De manière similaire, au niveau du cône de croissance, l'influx de calcium consécutif à l'intéraction Dcc/Nétrine-1 active NFAT, un autre facteur de transcription(Graef et al., 2003). D'autre part, même si le contrôle de ses clivages dus aux sécrétases ne semble pas être dépendant de la Nétrine-1 (ou tout du moins il n'a pas encore été décrit comme tel) DCC, ou plus exactement son fragment intracellulaire AICD(Taniguchi et al., 2003), est capable de se transloquer de le noyau et d'y avoir une activité transactivatrice. (figure 15).

La Nétrine-1 contrôle également la traduction protéique. En effet, l'activation de Erk1/2 et de p38 par le couple DCC/Nétrine-1, phosphoryle la protéine Mnk1. Cette dernière ainsi activée, phosphoryle à son tour eIF4E et eIF4E-BP1, favorisant de la sorte la traduction des ARNm(figure 18)(Campbell and Holt, 2003). En outre, l'activation de la PI3K par la Nétrine-1 enclenche également la voie TOR qui aboutit elle-aussi à la phosphorylation de eIF4E-BP1 libérant eIF4E, et activant ainsi la traduction(Campbell and Holt, 2001).

Par ailleurs, des données plus récentes montrent qu'un gradient de Nétrine-1 active la traduction de la β-actine dans le cône de croissance de manière asymétrique (figure 20)(Leung et al., 2006). En effet, la Nétrine-1 induit le mouvement en direction des filopodes, de complexes protéiques contenant des ARNm de β-actine: les granules

Vg1RBP (Vg1 RNA Binding Protein). De plus, du côté de la source de Nétrine-1, la protéine 4EBP (eIF4E binding protein) libère le facteur de traduction eIF4E, autorisant ainsi la traduction de la β-actine qui va se polymériser et favoriser l'extension des filopodes en direction de la source de Nétrine-1(figure 20)(Leung et al., 2006). Notons que l'existence de ce mécanisme régulant la dynamique du cône de croissance s'est trouvée indirectement confirmée par l'obtention de résultats similaires dans des études portant sur le BDNF et non plus la Nétrine-1(Mehlen and Rama, 2007; Yao et al., 2006).
Outre son rôle dans l'orientation du cône de croissance, la traduction localisée de certaines protéines est également requise pour la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1. Celle-ci peut en effet être abolie si on réalise par exemple le knock-down de Par3, une protéine du complexe PAR. En fait, dans des conditions physiologiques, la Nétrine-1 stimule la traduction locale de Par3. Il se pourrait que cette protéine soit impliquée avec les autres protéines du complexe PAR dans la régulation de la GSK3β qui elle même peut réguler les microtubules(Hengst et al., 2009).

Enfin, une étude récente vient de démontrer un lien direct entre le couple Nétrine-1/DCC et la machinerie de traduction(Tcherkezian et al., 2010). En effet, DCC forme un complexe avec des facteurs d'initiation eucaryotiques (iIF4E, eIF2, eIF3…) et des monosomes. L'ajout de Nétrine-1 libère ces facteurs qui sont associés au domaine intracellulaire de DCC, notamment au domaine P1 ce qui initierait la traduction des ARNms.
Par ailleurs, la Nétrine-1 contrôle la traduction du récepteur aux opioïdes κ *via* une voie indépendante de DCC(Tsai et al., 2006). En effet, c'est l'activation de FAK qui promeut la traduction de ce récepteur. Plus précisément, la protéine Grb7 se lie à l'extrémité 5'-UTR de l'ARNm du récepteur aux opioïdes κ et bloque le recrutement de eIF4E, empêchant la traduction de l'ARNm. Une fois activée par la Nétrine-1, FAK phosphoryle Grb7 et abolit sa capacité à lier l'ARNm. Par conséquent, eIF4E peut activer la traduction de cet ARNm(Tsai et al., 2007).

Enfin, la dernière étape permettant de contrôler le niveau de certaines protéines, consiste à jouer sur leur dégradation. Ce mécanisme est important que ce soit lors de l'attraction ou de la répulsion du cône de croissance, ce qu'illustre le fait que l'inhibition du protéasome abolit l'orientation du cône de croissance en réponse à la Nétrine-

1(Campbell and Holt, 2001). En fait, il a été montré que la Nétrine-1 stimule l'ubiquitinylation de protéines et donc leur dégradation par le protéasome (Kim et al., 2005). En particulier, il semble que DCC puisse être ubiquitinylé en réponse à la Nétrine-1, permettant ainsi une désensibilisation vis à vis de la Nétrine-1(Kim et al., 2005). Cette ubiquitinylation pourrait être réalisée par l'intermédiaire de la protéine Siahs (Seven In Absentia homologueS), une ubiquitine ligase, qui interagit avec le domaine intracellulaire de DCC(Hu et al., 1997).

Ainsi, l'attraction ou la répulsion médiées par la Nétrine-1 requièrent un changement rapide des protéines dans le cône de croissance. En effet, l'inhibition de la transcription, de la traduction ou de la dégradation protéique perturbe la réponse du cône de croissance vis à vis de la Nétrine-1.

2-4-4 Les signalisations en aval de la Nétrine-1 convergent vers le cytosquelette

L'ensemble des voies de signalisation que nous venons de décrire, aboutit à la modulation du cytosquelette. Si on s'intéresse tout d'abord à l'actine, on sait que en présence de Nétrine-1, le complexe associé à et comprenant rac1, cdc42, Pak1 et N-WASP recrute ARP2/3. Plus précisément, l'interaction entre N-WASP et ARP2/3 fait le lien entre DCC et le cytosquelette d'actine en ancrant ce dernier à la membrane(Shekarabi et al., 2005). Notons aussi que la Nétrine-1 active ADF/cofiline (remodelage de l'actine-F) lors de l'attraction du cône de croissance(Marsick et al., 2010). Par ailleurs, le contrôle de la traduction par la Nétrine-1 permet une production asymétrique de β-actine dans le cône de croissance favorisant ainsi son orientation(Leung et al., 2006). Les Rho GTPases interviennent quant à elles à deux niveaux: d'une part elles activent la protéine ENA/VASP qui inhibe le coiffage des extrémités barbées favorisant la nucléation de l'actine-F. D'autre part elles activent la protéine Unc-115/abLim qui participe à l'ancrage membranaire du cytosquelette(Forsthoefel et al., 2005; Levy-Strumpf and Culotti, 2007; Watari-Goshima et al., 2007). Enfin, concernant les seconds messagers, l'activation de la PKA par l'AMPc, comme je l'ai précédemment décrit, activerait aussi la protéine Mena, une protéine de la famille des ABP favorisant l'extension des filopodes(Lebrand et al., 2004). Quant à la

PI3K, elle activerait MIG-10 qui coopèrerait avec Unc-34/enabled pour remodeler le cytosquelette(Chang et al., 2006).
Concernant les microtubules, l'utilisation de drogues les dépolymérisant abolit l'attraction médiée par la Nétrine-1(Buck and Zheng, 2002). D'autre part, l'activation de la GSK3 par la Nétrine-1 phosphoryle la protéine MBP1 qui stabilise les microtubules et permet alors leur interaction avec l'actine-F(Del Rio et al., 2004). L'invalidation de MBP1 conduit d'ailleurs à des défauts similaires à ceux observés chez les souris invalidées pour la *nétrine-1*, suggérant que MBP1 est important dans la signalisation de la Nétrine-1.

La transduction du signal en aval de la Nétrine-1 fait donc intervenir une pléthore de voies de signalisation qui sont interconnectées les unes avec les autres, rendant d'autant plus compliqué leur compréhension et leur étude. L'ensemble de ces voies de signalisation aboutit *in fine* au remodelage du cytosquelette du cône de croissance en réponse à la Nétrine-1.

3 Nétrine-1 et apoptose neuronale

La Nétrine-1 ne participe pas seulement à la navigation neuronale dans le développement du SNC. Elle est aussi impliquée dans la survie neuronale. En effet, les récepteurs à la Nétrine-1, que ce soit DCC ou ceux de la famille Unc5h, appartiennent à la famille des récepteurs à dépendance. Outre leur rôle dans la navigation neuronale en présence de Nétrine-1, ces récepteurs présentent l'originalité de ne pas être actifs qu'en présence de leur ligand. En effet en absence de Nétrine-1, ces récepteurs vont activer une voie de signalisation pro-apoptotique qui conduit à l'élimination de la cellule par apoptose.

Dans cette partie, nous présenterons d'abord l'apoptose en général. Dans un deuxième temps, nous verrons que l'apoptose est un processus capital au cours du développement du SNC. Enfin, nous nous intéresserons au rôle de facteur de survie de la Nétrine-1 *via* les récepteurs à dépendance.

3-1 L'apoptose

3-1-1 Généralités sur l'apoptose

L'apoptose, l'un des types de mort cellulaire programmée, est un processus physiologique essentiel qui participe au contrôle du nombre de cellules pendant le développement et aussi au cours de la vie d'un organisme. Pour s'en convaincre, il suffit de constater que sa dérégulation peut aboutir à des processus pathologiques aussi graves que la tumorigenèse ou certaines maladies neurodégénératives(Ethell and Buhler, 2003; Kerr et al., 1994).

Au cours de la vie d'un organisme, l'apoptose participe à son homéostasie en contrôlant la balance prolifération/élimination cellulaire(Renehan et al., 2001). Elle est également impliquée dans le remodelage de certains organes comme l'involution de la glande mammaire après l'allaitement et dans le processus de cicatrisation(Greenhalgh, 1998; Lund et al., 1996). En outre, elle participe à la mise en place d'un système immunitaire fonctionnel(Opferman and Korsmeyer, 2003). Concernant le SNC, nous verrons qu'au cours de son développement, l'apoptose élimine les neurones surnuméraires n'ayant pas établi de connexion synaptique fonctionnelle(Nijhawan et al., 2000).

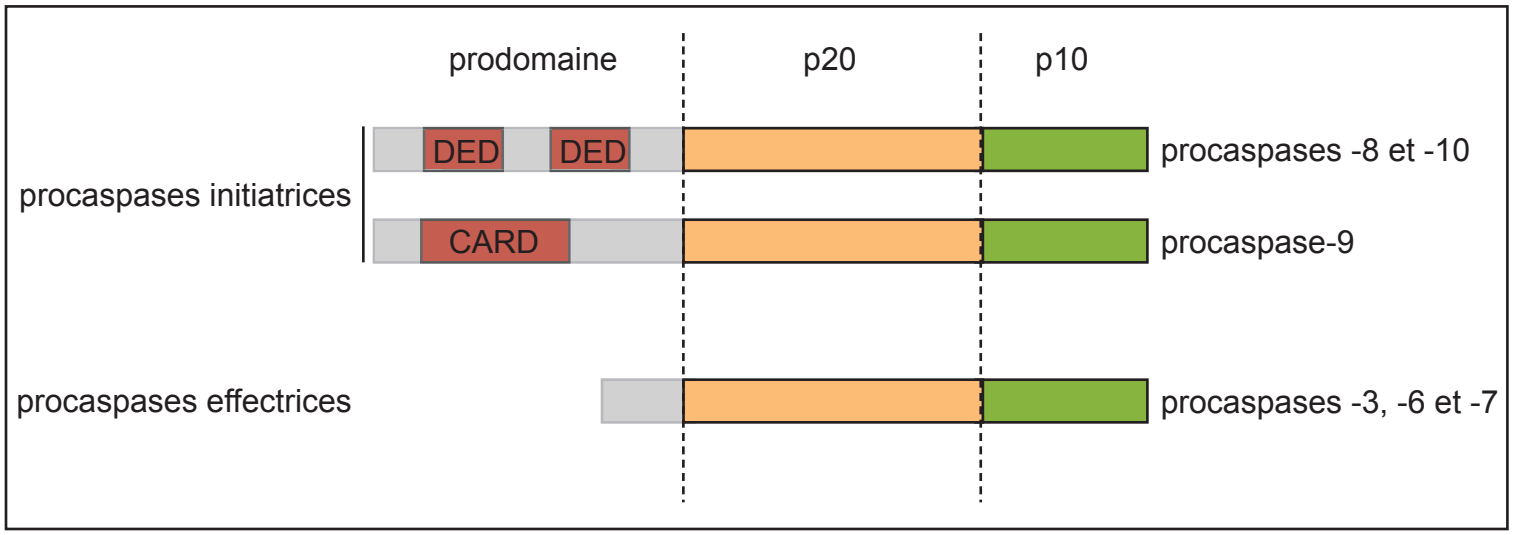


Figure 21: Structure des procaspases
Les procaspases initiatrices possèdent un long prodomaine avec soit deux domaines DED (procaspases -8 et -10), soit un domaine CARD (procaspase-9). En revanche, les procaspases effectrices possèdent un court prodomaine. Les procaspases possèdent toutes un p20, siège de l'activité catalytique, et un p10.

Historiquement, l'apoptose a été pour la première fois évoquée en 1972 par Kerr et *al.* avec la description de l'apparence morphologique de cellules en train de mourir(Kerr et al., 1972). Les cellules apoptotiques présentent à leur surface un bourgeonnement cytoplasmique, leur chromatine se condense et leur noyau se fragmente. Quant aux cellules initialement adhérentes, elles se détachent de leur substrat et deviennent rondes(Kerr et al., 1972; Zimmermann et al., 2001). Des analyses biochimiques ont démontré que l'apoptose est associée au clivage de l'ADN, à l'externalisation des phosphatidylsérines à la surface de la membrane plasmique, et au clivage de nombreuses protéines intracellulaires(Cohen et al., 1994; Martin and Green, 1995; Martin et al., 1995). Parmi celles-ci on peut citer la gelsoline qui favorise la nucléation de l'actine-F(Kothakota et al., 1997) ou bien encore les protéines ICAD (Inhibitor of CAD) qui inhibent en les séquestrant les endonucléases CAD (Caspase Activated DNase) responsables du clivage de l'ADN(Sakahira et al., 1998).

Les cellules apoptotiques sont ensuite reconnues par les macrophages, notamment grâce à l'externalisation des phosphatidylsérines, puis phagocytées(Fadok et al., 2000). L'apoptose ne conduit donc pas au déversement du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire comme c'est le cas pour la nécrose.

3-1-2 Les protéines clefs de l'apoptose : les caspases

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée. Ce « programme » est d'abord initié avant d'être effectivement exécuté ; ces deux étapes étant principalement médiées par les protéines clefs de l'apoptose, les caspases (Cysteinyl ASPartate protéASEs). Il s'agit d'une famille de protéases conservées au cours de l'évolution puisqu'on les trouve depuis les nématodes chez lesquels elles ont été découvertes(Ellis and Horvitz, 1986), en passant par les insectes, et jusqu'aux humains(Hengartner, 2000). Le génome des mammifères contient quatorze membres de cette famille(Zimmermann et al., 2001).

Les caspases sont synthétisées sous formes de proenzymes ou zymogènes et son appelées procaspases. Ces dernières contiennent trois domaines : un prodomaine N-ter, une grande sous-unité (p20) contenant une cystéine dans le site catalytique avec un motif en acides aminés très conservé, et une petite sous-unité C-ter (p10) (figure 21)(Zimmermann et al., 2001). Les caspases sont des protéases spécifiques puisqu'elles coupent toujours après un acide aspartique situé au niveau d'un site consensus de

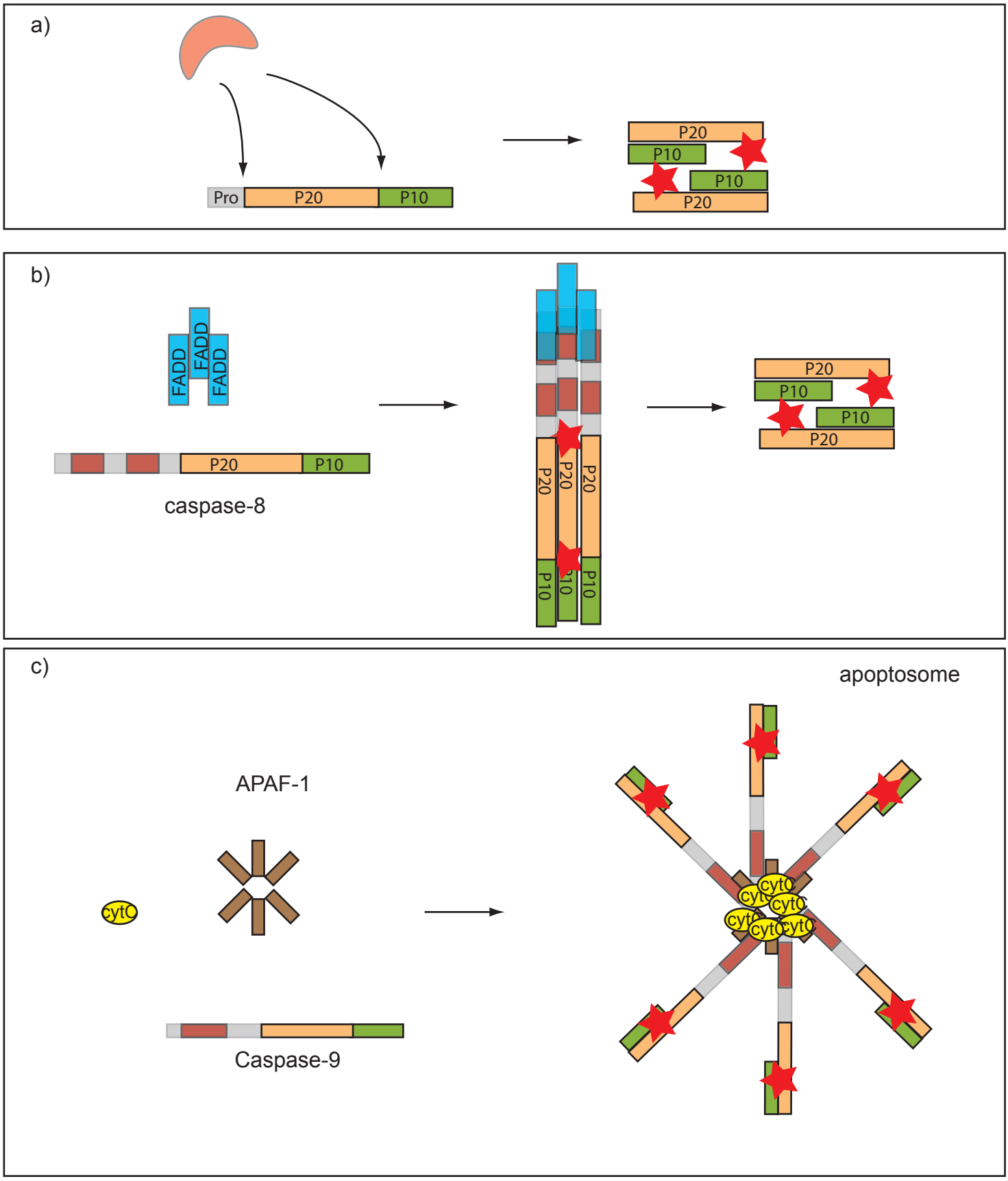


Figure 22:Mécanisme d'activation des procaspases
(a) la procaspase est clivée par une caspase en amont, mécanisme souvant utilisé pour les caspases effectrices.
(b) Induction par proximité: les procaspases-8 sont recrutées et s'aggrègent au sein d'un complexe comportant notamment la protéine FADD où elles s'autoactivent.
(c) l'activation de la procaspase-9 fait intervenir une sous-unité régulatrice APAF-1, qui va interagir avec la pro-caspase-9 en présence de Cytochrome C formant ainsi l'apoptosome. Au sein de l'apoptosome, un changement conformationnel aboutirait à l'activation de la caspase-9.

Site catalytique actif :

quatre acides aminés(Stennicke and Salvesen, 1998). Les trois domaines de la forme zymogène des caspases sont séparés par des sites de clivage par les caspases déjà activées. La coupure au niveau de ces sites va permettre l'assemblage d'un hétérotétramère contenant deux hétérodimères p10/p20 (figures 22 a et 22 b), ce qui constitue pour la plupart des caspases, leur forme active (Earnshaw et al., 1999).

Néanmoins, il existe en fait trois principaux moyens d'activation des procaspases (figure 22)(Hengartner, 2000).

(i) Les procaspases peuvent être activées par une caspase en amont, comme une caspase initiatrice par exemple, qui va cliver au niveau des aspartates séparant les trois domaines de la procaspase (figure 22 a). Les caspases effectrices -3, -6 et -7 sont activées de cette manière. Cette cascade d'activation amplifie le signal apoptotique parce que une caspase initiatrice va pouvoir activer plusieurs caspases effectrice. Qui plus est, les caspases effectrices activées vont pouvoir activées d'autres caspases effectrices amplifiant de la sorte le signal apoptotique. (ii) La procaspase-8 va être activée lorsqu'elle est mise à proximité d'autres procaspases-8. En effet, les récepteurs de mort en présence de leur ligand recrutent un ensemble de protéines adaptatrices et de procaspases-8, ce qui aboutit à une forte concentration de zymogènes. Dans ces conditions, l'activité des pro-caspases-8 est suffisante pour qu'elles se clivent mutuellement, produisant des caspases-8 initiatrices actives (figure 22 b) pouvant aller agir sur les procaspases effectrices(Salvesen and Dixit, 1999). (iii) L'activation des procaspases peut faire intervenir une sous-unité régulatrice. C'est le cas de la procaspase-9 dont il a été montré que le clivage n'a pas vraiment d'effet activateur, contrairement à son association avec une protéine cofacteur: APAF-1(Apoptosis Protease Activatin Factor 1)(Rodriguez and Lazebnik, 1999). La formation de ce complexe ou apoptosome contenant également le cytochrome C, engendre un changement conformationnel de la procaspase-9 aboutissant à son activation en caspase-9 (figure 22 c)(Hengartner, 2000).

Les signaux pro-apoptotiques conduisent à l'activation d'une cascade de caspases *via* les trois voies précédentes. Au sein de cette cascade, on peut différencier deux types de caspases: les caspases initiatrices et les caspases effectrices(Zimmermann et al., 2001).

Les caspases initiatrices -2, -8, -9 et -10 vont, comme leur nom l'indique, initier la cascade d'activation des caspases. Leur forme procaspase contient des domaines d'interaction protéine-protéine qui vont leur permettre de se lier avec des régulateurs.

Les procaspases -8 et -10 contiennent par exemple un DED (Death–Effector Domain), alors que les procaspases -2 et -9 ont un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitement Domain). Nous verrons plus loin que le DED permet l'interaction avec le complexe des récepteurs de mort, tandis que le domaine CARD permet l'interaction avec APAF-1.

Les caspases effectrices -3, -6 et -7 sont à la fin de la cascade d'activation de l'apoptose. Contrairement aux caspases initiatrices, leur court prodomaine ne leur permet pas de s'auto-activer(Kumar, 2007). C'est le clivage de leur forme zymogène par les caspases initiatrices qui conduit à leur activation.

3-1-3 Principales voies d'activation de l'apoptose

L'activation de l'apoptose est principalement médiée par deux voies que nous allons décrire ci-dessous: la voie extrinsèque, appelée aussi voie des récepteurs de mort, et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale. Il ne faut cependant pas perdre de vue que l'apoptose peut aussi être régulée négativement, notamment *via* les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein) et plus particulièrement leurs domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat), responsables de l'inhibition des caspases(Salvesen and Duckett, 2002; Zimmermann et al., 2001).

3-1-3-1 la voie extrinsèque

Les récepteurs de mort appartiennent à la super-famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor). Cette famille comporte TNF-R1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1), TNF-R2, Fas, DR3 (Death Receptor 3), DR6, TRAIL-R1 (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1), TRAIL-R2, EDAR (EctoDysplasin A Receptor) et $P75^{NTR}$ (P75 NeuroTrophin Receptor). Hormis TNF-R2, tous ces récepteurs sont transmembranaires et possèdent un domaine de mort (DD pour « Death Domain ») dans leur partie intracellulaire(French and Tschopp, 2003; Wajant, 2003).

Les ligands de tous ces récepteurs de mort sont respectivement TNF, FasL(Fas Ligand), TLA1, le domaine extracellulaire de APP, TRAIL, EDA1, et NGF. Ils sont tous exprimés sous une forme membranaire et peuvent être libérés par l'action d'une métalloprotéase(Nikolaev et al., 2009; Schulte et al., 2007).

L'interaction ligand/récepteur conduit à la trimérisation des récepteurs de mort et au recrutement par le DD des différentes protéines qui vont constituer ce qu'on appelle le DISC (Death Inducing Signaling Complex). Il existe en fait deux types de DISC (voir pour revue (Lavrik et al., 2005)). Le premier requiert la formation d'un seul complexe protéique et concerne les récepteurs TRAIL-R1, TRAIL-R2 et Fas. Une fois trimérisés, ces récepteurs de mort recrutent *via* leurs DD, la protéine FADD (Fas Associated Death Domain) qui lie à son tour les procaspases -8 et -10 dont on a vu précédemment qu'elles pouvaient s'auto-activer par proximité. Les caspases -8 et -10 peuvent alors activer les caspases effectrices.

Le second type de DISC concerne les récepteurs TNF-R1, DR3 et DR6 et requiert la formation séquentielle de deux complexes. De la même manière que précédemment, la présence du ligand entraine la trimérisation des récepteurs, permettant ainsi le recrutement de protéines *via* leur DD. En effet, les DD des protéines RIP (Receptor Interacting Protein) et TRADD (TNF-R Associated Death Domain) s'associent à ceux des récepteurs. Les protéines TRAF -1 et -2 (TNF-R Associated Factor) sont aussi recrutées sur ce complexe dit de type 1. Ce complexe est ensuite transloqué dans le cytosol où il va s'associer aux protéines FADD et aux procaspases -8 et -10. C'est ce complexe de type 2 qui va alors permettre l'activation des procaspases -8 et -10 puis *in fine,* celle des caspases effectrices.

A noter enfin qu'il existe aussi des récepteurs de mort constitutivement inactifs puisqu'ils ne possèdent pas de domaine intracellulaire. Ils constituent ce que l'on appelle la classe des récepteurs leurres (Deccoy Receptor) : TRAIL-3, TRAIL-4, DcR3 et l'Ostéoprotégérine (OPG). Ces récepteurs sont capables de fixer et donc de titrer les mêmes ligands que les récepteurs de mort natifs(Lavrik et al., 2005).

3-1-3-2 la voie intrinsèque

Cette voie appelée aussi voie mitochondriale, est activée par divers stimuli comme par exemple des dommages mitochondriaux, une déplétion en facteurs de croissance, un choc thermique, ou bien encore un stress génotoxique (dommages à l'ADN)(Giam et al., 2008).

L'activation de cette voie conduit à la perméabilisation de la mitochondrie et à la libération de son cytochrome C dans le cytosol. Or, comme nous l'avons vu précédemment, le cytochrome C permet l'activation de la procaspase-9 au sein de

l'apoptosome (complexe regroupant APAF-1, Cytochrome C et procaspase-9)(Green, 2005; Hengartner, 2000).

L'activation de cette voie requiert donc la libération du cytochrome C de l'espace intermembranaire mitochondrial. Les protéines qui régulent l'intégrité de la membrane mitochondriale et donc sa perméabilité, appartiennent à la famille des Bcl-2 (B Cell Lymphoma 2)(Giam et al., 2008)et possèdent toutes des domaines homologues appelés BH (Bcl-2 Homology). Au sein de cette famille, on peut distinguer trois classes de protéines : les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, Mcl-1 et A1), les pro-apoptotiques initiatrices ou BH3-only (Bad, Bid, Bik/NKB, Bim/Bod, Bmf, Hrk/DP5, Noxa et Puma) et les pro-apoptotiques effectrices (Bax, Bak et Bok)(Giam et al., 2008).

En absence de stimuli apoptotiques, les protéines initiatrices et effectrices seraient séquestrées par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. En revanche, un stimulus apoptotique conduirait à la libération des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, et conséquemment à la formation de pores dans la membrane externe de la mitochondrie. La présence de ces pores modifierait la perméabilité membranaire et conduirait à la libération du Cytochrome C. Néanmoins, les mécanismes inhibant ou aboutissant à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie sont encore soumis à controverse(Giam et al., 2008).

3-1-4 Les autres types de mort cellulaire

Hormis l'apoptose, la mort cellulaire peut intervenir par différentes voies. En effet, ont été décrites à ce jour la nécrose, l'autophagie et la nécroptose(Yuan and Kroemer). La nécrose est plutôt considérée comme une mort cellulaire par accident où la cellule subit des dommages lors d'une blessure par exemple. La nécrose n'est soumise à aucune régulation cellulaire et est caractérisée par l'augmentation du volume cellulaire, un gonflement des organites, et enfin par l'éclatement de la membrane plasmique. Le contenu cellulaire est donc déversé dans le milieu extracellulaire, ce qui se traduit par une réaction inflammatoire.

L'autophagie est, dans la plupart des cas, un processus de survie en situation de manque d'apport nutritif. Cette mort cellulaire est caractérisée par l'apparition de très grandes vacuoles dans le cytoplasme : les auto-phagosomes. Cette mort cellulaire participe par exemple à la disparition de la glande salivaire lors la métamorphose chez la drosophile(Yuan and Kroemer).

La nécroptose est un processus qui, bien qu'initié par des récepteurs de mort, ne fait pas intervenir les caspases, mais la protéine RIP1, une kinase possédant un DD. Les effecteurs de cette voie ne sont pas encore bien connus, mais ils se pourrait que l'autophagie soit impliquée(Yuan and Kroemer). Cette mort cellulaire participe à la mort neuronale dans des conditions pathologiques, notamment dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou lors d'attaques cérébrales(Moskowitz et al.; Yuan and Kroemer).

3-2 L'apoptose au cours du développement du SNC

L'apoptose joue un rôle fondamental au cours du développement du SNC, puisque l'invalidation chez la souris de certaines protéines clefs de la cascade apoptotique conduit à des défauts majeurs du SNC aboutissant à une mort périnatale. Par exemple, l'invalidation des caspases -3, -9 ou d'APAF-1 est à l'origine d'exencéphalie(Kuida et al., 1998; Kuida et al., 1996; Yoshida et al., 1998). Si on regarde dans le détail, on observe dans ces modèles, la présence de neurones surnuméraires qui sont à l'origine de divers problèmes comme un défaut de fermeture du tube neural(Kuida et al., 1998).

D'autre part, l'invalidation de la protéine Bcl-x, un facteur anti-apoptotique appartenant à la famille de Bcl-2, conduit à un excès d'apoptose dans le SNC en développement, en particulier dans le diencéphale, le mésencéphale et le tube neural caudal, ce qui aboutit à une mort embryonnaire à environ E13.5(Motoyama et al., 1995).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'apoptose est un processus cellulaire requis lors du développement du SNC. Nous allons voir qu'en effet pour aboutir à un SNC fonctionnel, deux vagues d'apoptose se succèdent, éliminant finalement plus de la moitié des neurones initialement produits.

3-2-1 L'apoptose précoce

La preuve de l'existence d'une mort neuronale précoce fut pour la première fois apportée en 1951 par les travaux de l'équipe de Glücksmann qui observa de la mort cellulaire dans le neuroépithélium pendant la neurulation(Glücksmann, 1951). D'autres études identifièrent ensuite cette mort cellulaire précoce dans tous le SNC, notamment dans la rétine, le mésencéphale et le tube neural(de la Rosa and de Pablo, 2000; Hensey and Gautier, 1998). Comme nous le verrons dans le chapitre suivant décrivant la théorie

neurotrophique, une seconde vague d'apoptose affecte dans un deuxième temps les neurones dont les projections axonales ne parviennent pas à atteindre leur cible. Or ici, dans les articles cités ci-dessus, aux stades développementaux étudiés, les précurseurs neuraux ou les neurones post-mitotiques n'ont pas encore réalisé de projections, suggérant que les défauts observés chez ces mutants résultent bien de cette vague d'apoptose précoce. Dans le même ordre d'idées, les souris invalidées pour les *caspases -3, -9* ou pour *APAF-1* présentent des défauts du SNC très précocement : à E10.5 pour les caspases -3 et -9, et même E9.5 pour APAF-1(Honarpour et al., 2000; Kuida et al., 1998; Kuida et al., 1996). Ces observations et d'autres travaux, notamment sur la moelle épinière, suggèrent qu'il existe une apoptose neuronale précoce nécessaire au bon développement du SNC(Blaschke et al., 1998; Homma et al., 1994).

Cette vague d'apoptose précoce semble être assez massive puisque des estimations suggèrent que 50 à 70% des précurseurs neuronaux issus de la phase de prolifération meurent(de la Rosa and de Pablo, 2000).

Les mécanismes régulant cette apoptose neuronale précoce sont encore peu connus. Il semble que certains facteurs participant à la spécification cellulaire, au contrôle de la prolifération et de la différenciation soient impliqués. C'est notamment le cas des BMPs(Panchision et al., 2001; Yeo and Gautier, 2004) et de Sonic HedgeHog(Oppenheim et al., 1999; Paganelli et al., 2001; Yeo and Gautier, 2003).

Le rôle de cette vague d'apoptose précoce est encore en discussion. Elle pourrait évidemment contrôler le nombre de neurones en régulant la balance prolifération/mort cellulaire(Boya and de la Rosa, 2005; Haydar et al., 1999). Toutefois chez le xénope, l'inhibition pharmacologique de la prolifération ne bloque pas l'apoptose précoce. En effet, un embryon possédant la moitié du nombre normal de cellules subit quand même cette vague d'apoptose, ce qui suggère que le rôle de cette vague d'apoptose précoce ne se limite pas au contrôle du nombre de cellules(Yeo and Gautier, 2003). Cette vague d'apoptose pourrait aussi participer à l'élimination de cellules mal différenciées(Panchision et al., 2001; Yeo and Gautier, 2004), ou encore éviter la neurogenèse prématurée(Panchision and McKay, 2002). Elle pourrait aussi permettre l'élimination de cellules qui ne sont pas localisées au bon endroit(Thibert et al., 2003). Enfin, l'invalidation des gènes de réparation de l'ADN est à l'origine d'une augmentation de cette apoptose suggérant que cette dernière élimine les cellules dont l'intégrité génomique est altérée(Frank et al., 2000).

Par contre, il a été montré que les facteurs neurotrophiques comme le BDNF, le NGF et la neurotrophine-3 sont incapables de bloquer cette première vague apoptotique chez les motoneurones de poulet entre E4 et E5(Yaginuma et al., 1996). En revanche, ces mêmes protéines bloquent la mort de ces neurones entre E6 et 10, une fois qu'ils ont projeté leur axone. Cette expérience met ainsi en évidence l'existence d'une seconde vague d'apoptose après l'établissement des connections neuronales(Yaginuma et al., 1996); ce dont nous allons parler dans le chapitre suivant.

3-2-2 La théorie neurotrophique

La théorie neurotrophique propose que la mort neuronale soit la conséquence d'une compétition pour une quantité limitée de facteurs neurotrophiques produits par les cibles neuronales. Cette théorie fut proposée par Hamburger et *col.* en 1951(Levi-Montalcini and Hamburger, 1951; Oppenheim, 1991)à la suite d'expériences d'ablation de bourgeons de membre chez l'embryon de poulet. Ils observèrent alors la mort des motoneurones innervant habituellement ce bourgeon de membre. *A contrario*, sur un autre embryon avant la seconde vague d'apoptose, la greffe d'un bourgeon de membre supplémentaire susceptible d'être innervé par les mêmes segments spinaux que le bourgeon de membre normal, conduit à une augmentation de 50% de la population de motoneurones. Ces résultats suggèrent donc que l'interaction avec la cible est responsable de la survie neuronale puisque l'ablation d'un bourgeon de membre conduit à l'élimination des motoneurones n'ayant plus de cible, tandis que la présence d'un bourgeon de membre supplémentaire sauve les motoneurones surnuméraires qui auraient normalement dû être éliminés.

Le premier facteur neurotrophique identifié comme capable de sauver des neurones dont la cible a été détruite, fut le NGF(Cohen and Levi-Montalcini, 1957). Son rôle peut être illustré par le modèle des neurones du ganglion cervical supérieur de rat dont le nombre diminue de 30% lors des vingt huit jours qui suivent la naissance. L'axotomie de ce ganglion conduit par ailleurs à une perte de 90% de ces neurones; chiffre qui diminue fortement si on effectue en parallèle une administration de NGF. De la même manière, un tel traitement au NGF inhibe la diminution physiologique de 30% du nombre de neurones(Hendry and Campbell, 1976). Sur un autre modèle, l'expérience inverse consistant à utiliser un anticorps titrant le NGF aboutit à la perte de 85% des DRGs,

suggérant qu'*in vivo* ces neurones sont eux-aussi dépendants du NGF(Johnson et al., 1980).

La théorie neurotrophique rendrait donc compte d'une mort neuronale qui participerait à l'élaboration d'un SNC fonctionnel. En effet, cette mort neuronale pourrait contrôler la qualité des projections axonales en éliminant les neurones qui, faute d'innerver leur cible, se retrouvent en absence de tout support trophique. Ainsi, la production limitée de facteurs trophiques contrôlerait le nombre de neurones innervant une cible puisqu'un neurone qui n'aurait pas assez de facteurs neurotrophiques serait éliminé. On conçoit donc que les neurones puissent entrer en compétition pour lier suffisamment de facteurs neurotrophiques.

Depuis l'identification du NGF, d'autres neurotrophines ont été découvertes comme le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), la neurotrophine-3 (NT-3), et les neurotrophines 4/5(Huang and Reichardt, 2003). A l'exception de $P75^{NTR}$, tous les récepteurs aux neurotrophines ont une activité tyrosine kinase. Le NGF se lie à Trk-A (Tropomyosin Releated Kinase), le récepteur Trk-B lie préférentiellement le BDNF et NT 4/5, et Trk-C lie la NT-3. $P75^{NTR}$ quant à lui, lie avec une faible affinité toutes les neurotrophines(Friedman and Greene, 1999).

La liaison des neurotrophines à leurs récepteurs active des voies de survie, notamment les voies PI3K (PhosphatidylInositol-3 Kinase) et ras. En revanche, s'il y a peu ou pas de neutrophine, on a inhibition de la voie PI3K, augmentation de la production de ROS (Reactive Oxygen Species) *via* la voie JNK (c-Jun amino N-terminal Kinase), et activation de l'apoptose, notamment la voie intrinsèque *via* l'activation de Bax et l'inhibition de Bcl-2(Kajta, 2004).

Par ailleurs, l'invalidation des récepteurs aux neurotrophines conduit à la mort des cellules qui les expriment. En effet, ces neurones n'ont alors plus de signal de survie, et on parle de mort par « défaut »(Klein et al., 1993).

3-3 La Nétrine-1 est un facteur de survie

Outre son rôle de facteur de guidage, la Nétrine-1 contrôle également la survie cellulaire, en particulier la survie neuronale(Tang et al., 2008). En effet, la Nétrine-1 est le ligand de plusieurs récepteurs dont certains comme DCC, Unc5H(1 à 4) et

Néogénine(Llambi et al., 2001; Matsunaga et al., 2004; Mehlen et al., 1998; Wang et al., 2008a) appartiennent à une famille de récepteurs possédant l'étonnante capacité d'induire l'apoptose en absence de leur ligand : les Récepteurs à Dépendance (DR). Tous ces thèmes vont être abordés mais, ayant principalement travaillé sur DCC au cours de ma thèse, je décrirai essentiellement le rôle de ce récepteur et de sa signalisation pro-apoptotique.

3-3-1 Les récepteurs à dépendance

Les DRs sont une famille de récepteurs présentant essentiellement une homologie fonctionnelle et non structurelle. Ces récepteurs ont une signalisation classique en présence de leur ligand : différenciation cellulaire et guidage axonal par exemple. En revanche, ils présentent une originalité en absence de leur ligand puisqu'alors qu'il est couramment admis que dans ces conditions un récepteur « classique » est inactif, les DRs vont *a contrario* pouvoir activer une signalisation pro-apoptotique (figure 23 a). Par conséquent, l'expression d'un tel récepteur par une cellule va conduire celle-ci à un état de dépendance vis à vis du ligand.

En ce qui concerne leurs structures, il a été identifié le domaine DART (Dependence Associated Receptor Transmembrane) qui semble conservé chez les DRs(del Rio et al., 2007). Toutefois, le rôle de ce domaine est encore inconnu.

A ce jour, dix-huit récepteurs appartiennent à cette famille : DCC(Mehlen et al., 1998), les récepteurs de la famille unc5h(Llambi et al., 2001; Wang et al., 2008a), la Néogénine(Matsunaga et al., 2004), $P75^{NTR}$(Rabizadeh et al., 1993), RET(REarranged during Transfection)(Bordeaux et al., 2000), Trk -A et -C(Nikoletopoulou et al.; Tauszig-Delamasure et al., 2007), Patched(Thibert et al., 2003), EphA4(Furne et al., 2009), ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase)(Mourali et al., 2006), MET(Tulasne et al., 2004), l'intégrine $\alpha V\beta 3$(Stupack et al., 2001), AR (Androgen Receptor)(Ellerby et al., 1999), le récepteur à l'insuline, et à l'IGF-1 Insulin-like Growth Factor-1)(Boucher et al., 2010)(figure 23 b).

En général, ces récepteurs sont clivés par les caspases en absence de leur ligand. Ceci aurait pour effet de libérer ou d'exposer un domaine pro-apoptotique capable d'activer la cascade des caspases(Mehlen and Furne, 2005).

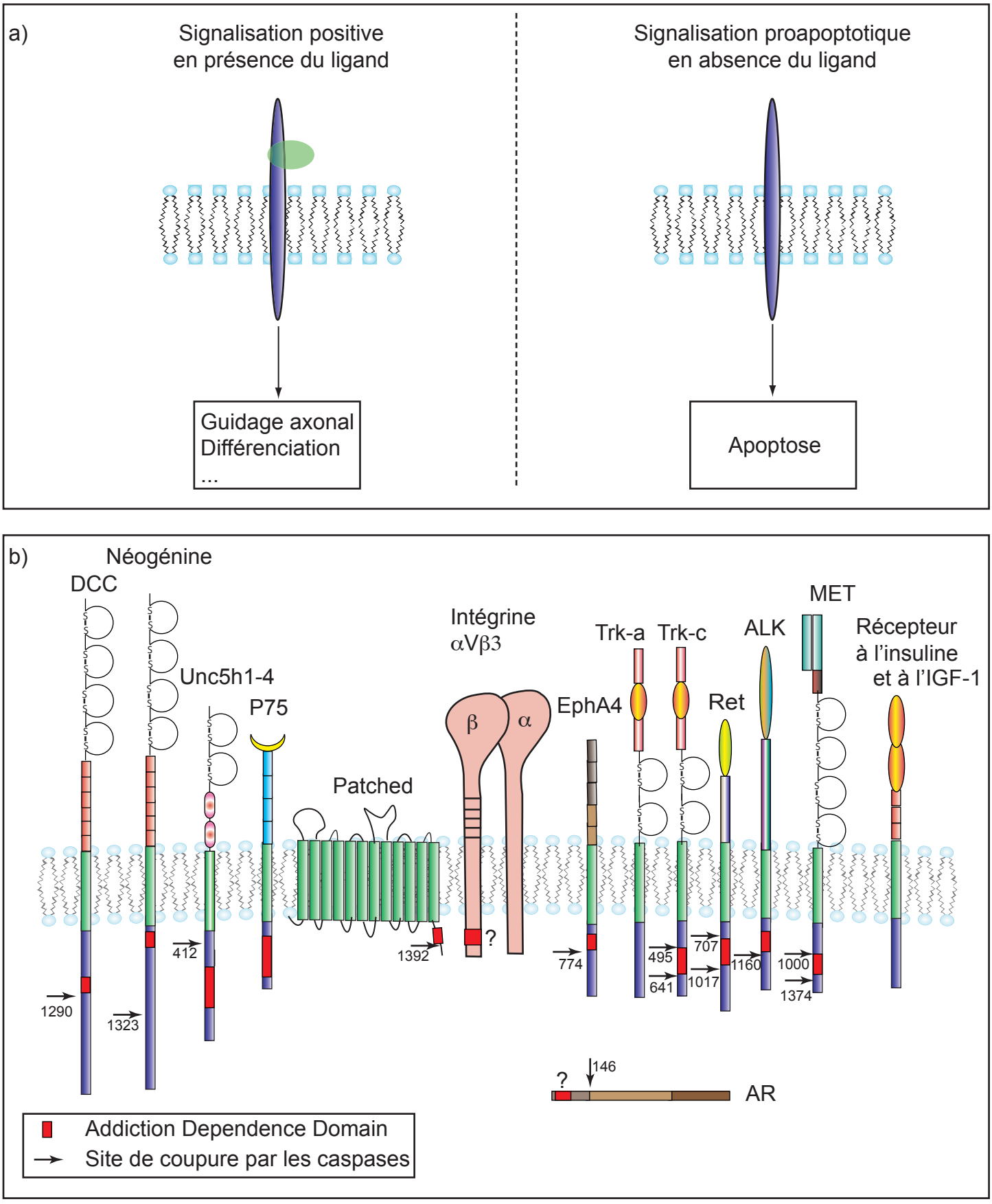


Figure 23: Concept et famille des récepteurs à dépendance
(a) En présence du ligand, les récepteurs à dépendance induisent une signalisation dite "positive" de différenciation, guidage axonal, migration...Tandis qu'en absence de leur ligand, ils enclanchent une voie de signalisation proapoptotique qui active les caspases et élimine la cellule par apoptotse.
(b) Membres de la famille des récepteurs à dépendance.
L'ADD est représenté par un rectangle rouge quand il a été déterminé. Ces récepteurs sont clivés par les caspases exceptés P75 et les intégrines. Trk-A tout comme le récepteur à l'insuline et celui de l' IGF-1 n'ont pas de site de clivage décrit.

Au cours du développement pendant lequel ils sont souvent exprimés, ces récepteurs pourraient participer à un contrôle du nombre de cellules. Des études utilisant des lignées de souris transgéniques ont en effet permis d'observer que celle du ligand est responsable d'une augmentation de l'apoptose, tandis que l'invalidation du récepteur peut être à l'origine de cellules surnuméraires. Il se pourrait donc en particulier que les DRs régulent le nombre de neurones au cours du développement du SNC, indépendamment de la théorie neurotrophique (pour revue (Goldschneider and Mehlen; Mehlen)).

En outre, les DRs sont aussi impliqués dans le phénomène de cancérisation (pour revue (Mehlen and Guenebeaud)), ce qui commence a être relativement bien décrit en ce qui concerne DCC et la famille Unc5(Bernet et al., 2007; Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Fitamant et al., 2008; Mazelin et al., 2004; Paradisi et al., 2009). Il ressort de ces études que certaines cellules tumorales pourraient perdre la dépendance au ligand, favorisant ainsi l'initiation et/ou la progression tumorale. Cette perte de dépendance peut s'effectuer *via* trois mécanismes: (i) surexpression du ligand, (ii) perte d'expression du récepteur, et (iii) invalidation de la voie de signalisation pro-apoptotique.

3-3-2 la signalisation pro-apoptotique de DCC

Dans le chapitre 1-2-1-1, nous avons vu que DCC a été initialement décrit comme un potentiel gène suppresseur de tumeur, et seulement ensuite comme un récepteur à la molécule chimiotropique Nétrine-1. Ces deux rôles semblaient difficilement compatibles. Toutefois, l'identification de DCC en tant que DR a permis de concilier ces deux facettes. En effet, outre une signalisation dite classique en présence de son ligand comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, en absence de Nétrine-1, DCC active un processus conduisant à l'élimination de la cellule par apoptose(Mehlen et al., 1998).

La signalisation pro-apoptotique de DCC a été partiellement étudiée mais, même s'il reste encore des zones d'ombre, on sait d'ores et déjà que les voies classiques d'induction de l'apoptose (intrinsèque et extrinsèque) ne sont pas empruntées. En effet, l'apoptose médiée par DCC est indépendante du complexe cytochrome C/APAF-1/caspase-9 (ou apoptosome), et de la caspase-8 recrutée au niveau du DISC(Forcet et al., 2001). En absence de Nétrine-1, DCC est clivé, probablement par une caspase, dans son domaine intracellulaire au niveau d'un site LSVD, après l'aspartate 1290. *In vitro*, ce

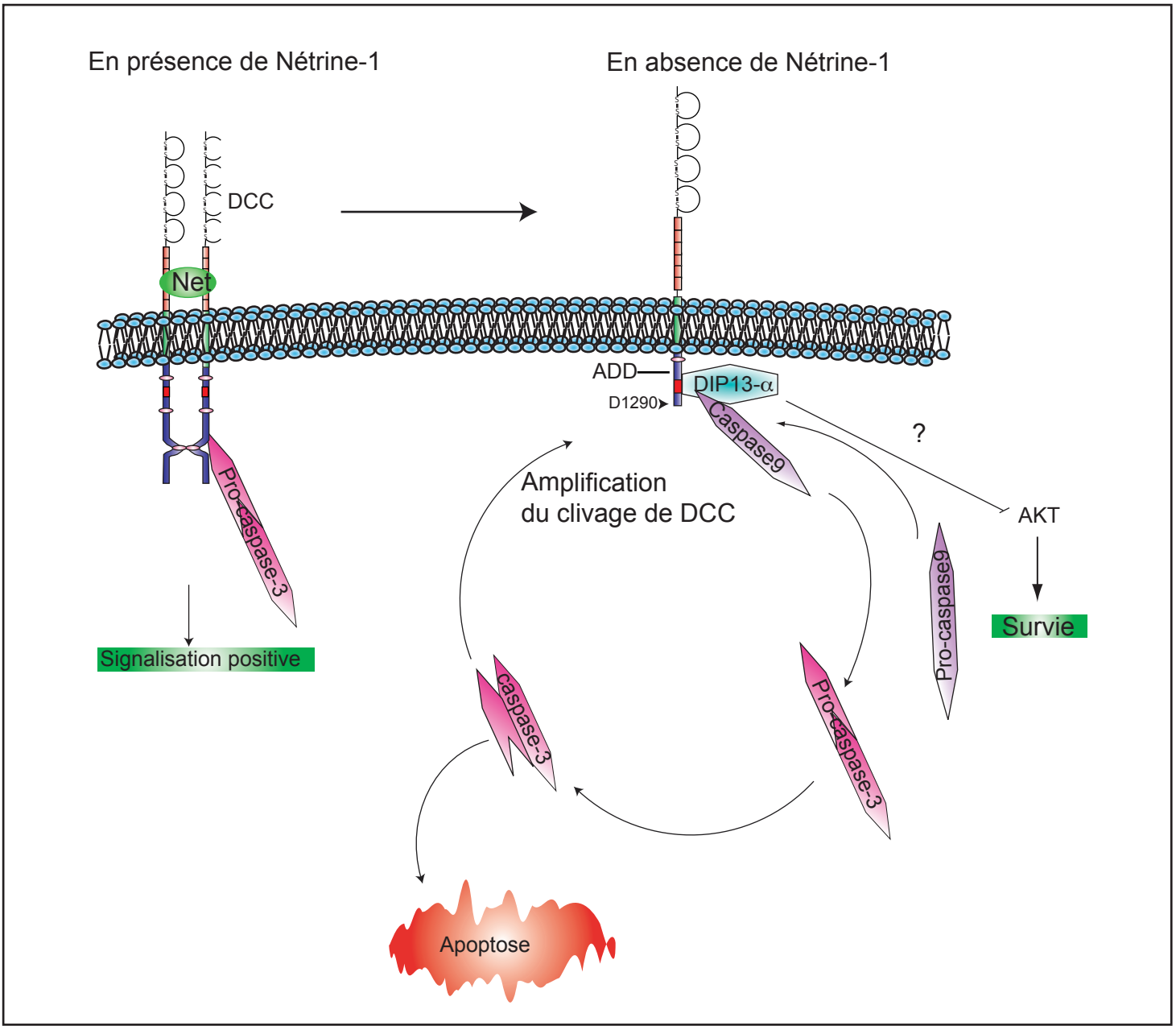


Figure 24: Modèle d'activation de la signalisation proapoptotique de DCC
En présence de Nétrine-1, DCC a une signalisation positive et interagit avec la caspase-3.
En absence de Nétrine-1, DCC serait clivé par une caspase après le résidu aspartate 1290 ce qui aurait pour conséquence le démasquage de l'ADD. L'ADD pourrait ensuite recruter la pro-caspase-9 probalement *via* la protéine DIP13-α. La caspase-9 ainsi activée, pourrait à son tour cliver et activer la pro-caspase-3. La caspase-3 pourrait cliver d'autres récepteurs DCC réalisant ainsi une boucle d'amplification du signal proapoptotique. En outre, la protéine DIP13-α pourrait aussi inhiber la voie de survie AKT.
L'ensemble de ces événements aboutirait à l'élimination de la cellule par apoptose. Net: Nétrine-1

clivage peut être réalisé par la caspase-3(Mehlen et al., 1998). Sachant que la forme zymogène de la caspase-3 possède une activité protéolytique basale(Yang et al., 1998), on peut penser qu'*in vivo*, DCC pourrait être clivé par une procaspase. Ce clivage serait alors à l'origine du démasquage d'un domaine appelé ADD (Addiction Dependence Domain), situé en amont du site de clivage. Cet ADD serait nécessaire et suffisant à l'induction de la mort cellulaire par DCC puisque la délétion de vingt acides aminés avant le site de clivage abolit la signalisation pro-apoptotique(Mehlen et al., 1998). Une étude a décrit que la protéine DIP13-α (DCC Interacting Protein-α) interagit avec l'ADD de DCC et que cette interaction est requise pour l'activation de la mort cellulaire(Liu et al., 2002). Ceci est à rapprocher du fait qu'en absence de Nétrine-1, l'ADD interagit aussi avec la caspase-9, alors que la présence de Nétrine-1 abolit cette interaction(Forcet et al., 2001). Le déclanchement de l'apoptose induite par DCC requiert la caspase 9 dont l'interaction indirecte avec DCC serait justement médiée par DIP13-α. Il convient aussi de noter que DIP13-α pourrait inhiber la voie de survie AKT, même si d'autres investigations sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

En outre, contrairement à la procaspase-9, la procaspase-3 interagit avec DCC en présence de Nétrine-1. Cette interaction pourrait servir de réserve en attendant l'activation de la voie pro-apoptotique(Forcet et al., 2001).

Enfin, l'induction de l'apoptose par DCC requiert sa localisation dans les radeaux lipidiques. En absence de Nétrine-1, la destruction des radeaux lipidiques par une drogue abolit l'interaction entre DCC et la procaspase-9, prévenant ainsi l'apoptose induite par DCC(Furne et al., 2006).

Toutes ces observations ont permis d'élaborer le modèle décrit en figure 24(Mehlen and Furne, 2005).Afin de compléter celui-ci, d'autres investigations sont en cours au laboratoire pour identifier l'ensemble des protagonistes de la voie de signalisation pro-apoptotique de DCC, ainsi que celle d'autres DRs.

3-3-3 La Nétrine-1 est un facteur de survie neuronale

A ce jour, les preuves soutenant le rôle de facteur de survie neuronale pour la Nétrine-1 vont croissant. En effet, l'étude des souris invalidées pour la *nétrine-1* a démontré sur plusieurs populations neuronales que la Nétrine-1 contrôle leur survie. En 1999 par exemple, une étude a démontré que l'invalidation de la *nétrine-1* perturbe la

migration des neurones olivaires, et de surcroit est à l'origine d'une diminution de leur nombre(Bloch-Gallego et al., 1999). Cette étude suggérait donc que la Nétrine-1 pouvait en plus de son activité de guidage, être un facteur de survie pour les neurones olivaires. En outre, de récents travaux démontrent sur ce même modèle que si l'invalidation de DCC perturbe elle-aussi la migration de ces neurones, elle n'est pas à l'origine d'une diminution de leur nombre(Marcos et al., 2009). Cette étude soutient ainsi l'hypothèse du rôle de la Nétrine-1 comme facteur de survie *via* l'inhibition de l'activité pro-apoptotique de DCC. En accord avec ceci, l'analyse des souris invalidées pour la *nétrine-1* au stade embryonnaire E12 montre également une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans le territoire présomptif des neurones olivaires(Llambi et al., 2001).
Par ailleurs, la Nétrine-1 est aussi un facteur de survie pour les neurones commissuraux(Furne et al., 2008). Ces travaux seront plus amplement détaillés dans la partie résultat, car c'est une étude que j'ai réalisée.

Toutefois, ces résultats soutenant le rôle de facteur de survie de la Nétrine-1 sont soumis à controverse. En effet, une étude a démontré que la plaque du plancher est la source d'un support trophique inconnu, autre que la Nétrine-1, pour les neurones commissuraux(Wang and Tessier-Lavigne, 1999). D'autre part, une autre étude suggère que le récepteur Unc5h1 contrôle l'apoptose dans le tube neural indépendamment de la Nétrine-1(Williams et al., 2006b). En effet, l'invalidation de *unc5h1* conduit à une diminution du nombre de cellules apoptotiques, tandis que l'invalidation de la *nétrine-1* n'en modifie pas le nombre. Toutefois, cette étude cible les motoneurones et non les neurones commissuraux, et ce ne sont pas les mêmes DRs qui sont impliqués. Il est donc envisageable que les neurones commissuraux se comportent différemment des motoneurones. Enfin, l'invalidation complète de *DCC* est à l'origine d'une diminution du nombre de neurones rétiniens, allant à l'encontre de la théorie des DRs(Shi et al., 2010). Toutefois, les souris Kanga, dont le domaine P3 de DCC est absent présentent le même défaut. Ce résultat suggère plutôt que les neurones rétiniens se perdent au cours de leur navigation puisque le domaine P3 est nécessaire à la dimérisation de DCC qui est elle-même requise pour la transduction du signal Nétrine-1(Stein et al., 2001). Par conséquent, les projections aberrantes doivent être éliminées par l'absence de support trophique adéquat.

3-3-4 La Nétrine-1 est un facteur de survie pour des cellules non neuronales

Hormis les neurones, le rôle de facteur de survie de la Nétrine-1 peut également être étendu à d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse(Castets et al., 2009).

Les premières études portant sur le rôle de la Nétrine-1 dans ce modèle étaient contradictoires. L'une prétendait en effet que la Nétrine-1 est un facteur pro-angiogénique(Wilson et al., 2006) et l'autre, un facteur anti-angiogénique(Lu et al., 2004). En fait, ces deux études n'utilisaient pas la même approche. En effet, la première démontrait que l'inactivation de la *nétrine-1* chez le poisson zèbre est associée à une diminution du nombre de vaisseaux, soutenant un rôle pro-angiogénique de la Nétrine-1 *via* Unc5h2(Wilson et al., 2006). En revanche, la seconde approche démontrait que l'invalidation de *unc5h2* est à l'origine d'une augmentation du nombre de vaisseaux suggérant une activité anti-angiogénique de la Nétrine-1(Lu et al., 2004).

Vu sous l'angle de la théorie des DRs on conçoit qu'en absence de Nétrine-1, les cellules endothéliales qui expriment Unc5h2 meurent, et donc que le nombre de vaisseaux diminue. En revanche en absence de Unc5h2, les cellules endothéliales ne meurent plus et par conséquent le nombre de vaisseaux augmente. Le rôle de facteur de survie de la Nétrine-1 en tant que ligand du DR Unc5h2 permet donc de réconcilier les études *a priori* contradictoires citées précédemment.

Résultats

RESULTATS

Au cours de ma thèse, mon travail s'est axé autour de deux problématiques concernant la Nétrine-1 pendant le développement du SNC. Il s'agit de la navigation neuronale (guidage axonal et migration neuronale), et de l'apoptose; deux processus cellulaires distincts intervenant lors de la mise en place du SNC dont nous avons vu dans l'introduction bibliographique de cette thèse qu'ils étaient contrôlés par la Nétrine-1.

En effet, la Nétrine-1 est un facteur de guidage contrôlant la navigation de nombreux neurones et axones lors du développement. D'autre part, la Nétrine-1 contrôle l'apoptose *via* l'inhibition de la signalisation pro-apoptotique de ses récepteurs appartenant à la famille des DRs.

Durant cette thèse, je me suis intéressé à ces deux facettes. Dans un premier temps, j'ai étudié le rôle d'un nouveau récepteur à la Nétrine-1, APP, pendant le guidage axonal. Dans un second temps, j'ai focalisé mon étude sur le rôle de la Nétrine-1 en tant que facteur de survie neuronale.

Dans cette partie résultats, les travaux seront présentés sous forme d'un résumé suivi de l'article correspondant (publication référencée ou manuscrit en cours de soumission), ou sous forme de résultats bruts.

J'ai en outre participé à l'étude de la signalisation des DRs : Néogénine, Unc5h2, patched et CDO. Les publications correspondantes sont respectivement en annexe n°2,3, 4 et 5.

Au cours de ces différentes études, j'ai développé des techniques *in vivo* relativement complexes, dont la technique d'arrêt de notochorde chez l'embryon de poulet. Cette technique consiste à enlever le nœud de Hensen et a pour conséquence l'absence de notochorde et de plaque du plancher qui sont les sources majeures de SHH dans le tube neural en développement. Ce modèle nous a permis d'étudier *in vivo* l'effet pro-apoptotique de patched en l'absence de son ligand SHH pendant le développement du tube neural.

Comme cela est décrit dans l'article traitant de CDO, un autre récepteur à SHH, j'ai aussi développé une technique d'injection de cellules dans le mésenchyme céphalique de l'embryon de poulet afin de titrer le SHH endogène. Pour cela, j'ai injecté des hybridomes produisant un anticorps bloquant dirigé contre SHH. Ainsi, l'injection de ces

cellules permet de réaliser une déplétion en SHH au niveau céphalique. Dans ces conditions, nous avons pu étudier le rôle du récepteur CDO en tant que DR dans le développement des arcs branchiaux.

Au cours de cette thèse, tant pour mon travail à proprement parler, que pour les projets auxquels j'ai contribué, j'ai donc développé de nombreux protocoles expérimentaux qui m'ont permis d'enrichir ainsi ma connaissance du système nerveux et de ses techniques d'études.

Publication n°1 : The Amyloid Precursor Protein regulates netrin-1-mediated commissural axon guidance

Une étude récente réalisée au sein du laboratoire permit d'identifier APP (Amyloid Precursor Protein) comme étant un nouveau récepteur à la Nétrine-1(Lourenco et al., 2009). APP est un récepteur transmembranaire dont le rôle physiologique est relativement peu connu. En revanche, son clivage par les sécrétases est à l'origine de la production du peptide amyloïde-β qui forme les plaques amyloïdes associées à la maladie d'Alzheimer. L'étude citée ci-dessus démontra que l'interaction Nétrine-1/APP inhibe la production de peptide amyloïde-β. Toutefois, un rôle physiologique *in vivo* de cette interaction Nétrine-1/APP reste à démontrer.

Nous proposons ici que APP pourrait être un récepteur à la Nétrine-1 impliqué pendant la navigation neuronale. Cette hypothèse est soutenue par des éléments de la littérature. En effet, de la même manière que l'invalidation de la *nétrine-1*, celle de *APP* conduit à des défauts des commissures du cerveau, comme l'absence de corps calleux ou encore une diminution de la taille de la commissure hippocampique ventrale. La sévérité de ces défauts est étroitement liée au fond génétique des souris. Afin de tester notre hypothèse, nous avons choisi d'utiliser comme modèle d'étude les neurones commissuraux spinaux qui sont les neurones qui ont permis l'établissement du paradigme de la chimioattraction par la Nétrine-1.

Dans un premier temps, nous avons démontré par hybridation *in situ* que APP est exprimé par les neurones commissuraux. Cette observation a été confirmée par une immunohistochimie qui démontre que APP est exprimé à la surface des axones commissuraux. Afin de tester le rôle de APP lors du guidage des axones commissuraux à la ligne médiane, nous avons analysé les projections commissurales d'embryons invalidés pour *APP* à E11.5. Lors de cette analyse, nous n'avons pas détecté de défauts drastiques des projections commissurales, toutefois nous avons observé la formation de faisceaux d'axones commissuraux plus larges que chez les individus contrôles. Cette observation montre que l'absence de APP conduit à des défauts de fasciculation qui peuvent être associés à des défauts de guidage des axones pionniers. Ces résultats suggèrent donc que APP est exprimé par les neurones commissuraux et qu'il participe au guidage des axones commissuraux à la ligne médiane.

Afin de tester le rôle de APP en tant que récepteur à la Nétrine-1 dans le guidage des axones commissuraux, nous avons tout d'abord cherché à voir si APP peut interagir avec DCC, le récepteur majeur de la Nétrine-1. En ce sens, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation qui ont démontré que APP interagit effectivement avec DCC et que l'ajout de Nétrine-1 augmente drastiquement cette interaction. A l'aide de délétions sur DCC et APP, nous avons cartographié cette interaction et montré qu'elle faisait intervenir le domaine transmembranaire de DCC et l'ectodomaine de APP. Quant à la Nétrine-1, un test Elisa utilisant les protéines recombinantes nous a permis de montrer qu'elle pontait directement les deux récepteurs *via* leurs domaines respectifs d'interaction à la Nétrine-1.

Nous avons alors cherché à identifier les conséquences de cette interaction entre APP et DCC sur la signalisation de DCC en présence de Nétrine-1. Nous nous sommes intéressés principalement à deux aspects de la signalisation de DCC : son activité transactivatrice résultant de son clivage par les sécrétases, et l'activation de la voie Erk1/2.

En effet, un nombre grandissant d'études suggère que le processing des récepteurs aux facteurs de guidage par les sécrétases joue un rôle fondamental dans le contrôle du guidage axonal. En ce sens, nous avons analysé les conséquences de la co-expression de APP et de DCC sur le clivage séquentiel de DCC par l'α- puis la γ-sécrétase. De manière étonnante, nous avons observé, indépendamment de la présence de Nétrine-1, que la présence de APP diminue la production du fragment de clivage γ de DCC et que le fragment α s'accumule (figure 3 a de l'article). Comme le fragment de clivage γ de DCC est connu pour avoir une activité transactivatrice, nous avons testé si l'inhibition du clivage γ par APP est associée à une diminution de l'activité transactivatrice de DCC. En effet, cette dernière est complètement abolie par APP (figure 3 b de l'article). Ces expériences suggèrent donc que APP inhiberait l'activité transactivatrice de DCC et favoriserait l'accumulation de son fragment α. En outre, c'est un effet spécifique de APP sur DCC, car DCC ne perturbe pas l'activité transactivatrice de APP (figure 3 c de l'article).

Nous avons ensuite analysé les conséquences de l'interaction APP/DCC sur une voie de signalisation classiquement décrite pour son implication dans le guidage axonal en réponse au couple DCC/Nétrine-1 : la voie Erk1/2. Si classiquement, la présence de Nétrine-1 conduit à la phosphorylation de Erk1/2, nous avons montré qu'à lui seul, APP ne peut activer la voie Erk1/2. En revanche, la co-expression de APP et de DCC renforce

la phosphorylation de Erk1/2 au cours du temps en présence de Nétrine-1. Ces données suggèrent donc que APP favorise l'activation de Erk1/2 par DCC en présence de Nétrine-1. Cet effet ne résulte pas d'une augmentation de la multimérisation de DCC par APP en présence de Nétrine-1, car des expériences de dimérisation ont démontré que APP ne module pas la dimérisation de DCC en présence de Nétrine-1 (figure 3 e de l'article).
Nous avons ensuite testé le rôle de APP dans le guidage des axones commissuraux. Puisque la Nétrine-1 est décrite pour favoriser la croissance et l'orientation du cône de croissance, nous avons d'abord testé l'implication de APP dans la croissance des axones commissuraux en réponse à la Nétrine-1. Pour ce faire, nous avons donc réalisé des tests de pousse axonale sur des explants de moelle dorsale. Les explants issus d'embryons invalidés pour APP présentent une diminution de 25% de la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1, suggérant que APP participe à la promotion de la croissance des axones commissuraux par la Nétrine-1.
Actuellement, afin d'analyser l'implication de APP dans l'orientation des axones commissuraux en réponse à la Nétrine-1, nous sommes en train de mettre au point la technique de turning assay sur la moelle épinière de rat.

Cette étude suggère donc que APP participe au guidage des axones commissuraux. En effet, APP interviendrait avec DCC en tant que co-récepteur à la Nétrine-1, et favoriserait ainsi la croissance (et peut être aussi l'orientation) axonale.

The Amyloid Precursor Protein regulates netrin-1 mediated commissural axon guidance

Nicola Rama[1], David Goldschneider[1], Véronique Corset[1], Laurent Pays[1], and Patrick Mehlen[1$]

[1]Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée 'La Ligue', CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

[$]Corresponding author: P. Mehlen; FAX (33) 4 78 78 28 87; e-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr

Running title: APP controls commissural axon guidance

Abstract

Netrin-1 a multifunctional protein was initially discovered as the main attractive cue for commissural axon guidance by acting through its receptor DCC. Recently, we have shown that netrin-1 also interacts with the orphan transmembrane receptor, Amyloid Precursor Protein (APP). While the physiological role of APP is mostly unknown, APP is cleaved by proteases generating amyloid-β (Aβ) peptide, the main component of the amyloid plaques that are associated with Alzheimer's disease. Our previous work demonstrated that netrin-1 via its interaction with APP is a key negative regulator of Aβ production in adult brain but the biological relevance of the APP/netrin-1 interaction in non pathological condition was unknown. We show here that during commissural axon navigation, APP, expressed at the growth cone, is part of the DCC receptor complex mediating netrin-1 dependent axon guidance. APP interacts with DCC in the presence of netrin-1 and enhances netrin-1 mediated-DCC intracellular signaling such as MAPK activation. Inactivation of APP in mice is associated with reduced commissural axon outgrowth. Thus, APP functionally acts as a co-receptor for DCC to mediate axon guidance.

Introduction

Netrin-1, a diffusible laminin-related molecule is now recognized as a multifunctional protein with roles as diverse as tissue morphogenesis, developmental angiogenesis or tumor progression [1-3]. However, netrin-1 remains the first identified guidance cue implicated in neuronal navigation [4, 5]. Specifically, netrin-1 is known to be expressed by the ventral structure of the neural tube, the floor plate, to guide/attract commissural axons during nervous system development [4, 5]. Definitive evidence to support netrin-1 as a central axon guidance cue was provided by the description of the netrin-1 mutant mice which exhibit severe malformations in the brain believed to be mainly due to aberrant axonal trajectories [6].

A variety of functional netrin-1 receptors have been identified including DCC, UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3, the adenosine receptor A2b, DSCAM [7-10]. DCC however appears to be the central receptor for netrin-1 mediated signaling not only because a DCC blocking antibody has been shown to inhibit netrin-1 biological effects on axon guidance [7] but also DCC mutant phenocopied netrin-1 mutant mice [11]. DCC is a large receptor that is homologous to NCAM family proteins and has been proposed to be tumor suppressor due to the loss of DCC expression in a large number of cancers [12]. The proposed function of the netrin-1/DCC interaction in axon guidance is that DCC, expressed on growth cones, is stimulated by an extracellular gradient of netrin-1, leading to the intracellular activation of small GTPases [13], the MAPK signaling pathway [14] or the activation of FAK[15, 16]. However, since the very fist initial work identifying DCC as the receptor for netrin-1, it was speculated that DCC was not the only receptor involved in transmitting the intracellular signal for commissural axon guidance but rather the transmitting receptor from a receptor

complex [7]. Along this line, additional receptors and ligands have been shown to modulate DCC-mediated commissural axon guidance. It includes the Robo1 receptor which interacts with DCC in the presence of Slit, a mechanism that is hypothesized to turn down DCC signaling once commissural neurons have reached the midline [17]. Similarly, it has recently been shown that the sonic Hedgehog receptors such as BOC participates to the guidance of commissural axons, DCC and BOC co-localizing at the growth cone [18, 19]. In a recent search for proteins interacting with DCC, we recently identified, through a proteomic approach, the APP receptor, a protein mostly known as the precursor for Aβ peptide in Alzheimer's disease and we described APP as a novel receptor for netrin-1 [20].

Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia, is a progressive neurodegenerative disorder characterized by extracellular deposits of Aβ peptide in senile plaques, intraneuronal neurofibrillary tangles, synapse loss, and cognitive decline [21]. It is widely believed that the accumulation of Aβ, a small peptide with a high propensity to form oligomers and aggregates, is central to the pathogenesis of AD. Aβ derives from the proteolytic cleavage of APP [22]. We thus demonstrated that netrin-1 functions as a ligand for APP and that it negatively regulates Aβ peptide production in Alzheimer model transgenic mice. We also provided the proof-of-concept that netrin-1 brain administration may represent an appealing strategy to improve the Alzheimer's phenotype [20].

However, although a considerable amount is known about interacting proteins and processing events for APP, the physiological role(s) of APP and its related family members, APLP1 and APLP2 (amyloid precursor-like proteins 1 and 2), is still poorly understood [22, 23]. APP has been proposed to function in cell adhesion and motility, as

well as synaptic transmission and plasticity (for a review, see [23]). Of interest, analysis of the APP-null mice revealed defects similar to what was observed in both netrin-1 and DCC mutant mice. These defects, the severity of which depends on genetic background, include abnormalities in the developing corpus callosum and other commissures [24]. We here hypothesized that these similar defects argue for a role of APP in mediating netrin-1 dependent axon guidance and we thus analyzed whether APP may participate to the guidance of commissural neurons.

Results

We first analyzed whether APP is expressed in developing commissural neurons. Immunohistochemistry was performed on tissue sections from E11.5 mouse embryos. As shown in Figure 1a, APP is nicely detected and enriched in commissural axons tract. To further confirm the APP expression in these axons, APP expression was compared to DCC expression by confocal analysis, DCC being only expressed in commissural neurons at this stage. APP co-localizes with DCC in commissural neurons (Fig.1b). This observation fits with the pan-genome expression analysis performed on commissural neurons that showed that DCC mRNA expression was specifically increased in these neurons (M. Tessier-Lavigne, personal communication).

We next assessed whether APP was somehow implicated in commissural guidance by analysis of commissural neurons bundles in APP mutant mice embryos. While we did not notice any major effect in the number bundles nor in the overall pathway of commissural extension, we did observe a change in the distribution of axon bundles with a significant thicker neurons bundles in APP -/- mutant than in wild-type animal (Fig.1bc). Such phenotype resembles to the one observed in BOC mutant mice embryos [19] thus supporting the view that APP is required for adequate commissural axon guidance.

We thus undertook to determine the precise role of APP in commissural axon guidance. APP was initially picked via a search for DCC interactors by a proteomic approach. We thus analysed whether APP interacts with DCC. B103 cells, which do not express constitutively APP and DCC, were then forced to express APP and DCC

in the presence or absence of netrin-1. As shown in Fig.2a, immunoprecipitation of DCC pulled down APP in the absence of netrin-1. However the presence of netrin-1 dramatically enhanced the interaction APP/DCC. Similar interaction was observed using an APP pull-down (Suppl. Fig.1a). We further analysed APP/DCC interaction by confocal analysis in primary culture of E11.5 mouse commissural neurons. While in the absence of netrin-1, DCC and APP only poorly co-localized, netrin-1 addition was associated with a clear DCC/APP co-localization (Fig.2b and Suppl. Fig.1bc). This interaction between DCC and APP was also detected in vivo, as pull-down with an APP antibody allows the detection of DCC in brain of E11.5 mouse embryos (Fig.2c).

We thus mapped the domains in DCC and APP implicated in this interaction. Immunoprecipitations were then performed using B103 cells forced to express different deletion mutants of either DCC or APP (Fig.2d). As shown in Fig.2ef, while the intracellular domain of DCC failed to interact with APP, the deletion of this domain has no impact on APP/DCC interaction. Thus the domain of interaction of DCC with APP lies in the ectodomain of DCC. Of interest a mutant of DCC-ΔEC including the intracellular domain of DCC but including its transmembrane domain (approximately up to the α-secretase cleavage of DCC [25] [26] interacts with APP, thus suggesting that the transmembrane region of DCC is important for APP/DCC interaction. Along the same line, the carboxy-terminal C83 derived from the γ-secretase cleavage of APP fails to interact with DCC, hence showing that DCC interacts with APP ectodomain (Fig.2g). Interestingly, the C100 protein, derived from the β-secretase cleavage of APP (see scheme in Fig.2d), is pulled down with DCC supporting the view that the binding region of APP is localized between the β-cleavage site and the α-cleavage

site – i.e., the 17 aminoterminal residues of Aβ, even though this may not be the only interacting domain of APP with DCC.

Because APP interacts with DCC and because DCC is known to transduce netrin-1 signaling in commissural neurons [14, 27] [11, 15], we then investigated the role of APP in DCC signaling. Two distinct general type of mechanisms for transducing downstream signals have been reported for DCC: one nuclear signaling upon DCC intracellular domain cleavage by γ-secretase, allowing DCC intracellular domain mediated gene transcription (Goldschneider et al., in prep.), and one cytoplasmic involving classic signaling pathways like MAPK activation, the latter one being key for commissural axon guidance [14, 15]. In B103 cells forced to express DCC, APP presence efficiently blocked the γ-secretase cleavage of DCC (Fig.3a) and the transcriptional activity of DCC-Gal4 fusion protein in a Gal4-luc reporter assay (Fig.3b). Such inhibitory effect of APP on DCC cleavage was specific as UNC5H2, known to interact with DCC [28] had no effect on DCC cleavage while APP had no effect on Notch cleavage (Fig.3a). Thus APP antagonizes the nuclear signaling of DCC. On the opposite it enhances the cytoplasmic signaling of DCC. Indeed, as shown in Fig.3d, DCC expressed in B103 cells triggers ERK-1/2 phosphorylation in response to netrin-1 in a very transient manner –i.e., maximum at 5min and no more detected at 15min-. In the presence of APP, ERK-1/2 phosphorylation appeared increased in intensity and was prolonged up to 1hour (Fig.3d). Taken together, these data support the view that APP participates in DCC signaling by enhancing the activation of the MAPK.

We thus analyzed whether APP is required for commissural axon guidance triggered by netrin-1. Netrin-1 is known to guide commissural axon and as such

trigger both commissural axon outgrowth and orientation. Axon outgrowth can be monitored using explants from dorsal spinal cord from E11.5 mice embryos grown for 16-18 hours in collagen gels in the presence or not of netrin-1. As shown in Fig.4ab, spinal cord explants from E11.5 wild-type mice embryos, showed a robust axon outgrowth. When a similar experiment was performed using APP -/- mutant embyos, axon outgrowth was significantly reduced ($p<0.0001$) (Figure 4ab).

Together, we show here that during commissural axon navigation, APP, expressed at the growth cone, is part of the DCC receptor complex mediating netrin-1 dependent axon outgrowth. We show that APP interacts with DCC in the presence of netrin-1 and enhances netrin-1 mediated-DCC intracellular signaling such as MAPK activation. Moreover we provide evidence that APP is functionally implicated in netrin-1 mediated outgrowth. Ongoing work will try to assay the relative importance of APP in netrin-1 mediated turning. However netrin-1, DCC and netrin-1 appears to play a ménage à trois which can have at least two distinct functions: during embryonic development, this trio is important for neuronal wiring, APP being in this system mainly a modulator of netrin-1 response. Indeed, it is quite clear from the present data that while loss of DCC is associated with a complete inhibition of netrin-1 mediate axon outgrowth and turning, loss of APP only affect partially axon outgrowth and netrin-1 signaling. Yet APP may turn as a subtile regulator of netrin-1/DCC function. The second aspect of this trio appears to occur through adulthood, and in this case DCC is the regulator and APP the main receptor. Indeed we showed that in adult brain, netrin-1 is a functional ligand of APP and negatively regulates the formation of the Amyloid peptide [20]. This interaction may be important to regulate Alzheimer disease and it may be then very important for possible therapeutic strategy

to understand what is the relative importance of DCC in netrin-1/APP interaction in normal and pathological brain.

Materials and Methods

APP mutant animals :

Pregnant OF1 mouse females were purchased from Charles River Laboratory. APP mutant mice were genotyped as described in the reference (lourenco2009). Genotyping of APP embryos was performed by PCR using 5'-GAGACGAGGACGCTCAGTCCTAGGG-3', 5'-ATCACCTGGTTCTAATCAGAGGCCC-3' and 5'-CGAGATCAGCAGCCTCTGTTCCACA-3' primers.

Immunochemistry and in situ hybridization:

Mouse embryos were fixed in PFA4 % overnight at 4°C and equilibrated in PBS sucrose 10%. Thereafter, mouse embryos were included in gelatin7.5%, sucrose 10%. Transversal sections were performed with cryostat. For the mouse spinal cord, DCC and APP immunolocalization were performed on 20 µm sections. The sections or commissural neuron primary culture were permeabilized 30 minutes in PBS 0.2% TritonX100 and blocked 2 hours in PBS 2% normal donkey serum (NDS), 0.2% TritonX100. Sections were then incubated overnight at 4°C with anti-APP antibody (Sigma; A8717) (35 µg/ml) and anti-DCC antibody (DCC-A20; Santa Cruz)(0.5µg/ml) or (G97-449; BD Pharmingen)(5 µg/ml) respectively detected by Alexa488-Donkey Anti-rabbit (A21206) and Alexa647-Donkey Anti-goat (A21447) or mouse (A31571)(InVitrogen) 1/400. Tag-1 immunolocalization was performed as described in Serafini1996. In situ hybridization against APP was performed as described in (mazelin-2004) on 20 µm sections. The riboprobes were produced by PCR using specific primers.

Image Analysis:

For the measure of commissural axon bundles, images were acquired with Zeiss Axiovert 200 microscope and analysed with Axovision software, Zeiss. The width of commissural axon bundles was quantified at d/2 (see figure 1 c). The width of neural

tube side (a) and commissural axon bundles (b) were measured. The ratio b/a was analyzed. For the colocalization analysis, the acquisition was performed on Zeiss Axioplan2 LSM510 confocal microscope and images were analyzed on ImageJ sotware with the plugins JACoP(ref:17210054).

Plasmids:

For in vitro experiments, the constructs used are the following. pCMV-DCC, pCR-DCC-IC, pCMV-DCCΔEC were described in [29]. pCDNA3-APP, pCDNA3-APPC100, pCDNA3-APP-C83, pGLUC, pCMV-Renilla, pMST, pMST-APP-Gal4 and pCMV-Fe65 were described previously [20]. pCMVneo-DCC- GIC, pGNT1-myc, pCDNA3.1-Unc5h2, pCS2-Notch were respectively described in [4, 30, 31].

Cells, Transfection and reagents:

Transfections of B103 (rat neuroblastoma) cells were performed using the lipofectamine reagent (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. For Co-immunoprecipitation, B103 cells were transfected by calcium phosphate. The γ-secretase inhibitor N-[N-(3,5-difluoro- phenylacetyl)-L-alanyl]-(S)-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) and the protea- some inhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132) were purchased from Sigma and used at 2 μM and 1 μM, respectively.

Immunoprecipitation and western blotting:

Co-immunoprecipitations were processed as it was described in (forcet2002) with anti-DCC antibody (G97-449; BD Pharmyngen) (0.5 μg/ml) or anti-APP antibody (Sigma; A8717) (015 μg/ml). For co-immunoprecipitation on fresh tissues, E11.5 brains and spinal cords were homogenized in TrisHCl 0.05M pH7.5; NaCl 0.15M; TritonX100 0.5% ;Glycérol 5% ; protease inhibitor. Co-immunoprecipitations were performed using the microbeads system developed by Miltenyi Biotech.

Immunoblots were performed using different commercially available antibodies: phospho-ERK-1/2(Cell Signaling Technology), ERK-1/2(Sigma), DCC(BD Pharmingen), APP (Sigma), c-Myc (Sigma) and HA (Sigma).

Primary culture of spinal cord commissural neurons

Commissural neurons were obtained from embryonic day 11.5 mice embryos by dissecting out the dorsal spinal cord. The tissues were then dissociated as described previously [32]. The dissociated cells were plated on poly(L-lysine)-precoated coverslips at 3.105 cells per well on a 24-well plate. Commissural neurons were cultured 18 hours in neurobasal medium containing 5% Horse serum. Commissural neurons were then cultured 30 minutes in neurobasal medium containing 300 µg/ml of netrin-1 (apotech) and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA). Immunocytochemistry against APP and DCC were performed and followed by colocalization assay.

Transactivation assays:

Transactivation assays were performed as described in [30].

Axonal outgrowth assays:

Commissural axon outgrowth assays were performed as described before [14 9]. The outgrowth from E11.5 dorsal explants of mice embryos was quantified by measuring the total length of all axon fascicles leaving the explant (mean length of axon bundles by explant).

APP/DCC/netrin-1 interaction detection by ELISA assay:

96-well plates were coated 1 hour at room temperature with a secreted form of APP, 6.25 nM (sigma) in PBS. After 2 hours blocking at RT with 5% fœtal calf serum (FCS) in PBS, wells were washed (0.05% Tween20 in PBS), and then incubated with DCC ectodomain (RD System) at a concentration range from 3.125 nM to 25 nM. This was done at room temperature (RT) for 1 h with or without netrin-1 at 5 nM(apotec).

Washed wells were incubated with an anti-DCC, 0.1 µg/ml (Ab1-Calbiochem) in blocking buffer for 1 hour at RT. A Horseradish Peroxidase-conjugated antimouse antibody (Jackson ImmunoResearch Inc.) was added at a concentration of 0.8 µg/ml for 1 h at RT. Washed wells were then incubated with a chemiluminescent substrate (Pierce ECL Western Blotting Substrate). The luminescence was read on a Tecan Infinite P500 luminometer.

Acknowledgments:

This work was supported by institutional grant from CNRS, University of Lyon, Centre Léon Bérard and from the Ligue Contre le Cancer, INCA, ANR, IP ApoSys.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.M. (e-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr).

References

1. Cirulli, V. & Yebra, M. Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 296-306 (2007).
2. Castets, M. & Mehlen, P. Netrin-1 role in angiogenesis: To be or not to be a pro-angiogenic factor? *Cell Cycle* **9**.
3. Castets, M. *et al.* Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis. *Dev Cell* **16**, 614-620 (2009).
4. Serafini, T. *et al.* The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6. *Cell* **78**, 409-424 (1994).
5. Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C.S. The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133 (1996).
6. Serafini, T. *et al.* Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* **87**, 1001-1014 (1996).
7. Keino-Masu, K. *et al.* Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* **87**, 175-185 (1996).
8. Leonardo, E.D. *et al.* Vertebrate homologues of C. elegans UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* **386**, 833-838 (1997).
9. Corset, V. *et al.* Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature* **407**, 747-750 (2000).
10. Ly, A. *et al.* DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1. *Cell* **133**, 1241-1254 (2008).
11. Fazeli, A. *et al.* Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* **386**, 796-804 (1997).
12. Mehlen, P. & Fearon, E.R. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* **22**, 3420-3428 (2004).
13. Li, X., Saint-Cyr-Proulx, E., Aktories, K. & Lamarche-Vane, N. Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **277**, 15207-15214 (2002).
14. Forcet, C. *et al.* Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* **417**, 443-447 (2002).
15. Ren, X.R. *et al.* Focal adhesion kinase in netrin-1 signaling. *Nat Neurosci* **7**, 1204-1212 (2004).
16. Li, W. *et al.* Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nat Neurosci* **7**, 1213-1221 (2004).
17. Stein, E. & Tessier-Lavigne, M. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**, 1928-1938 (2001).
18. Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A.P. & Tessier-Lavigne, M. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* **113**, 11-23 (2003).
19. Okada, A. *et al.* Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* **444**, 369-373 (2006).

20. Lourenco, F.C. *et al.* Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. *Cell Death Differ* **16**, 655-663 (2009).
21. Hansen, L.A. & Terry, R.D. Position paper on diagnostic criteria for Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **18**, S71-73 (1997).
22. Koo, E.H. The beta-amyloid precursor protein (APP) and Alzheimer's disease: does the tail wag the dog? *Traffic* **3**, 763-770 (2002).
23. Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P. & Abraham, W.C. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* **70**, 1-32 (2003).
24. Magara, F. *et al.* Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4656-4661 (1999).
25. Goldschneider, D., Rama, N., Guix, C. & Mehlen, P. The neogenin intracellular domain regulates gene transcription via nuclear translocation. *Mol Cell Biol* **28**, 4068-4079 (2008).
26. Parent, A.T., Barnes, N.Y., Taniguchi, Y., Thinakaran, G. & Sisodia, S.S. Presenilin attenuates receptor-mediated signaling and synaptic function. *J Neurosci* **25**, 1540-1549 (2005).
27. Hong, K., Nishiyama, M., Henley, J., Tessier-Lavigne, M. & Poo, M. Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature* **403**, 93-98 (2000).
28. Hong, K. *et al.* A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* **97**, 927-941 (1999).
29. Mehlen, P. *et al.* The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395**, 801-804 (1998).
30. Taniguchi, Y., Kim, S.H. & Sisodia, S.S. Presenilin-dependent "gamma-secretase" processing of deleted in colorectal cancer (DCC). *J Biol Chem* **278**, 30425-30428 (2003).
31. Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E. & Mehlen, P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *Embo J* **20**, 2715-2722 (2001).
32. Furne, C., Rama, N., Corset, V., Chedotal, A. & Mehlen, P. Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14465-14470 (2008).

Figure Legends

Figure 1: APP is expressed in commissural and is important during commissural axon navigation.

a. In Situ hybridization against APP on mouse spinal cord at E10.5 & E11.5 shows that APP is expressed by commissural neurons. **b.** APP protein was detected on commissural axons (arrows) with DCC positive axons (arrowhead) by immunochemistry. **c.** General diagram for the measurement of commissural axon bundles width. **d.** Tag-1 immunostainning on E11.5 spinal cord shows an increase of commissural axon width in APP KO which was determined (**e**). Statistical test : Mann-Whitney. C: commissural neurons; M: motoneurons; P: neuronal progenitors; V: ventricular zone; DRG: dorsal root ganglion.

Figure 2: APP interacts with DCC.

a. Netrin-1 promotes APP & DCC complex formation in vitro. Coimmunoprecipitation (IP) performed in B103 cells transiently cotransfected with an APP-expressing vector with or without a DCC-expressing construct in presence of netrin-1 or not . **b.** Colocalization between APP (green) & DCC (red) is increased by netrin-1 in growth cone cultured commissural neurons. **c.** Endogenous APP & DCC interact in E11.5 brain and spinal cord extracts. **d.** Diagram of the constructions used in Co-IP experiments in (**e**) and (**f**). **e.** DCCΔEC is still able to interact with APP independently of netrin-1. **f**, In presence of netrin-1, APP-C100 interacts with DCC, whereas APP-C83 fails to interact with DCC. **g.** An ELISA test between αAPPs & DCC ectodomain was performed and showed that αAPPs & DCC ectodomain required netrin-1 to interact. αAPPs (6.25nM) was coated and DCC at various concentration was added with or without netrin-1 (5nM).

Figure 3: APP modulates netrin-1-induced DCC signaling.

a. APP inhibits the γ-cleavage of DCC resulting in the accumulation of the α-fragment, whereas Notch & Unc5h2 have no effect (DAPT : 2µM; MG132 : 1µM). **b.** APP abolishes the DCC transactivation activity. **c.** APP transactivity is not modified by DCC. **d.** APP collaborates with DCC to strengthen the ERK1/2 phosphorylation in

response to netrin-1. Statistical test : Mann-Whitney. **e.** APP does not modulate the DCC dimerization with netrin-1.

Figure 4: APP is required for commissural axon outgrowth and turning

a. WT or APP KO of E11.5 mouse dorsal spinal cord explants cultured alone or with netrin-1 (7.4nM). **b.** Quantitative analysis of axon bundle length. Statistical test : t-test.

Supp Figure 1: APP and DCC co-immunoprecipitate and co-localize.

b. Netrin-1 promotes APP & DCC complex formation in vitro (B103 cells-co-immunoprecipitation). **b.** The colocalization between APP and DCC was quantified with JACoP plugin of ImageJ. Netrin-1 increases the colocalization. **c.** Control experiment of co-immunostaining without DCC or APP antibody. **d.** APP-C100 and APP-C83 failed to interact with DCC without netrin-1.

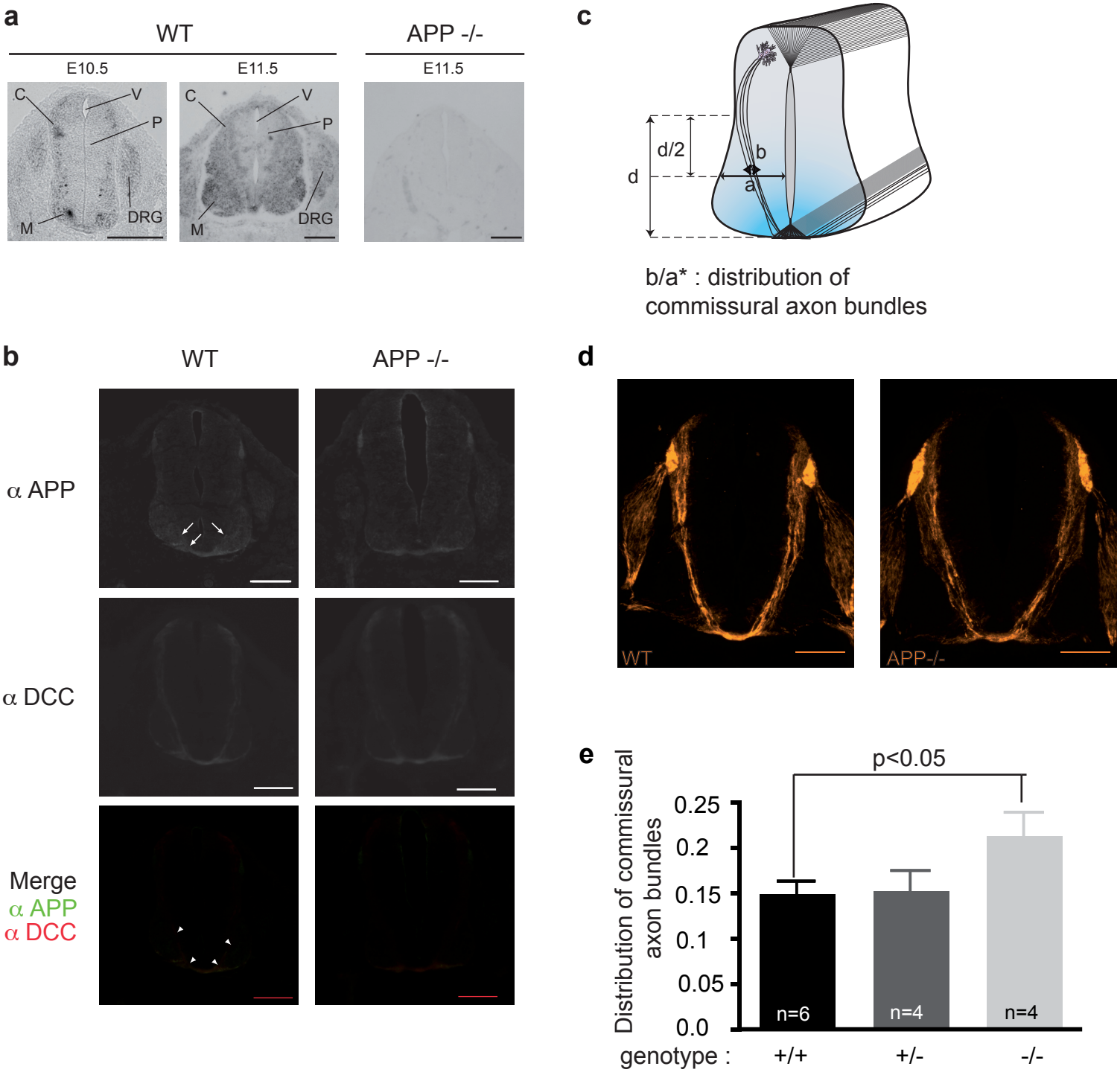

a
WT
APP -/-
E10.5
E11.5
E11.5
C
V
P
M
DRG
b
WT
APP -/-
α APP
α DCC
Merge
α APP
α DCC
c
d/2
d
b
a
b/a* : distribution of
commissural axon bundles
d
WT
APP-/-
e
p<0.05
Distribution of commissural
axon bundles
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0.0
n=6
n=4
n=4
genotype :
+/+
+/-
-/-

Fig1

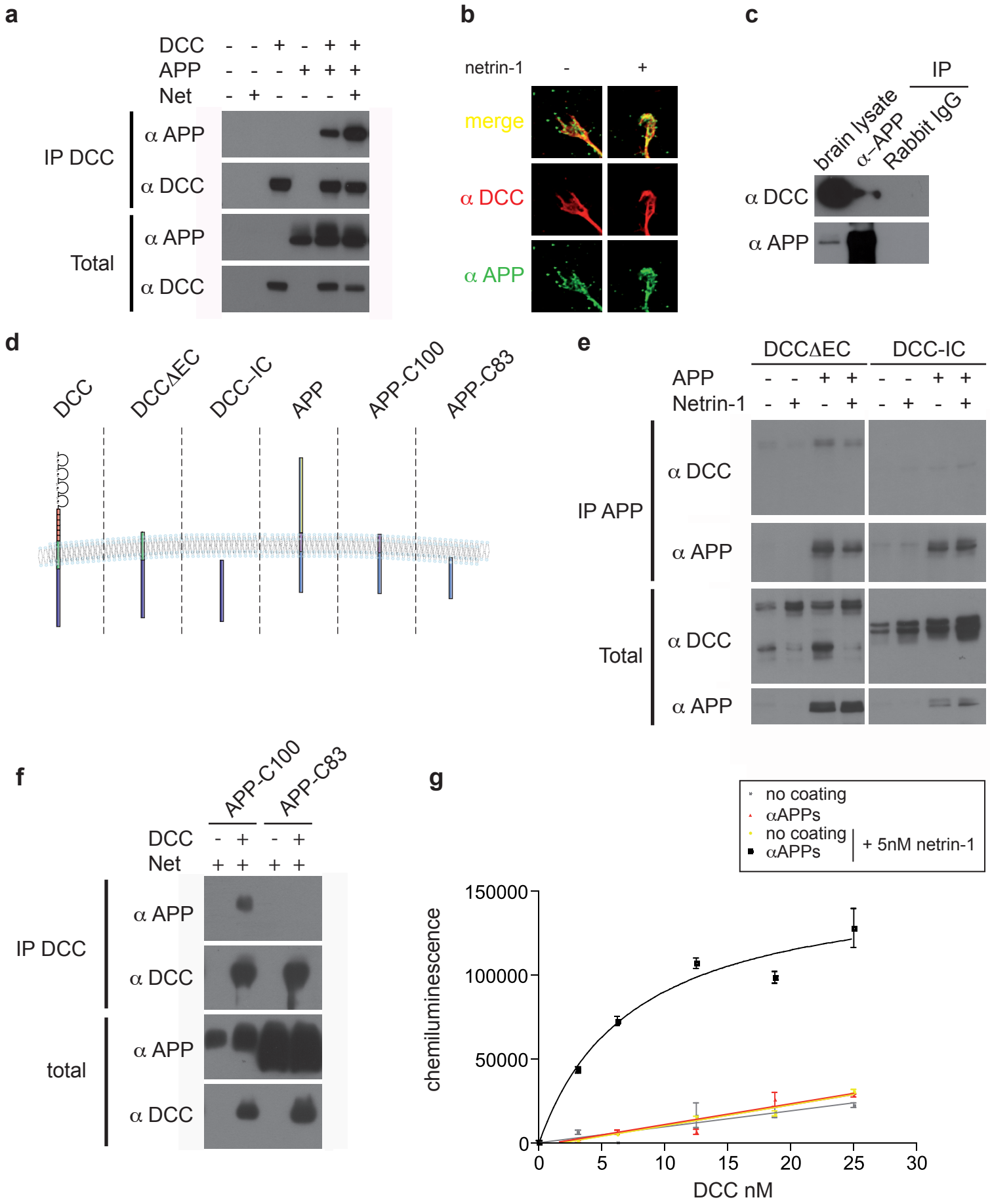
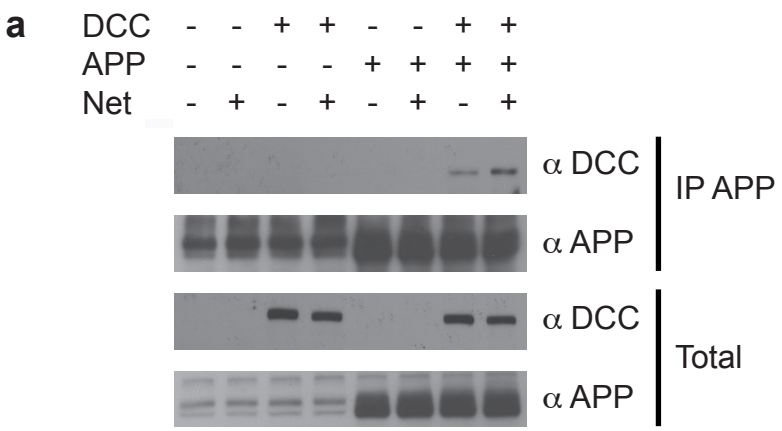
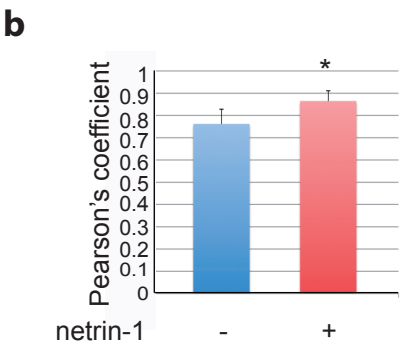
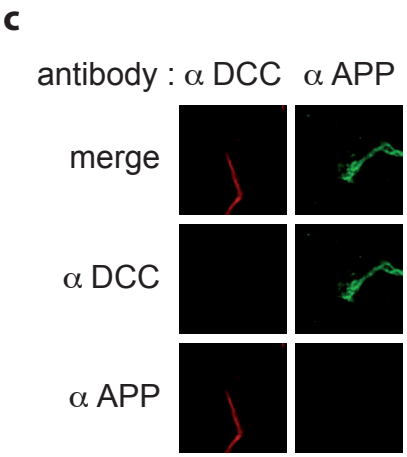

a
DCC - - + - + +
APP - - - + + +
Net - + - - - +
IP DCC
α APP
α DCC
Total
α APP
α DCC
b
netrin-1 - +
merge
α DCC
α APP
c
IP
brain lysate
α–APP
Rabbit IgG
α DCC
α APP
d
DCC
DCCΔEC
DCC–IC
APP
APP-C100
APP-C83
e
DCCΔEC
DCC-IC
APP - - + + - - + +
Netrin-1 - + - + - + - +
IP APP
α DCC
α APP
Total
α DCC
α APP
f
APP-C100
APP-C83
DCC - + - +
Net + + + +
IP DCC
α APP
α DCC
total
α APP
α DCC
g
no coating
αAPPs
no coating
αAPPs
+ 5nM netrin-1
chemiluminescence
150000
100000
50000
0
0 5 10 15 20 25 30
DCC nM

Fig2


a
DCC - - + + - - + +
APP - - - - + + + +
Net - + - + - + - +
α DCC
α APP
IP APP
α DCC
α APP
Total


b
Pearson's coefficient
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
*
netrin-1
-
+


c
antibody : α DCC α APP
merge
α DCC
α APP

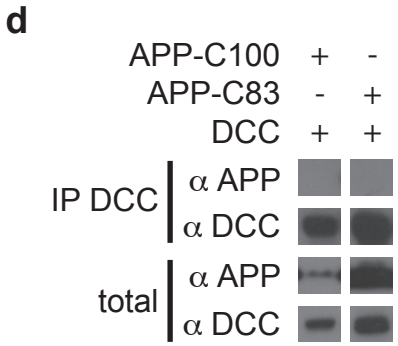

d
APP-C100 + -
APP-C83 - +
DCC + +
IP DCC
α APP
α DCC
total
α APP
α DCC

Fig1 sup.

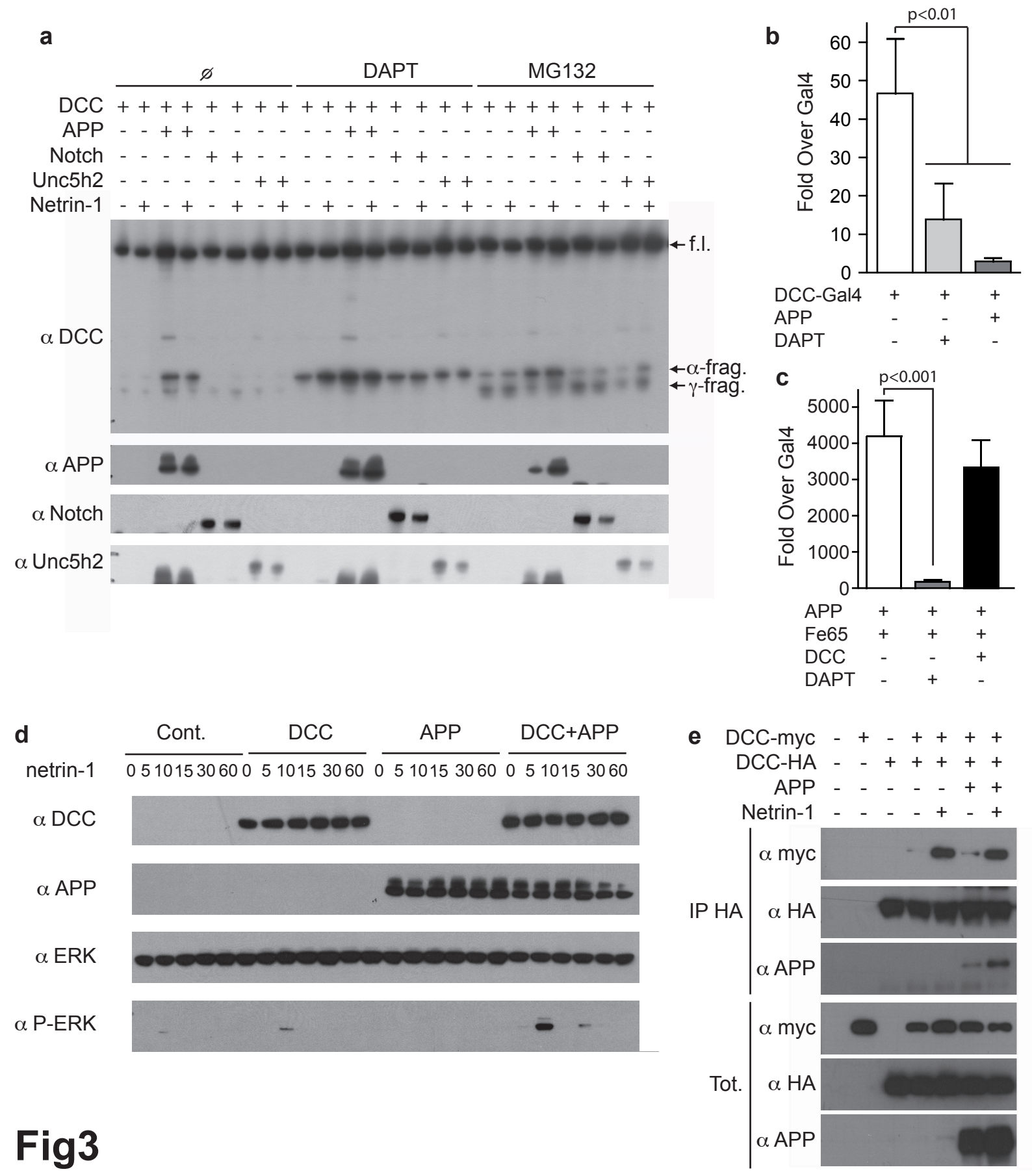

a
Ø
DAPT
MG132
DCC
APP
Notch
Unc5h2
Netrin-1
f.l.
α-frag.
γ-frag.
α DCC
α APP
α Notch
α Unc5h2
b
p<0.01
Fold Over Gal4
DCC-Gal4
APP
DAPT
c
p<0.001
Fold Over Gal4
APP
Fe65
DCC
DAPT
d
Cont.
DCC
APP
DCC+APP
netrin-1
0 5 10 15 30 60
α DCC
α APP
α ERK
α P-ERK
e
DCC-myc
DCC-HA
APP
Netrin-1
IP HA
α myc
α HA
α APP
Tot.
α myc
α HA
α APP

Fig3

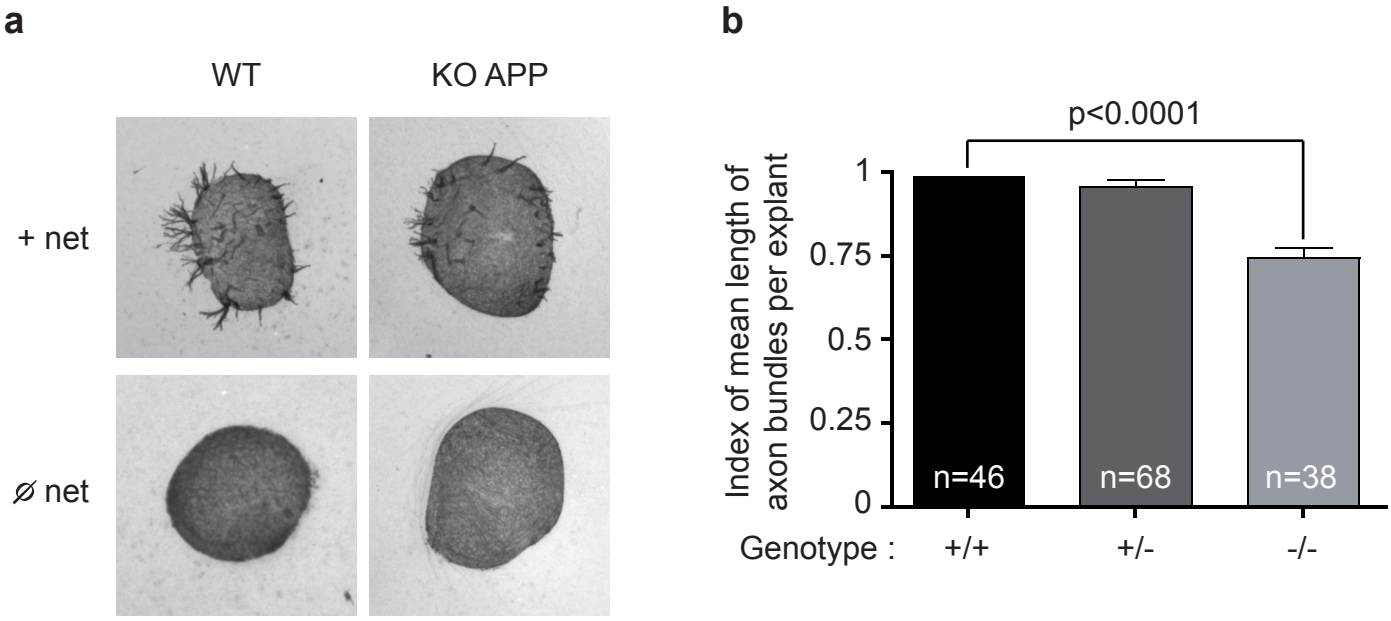
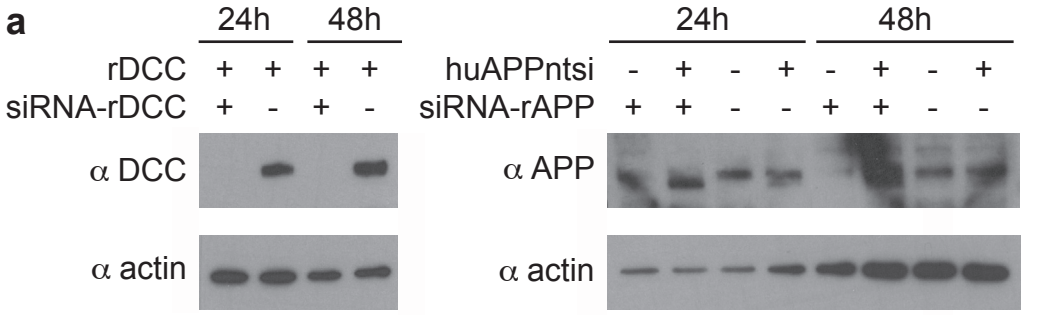

a
WT
KO APP
+ net
⌀ net
b
p<0.0001
Index of mean length of axon bundles per explant
1
0.75
0.5
0.25
0
n=46
n=68
n=38
Genotype :
+/+
+/-
-/-

Fig 4



(A refaire pour un plus joli blot)

b Turning Assay

Fig 5

PUBLICATION 2 : Netrin-1 is a survival factor during commissural axon navigation.

DCC est un récepteur qui fut initialement décrit comme un potentiel gène suppresseur de tumeur, en particulier parce qu'il se trouve invalidé dans 70 % des cancers colorectaux. Toutefois, il n'y eut aucune preuve définitive en faveur de cette hypothèse. Par la suite, notamment grâce à l'étude phénotypique de souris invalidées pour *nétrine-1* ou *DCC* qui mit en évidence la désorganisation des mêmes faisceaux d'axones dans les deux modèles, DCC fut décrit comme le récepteur majeur du facteur de guidage axonal Nétrine-1.

Cependant, le lien entre gène suppresseur de tumeur et récepteur à un facteur de guidage pouvait être surprenant. En ce sens, Mehlen et *coll.* ont démontré que DCC est un récepteur à dépendance. En absence de Nétrine-1, DCC participe à une voie de signalisation pro-apoptotique qui se trouve *a contrario* bloquée en présence de Nétrine-1. Dans ces conditions, une cellule qui exprime DCC est dépendante de la présence de Nétrine-1 pour sa survie. Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle l'apoptose médiée par le récepteur DCC en absence de Nétrine-1 pourrait avoir une fonction au cours du développement du SNC. Plus précisément, nous proposons que la Nétrine-1 serait un facteur de survie neuronale.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi de travailler sur le modèle des neurones commissuraux spinaux. En effet, ces neurones expriment DCC et projettent leur axone en réponse à la Nétrine-1. Dans un premier temps, nous avons réalisé des cultures primaires de neurones commissuraux d'embryons de rat ou de souris, puis nous avons analysé la mort cellulaire par TUNEL (Terminal transferase dUTP Nick End Labeling), ou par immunocytofluorescence en détectant la caspase-3 active. Dans des conditions où ces neurones sont cultivés sans sérum, ils meurent tous par apoptose. En revanche, l'ajout de Nétrine-1 ou d'un inhibiteur général des caspases sauve 50% des neurones. Ces données suggèrent donc que la Nétrine-1 est un facteur de survie pour les neurones commissuraux.

Afin de tester si la Nétrine-1 se comporte comme un facteur neurotrophique classique (*ie via* l'activation d'une voie de survie), ou si elle inhibe la signalisation pro-apoptotique de DCC, nous avons réalisé la même expérience sur une culture de neurones commissuraux provenant d'embryons invalidés pour *DCC*. Dans ces conditions, si la Nétrine-1 se comporte comme un facteur neurotrophique, ces neurones commissuraux

devraient mourir en absence ou en présence de Nétrine-1, comme les neurones commissuraux issus d'un embryon sauvage en absence de Nétrine-1, car il n'y aurait plus de transmission du signal de survie. En revanche, si la Nétrine-1 inhibe la signalisation pro-apoptotique de DCC, les neurones commissuraux *DCC*$^{-/-}$ devraient être sauvés comme les neurones commissuraux sauvages en présence de Nétrine-1. En fait, nos résultats montrent qu'en absence de Nétrine-1, les neurones commissuraux sauvages meurent, tandis que les neurones commissuraux *DCC*$^{-/-}$ survivent. De plus, l'ajout de Nétrine-1 sur les neurones commissuraux *DCC*$^{-/-}$ n'augmente pas leur taux de survie.

Ces résultats suggèrent donc que la Nétrine-1 est un facteur de survie pour les neurones commissuraux *in vitro*. En outre, ils démontrent que la Nétrine-1 ne se comporte pas comme un facteur neurotrophique classique, mais plutôt comme un inhibiteur de la signalisation pro-apoptotique de DCC.

Nous avons ensuite testé notre hypothèse *in vivo*. En ce sens, nous avons réalisé des tests caspase-3 sur des lysats de moelle épinière ou de cerveaux embryonnaires issus d'embryons invalidés pour la *nétrine-1*. Que ce soit à E11.5 ou E13.5, l'activité caspase-3 est augmentée dans la moelle épinière de souris *nétrine-1*$^{-/-}$ par rapport aux embryons sauvages. En revanche, ce n'est pas le cas dans les cerveaux embryonnaires des mutants. Il est possible que nous n'ayons pas regardé dans la bonne fenêtre de développement pour le cerveau. De plus chez les embryons *nétrine-1*$^{-/-}$ à E13.5, cette augmentation d'activité caspase-3 est associée à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans le tube neural, notamment dans la région des neurones commissuraux.

Ces données suggèrent donc qu'à E11.5 et E13.5, la Nétrine-1 est un facteur de survie pour les neurones de la moelle épinière, en particulier pour les neurones commissuraux.

Par ailleurs, nous avons aussi testé notre hypothèse sur le tube neural embryonnaire de poulet. Pour cela, nous avons réalisé des électroporations *in ovo*. Dans un premier temps, nous avons surexprimé DCC, DCC-D1290N: le mutant de clivage de DCC dont la signalisation pro-apoptotique est abolie, et enfin nous avons coexprimé DCC et la Nétrine-1. La surexpression de DCC est à l'origine d'une augmentation du nombre de cellules apoptotiques, ce qu'on n'observe pas avec le mutant de clivage ou après la co-électroporation DCC/Nétrine-1. En outre, l'électroporation de DCC a pour effet un plus grand nombre de cellules apoptotiques dans la région dorsale. Cette observation est en

accord avec le fait que la Nétrine-1 est principalement présente dans la région ventrale où elle peut inhiber la mort induite par l'expression ectopique de DCC. *A contrario*, elle ne peut pas l'inhiber en région dorsale dont elle est absente. Ces données suggèrent donc que DCC est capable d'induire la mort dans le tube neural embryonnaire de poulet. En outre, nous avons réalisé une expérience de knock-down de la Nétrine-1 dans le tube neural embryonnaire de poulet. Pour cela, nous avons développé une technique d'électroporation afin de cibler la plaque du plancher avec un vecteur codant un shRNA dirigé contre la *nétrine-1*. Ce knock-down est à l'origine d'une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans la région dorsale soutenant que la Nétrine-1 est un facteur neurotrophique qui bloque l'activité pro-apoptotique de DCC dans ce modèle.

Cette étude démontre donc pour la première fois que le guidage des axones commissuraux requiert à la fois l'activité chimioattractive de la Nétrine-1, mais aussi son activité de facteur de survie neuronale *via* l'inhibition de la signalisation pro-apoptotique de DCC.

Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation

Céline Furne*†, Nicolas Rama*†, Véronique Corset†, Alain Chédotal‡§, and Patrick Mehlen†¶

†Apoptosis, Cancer, and Development Laboratory, Equipe labellisée ''La Ligue,'' Centre Léon Berard and Unité Mixte de Recherche 5238, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Lyon, 69008 Lyon, France; ‡Unité Mixte de Recherche S592, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut de la Vision, Université Pierre et Marie Curie, 17 rue Moreau, 75012 Paris, France; and §Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpétrière, Fédération de Neurologie, Paris, F-75013 France

Edited by N. M. Le Douarin, Collège de France, Paris, France, and approved June 26, 2008 (received for review April 15, 2008)

DCC (Deleted in Colorectal Cancer) is a putative tumor suppressor whose expression is lost in numerous cancers and whose tumor suppressor activity appears to be dependent on its ability to trigger apoptosis when disengaged by its ligand netrin-1. In this sense, netrin-1 is a survival factor that controls tumorigenesis. However, netrin-1 is also the prototypical axon guidance cue and has been shown to orient many neurons or axons, especially commissural axons, during spinal cord development. Here we show that netrin-1 is not only an attractive cue for developing commissural axons but also promotes their survival. In primary neuronal culture, in mice or in chick embryos, netrin-1 inhibits the proapoptotic activity of DCC in developing commissural neurons. Thus, adequate commissural neurons navigation requires both the attractive activity of netrin-1 and the anti-apoptotic function of this cue.

apoptosis | deleted in colorectal cancer | nervous system development | dependence receptor | axon guidance

The development of colonic carcinoma from normal colonic epithelium is associated with the mutation of a specific set of genes (1). Allelic deletions [loss of heterozygosity (LOH)] on chromosome 18q in 70% of primary colorectal tumors prompted the search for a tumor suppressor gene at that locus, leading to the cloning of a putative cell-surface receptor, DCC (Deleted in Colorectal Cancer) (2). DCC expression was then shown to be markedly reduced in 50% of colorectal tumors. Moreover, the loss of DCC expression is not restricted to colon carcinoma, but has been observed in many other tumors, suggesting that DCC is a tumor suppressor (3).

However, DCC is also the main component of a receptor complex that mediates the activity of the secreted axon-guidance molecule netrin-1 (4, 5). The key role of DCC and netrin-1 in mediating growth cone extension is supported by a large number of studies, such as the analysis of DCC and netrin-1 knock-out mice, which display the disorganization of many axonal tracts in the central nervous system (6).

The link between a tumor suppressor in colorectal cancer and a receptor mediating axon outgrowth and turning remained unclear until recently. We proposed that the tumor suppressor function could be explained by the fact that DCC is a dependence receptor (7). DCC is functionally related to other dependence receptors such as $p75^{NTR}$, the common neurotrophin receptor, RET, Patched, UNC5H, neogenin, ALK, or TrkC (8–13). Such receptors create cellular states of dependence to their respective ligands by inducing apoptosis when unoccupied but inhibiting apoptosis in the presence of their ligands (12). We and others have shown that the *in vitro* expression of DCC induces apoptosis in the absence of netrin-1 (7, 14), while the presence of netrin-1 blocks this proapoptotic activity (15).

The fact that DCC displays such proapoptotic activity when unbound to its ligand has led to the hypothesis that DCC normally functions to kill tumor cells that grow in an inappropriate context (e.g., local growth in a setting of constant and limited netrin-1 concentration or growth at a secondary site where there is no netrin-1 expression). Accordingly, mice over-expressing netrin-1 in the gut show a marked decrease of cell death in the intestinal epithelium associated with an increased predisposition to develop colorectal tumors (16). Thus, DCC may be viewed as a tumor suppressor that controls tumorigenesis by regulating apoptosis (17, 18) and netrin-1 expression as a selective survival advantage for tumor growth and metastasis (19).

However, it is clear that the main role of netrin-1 in the developing CNS is not survival but axon guidance. The main defects of netrin-1 and DCC knock-out mice may, to a large extent, be attributed to a loss of the DCC/netrin-1 axon-guidance system. Yet, netrin-1 knock-out mice also display increased cell death in the developing brainstem (20). Thus, one may wonder whether netrin-1 in the developing nervous system also shows a survival activity that may participate to the neuronal navigation activity of this cue. Here we addressed this question in commissural neurons that are the prototype neurons guided by the netrin-1/DCC pair. We show that in primary cultures, commissural neurons die except if netrin-1 is provided and that apoptotic activity depends on DCC, as primary commissural neurons from DCC knock-out embryos survive in the absence of netrin-1. We also show enhanced apoptosis in developing mouse spinal cord from netrin-1 knock-out embryos. Moreover, we show that in developing chick neural tube, the DCC/netrin-1 pair acts as a pair dependence receptor/ligand as electroporation of DCC triggers cell death that is blocked by coelectroporation of netrin-1 while down-regulation of netrin-1 is associated with increased cell death.

Results

Netrin-1 Acts as a Survival Factor for Commissural Neurons. In the dorsal spinal cord, commissural axons that express DCC are attracted toward the ventral midline by floor-plate-derived netrin-1. To assess whether netrin-1 may also display survival activity toward these neurons, we cultured commissural neurons from E13 rat or E11.5 mouse embryos. Dorsal spinal cords were dissected out and dissociated and primary cells were then grown in neurobasal medium (Fig. 1*A*). The cells grown in these conditions were commissural neurons as they expressed the neuronal marker class III β-tubulin and DCC as shown by immunohistochemistry [Fig. 1*B*, specificity of the DCC antibody shown in supporting information (SI) Fig. S1]. When the rat commissural neuron cultures were analyzed 16 h after initial plating, about all of the cells were dead (data not shown and Fig.

Author contributions: C.F., N.R., and P.M. designed the research; C.F., N.R., and V.C. performed the research; A.C. contributed new reagents/analytic tools; C.F., N.R., V.C., A.C., and P.M. analyzed the data; and P.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

*C.F. and N.R. contributed equally to this work.

¶To whom correspondence should be addressed. E-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0803645105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

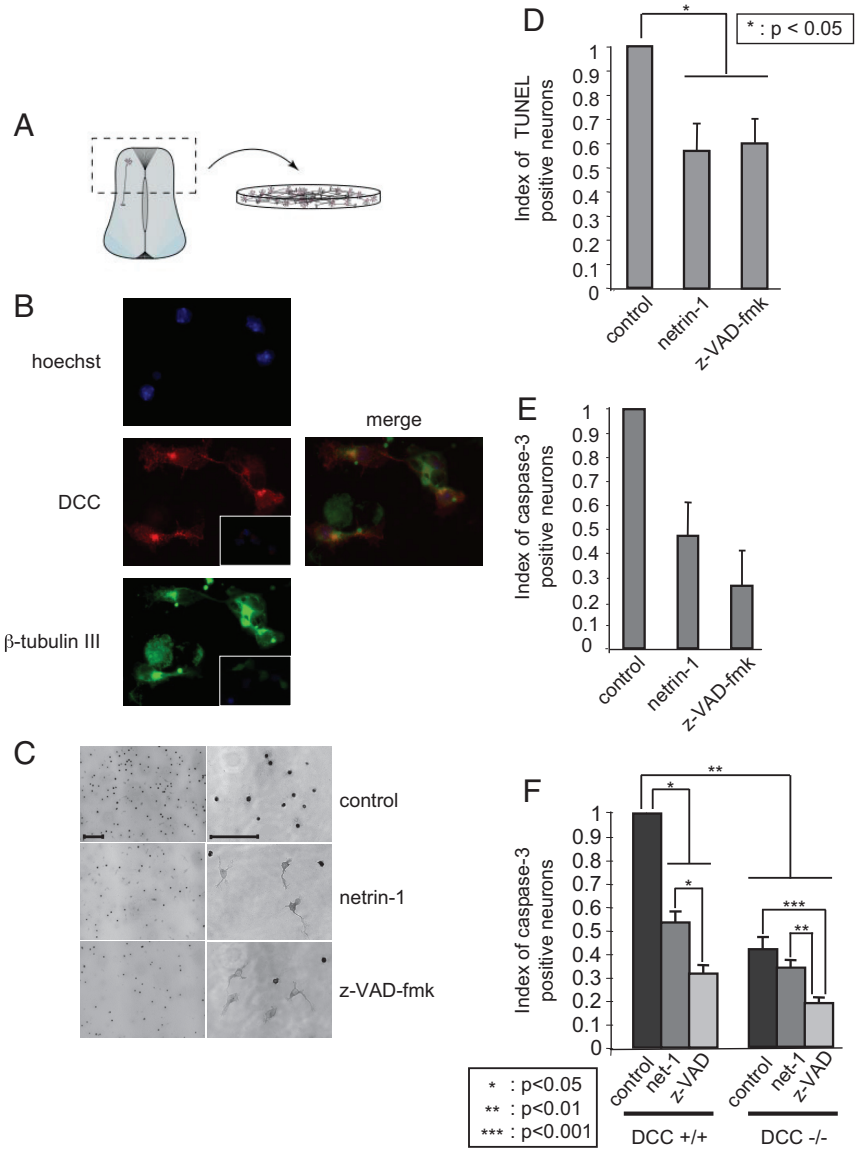


Fig. 1. Netrin-1 is a survival factor for commissural neurons. (*A*) The dorsal spinal cord that contains the commissural neurons is represented. (*B*) The cultured cells are commissural neurons. Immunostainings using an anti-DCC antibody (A20) (central panel) and an anti-beta-tubulin III antibody (below panel) of commissural neurons from E13 rat embryos dorsal spinal cord culture. Merge signal between DCC and beta-tubulin signals is shown (*Right*) together with a hoechst. *Insets*, control staining without primary antibodies. (*C*) Representative photographs of commissural neurons cultured 16 h in the absence (control) or in the presence of netrin-1 (300 ng/ml) or of z-VAD-fmk (20 μM) and stained by TUNEL assay. Right panels are a magnification of left panels. (Scale bars, 50 μM.) (*D* and *E*) Histograms representing cell death quantified by numbering cells stained with TUNEL assay (*D*) or with anti-active caspase-3 (*E*). Index of cell stained with TUNEL or active caspase-3 is shown as the ratio between the number of cells stained in treated conditions (netrin-1 or z-VAD-fmk) to the number of cell stained in control condition. Standard deviations are indicated ($n = 3$). (*F*) Commissural neurons from E11.5 mice embryos were cultured 16 h in the presence or absence of netrin-1 (300 ng/ml) or z-VAD-fmk (20 μM). Cultures were from DCC+/+ or DCC-/- embryos as indicated. Histogram representing cell death measured by the number of cells stained with anti-active caspase-3. Index of cell stained with active caspase-3 is shown as the ratio between the number of cells stained in treated conditions (netrin-1 or z-VAD-fmk) to the number of cell stained in control condition. Standard deviations are indicated ($n = 3$). *, **, and ***, respectively, indicates a $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, calculated using a two-sided Mann–Whitney test.

1*C*). To confirm this observation, apoptosis was measured by counting TUNEL positive cells or by quantification of caspase activity. As shown in Fig. 1 *C–E*, commissural neurons grown in neurobasal medium died by apoptosis within the first 16 h. Interestingly, when the culture was performed in the presence of z-VAD-fmk, a general caspase and cell death inhibitor, 50% of the neurons survive after 16 h of culture and this effect was associated with a marked decrease in TUNEL- (Fig. 1 *C* and *D*) and active caspase-3 (Fig. 1*E*) -positive neurons. Netrin-1 was then added, instead of z-VAD-fmk, to the cultures and as shown in Fig. 1 *C–E*, netrin-1 presence increased cell survival and was associated with decreased number of TUNEL- and active caspase-3-positive cells to a similar extent than z-VAD-fmk (Fig. 1 *C* and *E*). Similar results were observed when mice commissural neurons instead of rat were cultured (data not shown and Fig. 1*F*). Thus, netrin-1 similarly to z-VAD-fmk enhances survival of commissural neurons.

Netrin-1 Acts as a Survival Factor by Inhibiting DCC Proapoptotic Activity. In tumor cells, netrin-1 has been shown to act as a survival factor inhibiting the proapoptotic activity of DCC or UNC5H receptors (7, 16, 19–21). To determine whether this

involves a neurotrophic factor-like effect of netrin-1 (i.e., activation upon ligand binding of survival signaling pathways like PI3K or MAPK pathways) or occurs through the inhibition of DCC proapoptotic activity, we then compared commissural neuron survival in primary cultures from DCC mice mutant embryos. If netrin-1 behaved as a classic neurotrophic factor, one should expect the loss of DCC to be associated with a similar effect on survival instead of a loss of the ligand (i.e., the DCC-/- commissural neurons should die even in the presence of netrin-1 at a same level than DCC+/+ commissural neurons cultured in the absence of netrin-1). Alternatively, if netrin-1 were to act by inhibiting DCC-induced apoptosis, the survival of DCC-/- neurons should be higher than DCC+/+ ones in the absence of netrin-1. As shown in Fig. 1*F*, in the absence of netrin-1 treatment, commissural neurons from DCC+/+ embryos died and showed caspase activation, whereas DCC-/- commissural neurons showed increased survival and decreased caspase activation. Moreover, adding netrin-1 to DCC+/+ culture increased neuronal survival, while it failed to increase the survival of DCC-/- neurons. Taken together, these data demonstrate that netrin-1 is a survival factor that inhibits the proapoptotic activity of the DCC dependence receptor in spinal cord commissural neurons.

Netrin-1 Controls Cell Survival in the Developing Neural Tube. The phenotypic analysis of netrin-1 knockout mice revealed profound defects in the organization of many axonal tracts, but no increase in cell death was noted (5). Yet, because the numeration of commissural neurons is not easy and was not done precisely, and because these mutants were hypomorphic mice rather than null mice, we then decided to assess whether netrin-1 inactivation is associated with increased cell death in the developing spinal cord. An increased caspase-3 activity was observed in spinal cord extracts from netrin-1-/- embryos compared with wild-type extracts (Fig. 2*A*). Interestingly, this increased caspase-3 activity is specific for the spinal cord as when a similar caspase activity measurement was performed in brain rather than spinal cord, no similar increase of caspase activity was observed in netrin-1 mutant mice. Moreover, this increased caspase activity is associated with an increased number of apoptotic (i.e., TUNEL-positive cells) in the spinal cord of E13.5 of netrin-1 mutant embryos (Fig. 2 *B* and *C*). These TUNEL-positive cells moreover colocalize with DCC staining (Fig. 2*D*), further supporting the view of commissural neurons death. Thus, netrin-1 appears to inhibit apoptotic cell death in the developing spinal cord and more specifically in commissural neurons.

We then investigated whether the survival activity of netrin-1 could also be observed in developing chick neural tube. As a first approach, we analyzed whether forced expression of DCC in the developing chick neural tube triggered cell death as previously found for other dependence receptors (10, 11). HH10–11 embryos were electroporated in one side of the neural tube with DCC and GFP. As shown on Fig. 3 *A–C*, DCC electroporation was associated on the electroporated side with cell death induction as measured by TUNEL staining. This was not related to a toxic effect of the electroporation since an empty vector or a mutated DCC (DCC D1290N) unable to induce apoptosis *in vitro* (7) failed to trigger cell death *in ovo* (Fig. 3 *A–C*). Interestingly, this cell death induction appears to be mainly detected in the dorsal third of the neural tube (as opposed to the ventral two third of the neural tube) (Fig. 3*D*), thus supporting the view that (*i*) commissural neurons may be the target of DCC-induced apoptosis and/or (*ii*) that ectopic DCC expression is more effective in killing cells in the dorsal neural tube because endogenous netrin-1 is produced ventrally and may somehow inhibit DCC-induced apoptosis ventrally. Netrin-1 was then coelectroporated with DCC. The ectopic expression of netrin-1 fully inhibited the proapoptotic activity of DCC on the electroporated side (Fig. 3*A–C*), thereby suggesting that the netrin/DCC ligand/dependence receptor couple is active during chick neural tube development.

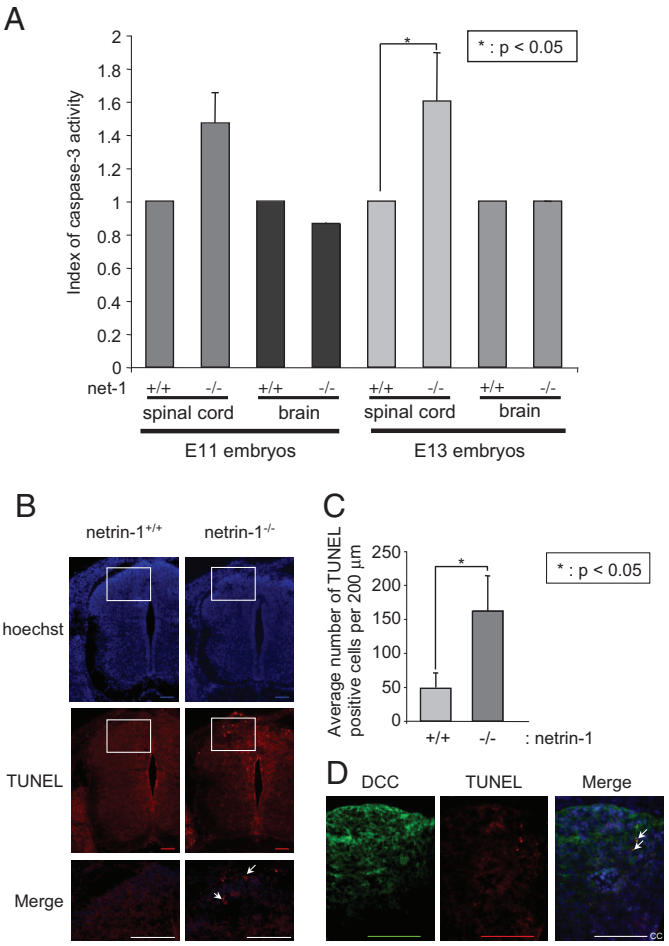


Fig. 2. Netrin-1 as a survival factor in the developing mice spinal cord. (*A*) Spinal cord (or brain) from netrin1 +/+, netrin-1 -/- E11 or E13 embryos was dissected out and analyzed for global caspase-3 activity as described in the methods section. Standard deviation is indicated ($n = 3$). (*B* and *C*) TUNEL was performed on spinal cord of E13.5 netrin-1 -/- or +/- embryos. (*B*) representative TUNEL staining. Merge: enlargement of the colocalization signal located in the frame. (*C*) Quantification of the number of TUNEL-positive cells. (*D*) TUNEL + DCC immunostaining and the respective merge signal. CC, central canal. (Scale bars, 100 μM) In *A* and *C* error bars indicate SEM; * indicates a $P < 0.05$ calculated using a two-sided Mann–Whitney. In *B* and *D* arrows indicate apoptotic cells.

We further analyzed whether down-regulation of endogenous netrin-1 produced by the ventral neural tube by a shRNA approach was associated to a DCC-dependent cell death. Netrin-1 shRNA effectively down-regulates chick netrin-1 (Fig. 4*A* and Fig. S2). We then electroporated netrin-1 shRNA at the level of the ventral neural tube and apoptosis was assessed by TUNEL staining (Fig. 4*B*). Electroporation of a netrin-1 shRNA but not a scramble shRNA was associated with enhanced neural tube cell death measured by TUNEL staining (Fig. 4 *C* and *D*) or active caspase-3 staining (Fig. S3). As expected, cell death induction was mainly observed in the dorsal third of the neural tube (Fig. 4*D*), demonstrating that netrin-1 is a survival factor that blocks DCC proapoptotic activity in chick neural tube.

Discussion

We show here that beside its well known function as a guidance cue, netrin-1 also acts a survival factor during nervous system

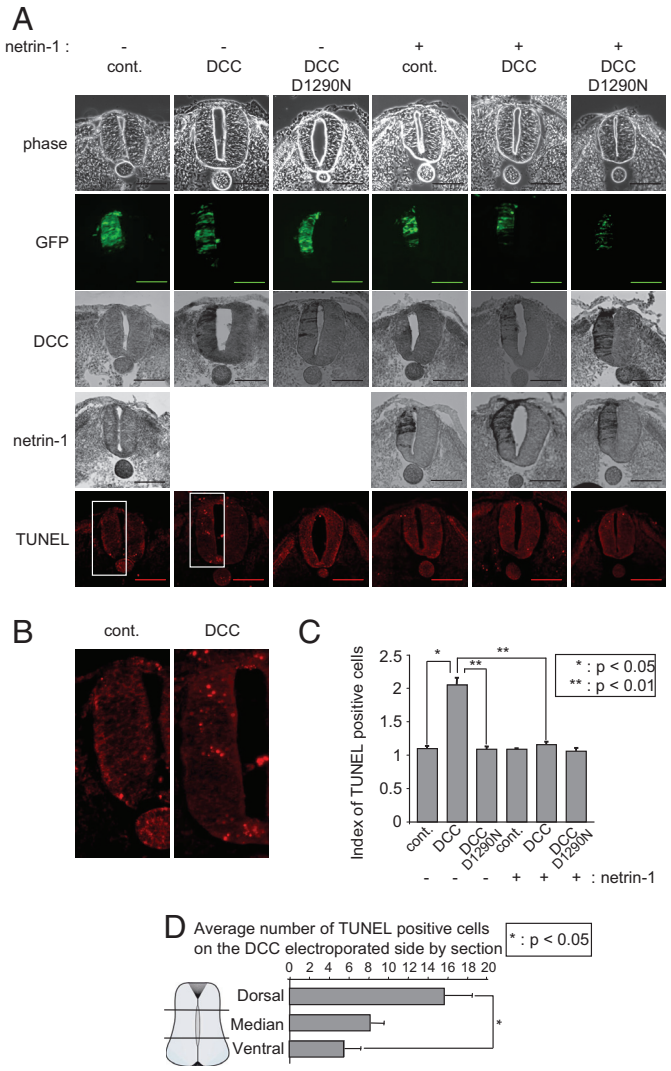


Fig. 3. DCC behaves as a dependence receptor in the developing chick neural tube. HH10–11 chick embryos were electroporated at the level of the dorsal neural tube with a mock plasmid (cont.), DCC construct (DCC), DCC D1290N mutant construct (DCC D1290N), or DCC and netrin-1 constructs (DCC+netrin-1) together with a GFP-encoding plasmid. (*A*) Representative phase, GFP, DCC (immunostaining with A20 antibody), netrin-1 (immunostaining with anti-c-myc, netrin-1 being c-myc-tagged), and TUNEL staining is shown. (Scale bars, 50 μM) (*B*) Enlargement of TUNEL staining of control vs. DCC electroporation. (*C*) Quantification of TUNEL immunostaining. Three to six embryos were analyzed for each condition. (*D*) Quantification of TUNEL immunostaining in the neural tube (Dorsal, Medium, and Ventral). In *C* and *D*, error bars indicate SEM; * indicates a $P < 0.05$ and ** indicates a $P < 0.01$ calculated using a two-sided Mann–Whitney test.

development. Interestingly netrin-1 controls survival not like classic neurotrophic factors such as neurotrophins. Neurotrophic factors are usually believed to work by activation of survival signaling pathways within the cell including for example PI3K- or MAPK-dependent pathways (22). These positive signals enhance cell survival and the withdrawal of the neurotrophic factor *in vitro* or the lack/limitation of this factor *in vivo* is speculated to block these survival signals and consequently to trigger a death by default. In the case of netrin-1, the survival activity may not be based on activation of downstream survival signaling pathways (e.g., dependent on DCC) but on the inhibition of the proapoptotic activity of the DCC dependence receptor. It is then intriguing to note that NT-3, a classic neurotrophin, has been shown to behave like netrin-1 at least so far in primary culture, because TrkC was recently identified as a dependence receptor and as such directly implicated in the death of dorsal root ganglion neurons observed upon loss of NT-3 (13). Consequently, survival factors could probably be divided into two categories depending on their ability to generate a cell survival dependent state by activating survival pathways or on the opposite by inhibiting proapoptotic pathways.

While there is no doubt that netrin-1 serves as an attractive guidance cue for commissural neurons, we demonstrate here that netrin-1 also acts as a survival factor for these neurons. Such a dual of role for netrin-1 (axon guidance cue and survival factor) may collaborate to adequately attract axons or neurons. Indeed, the survival activity of netrin-1 may then be viewed as a mechanism to avoid wiring errors. It may be tempting to speculate that this survival activity is a mechanism that allows the elimination of commissural neurons that would have extended axons out of the guidance path. Neurons that would extend in regions devoid of netrin-1 would then have unbound DCC and consequently undergo apoptosis. Even though our present study supports a "yes" or "no" situation in which no netrin-1 means "commissural neuron death" and netrin-1 presence means "commissural neuron survival," it can also be speculated that this regulatory mechanism may be local. Indeed, in regions of local netrin-1 absence, the axon or the growth cone would die in a mechanism that could morphologically resembles to a collapse but would mechanistically imply "local death" that includes DCC dependent caspase activation. Along this line, importance of caspase in axon turning has previously been reported (23) and our preliminary results suggest that addition of the general caspase inhibitor z-VAD-fmk in chick neural tube is associated with defects in commissural axon pathfinding that include aberrant projections (N. Rama, personal communication).

One would argue back that in such hypothesis, DCC mutant mice should not phenocopy commissural defects observed in netrin-1 mutant mice. However, while DCC inactivation should indeed be associated with more survival of commissural neurons, it is also associated with the loss of the "positive" function of DCC that mediates most of the guidance effect of netrin-1; such loss probably primes other accessory functions of netrin-1. Along this line, it is of interest to note that while the caspase cleavage site of DCC is required for DCC proapoptotic activity and is conserved in all mammalian species, it cannot be found in UNC40 of *C. Elegans* or Frazzled of *D. melanogaster*. Thus, it is tempting to speculate that the survival activity of such an important and conserved guidance cue among species has been acquired in complex organisms and is consequently a relatively late event in the evolution of these proteins. This may make sense given the greater plasticity of the mammalian and avian nervous systems, compared with those of the relatively simple hard-wired invertebrates.

Materials and Methods

Animals and Genotyping. Pregnant OFA rat females were purchased from Charles River Laboratory. Netrin-1 and DCC mutant mice were described in ref. 24. Genotyping of DCC embryos was performed by PCR using 5′-GGCCATTGAGGTTCCTTT-3′, 5′-AAGACGACCACACGCGA GDCC-3′ and 5′-TCCTCGTGCTTTACGGTATC-3′ primers. Genotyping of netrin-1 embryos was realized by RT-PCR with 5′-TGACTGTAGGCACAACACGG-3′, 5′-GGCATTACCCAACAGCAAGT-3′ and 5′-GCCTCCCATCTCAACTCT-3′ primers.

Primary Cultures of Spinal Cord Commissural Neurons. Commissural neurons were obtained from embryonic day 13 (E13) rat embryos or E11.5 mice embryos by dissecting out the dorsal spinal cord. The tissues were then dissociated by using 5 mg/ml trypsin and 0.1 mg/ml DNase I (Sigma) in Hanks' balanced salt solution (HBSS) without calcium or magnesium (Invitrogen). The dissociated cells that were obtained were plated on poly(L-lysine)-precoated coverslips at 0.5×10^5 cells per well on a 24-well plate. Commissural neurons were then cultured for 16 h in neurobasal medium containing B27 supple-

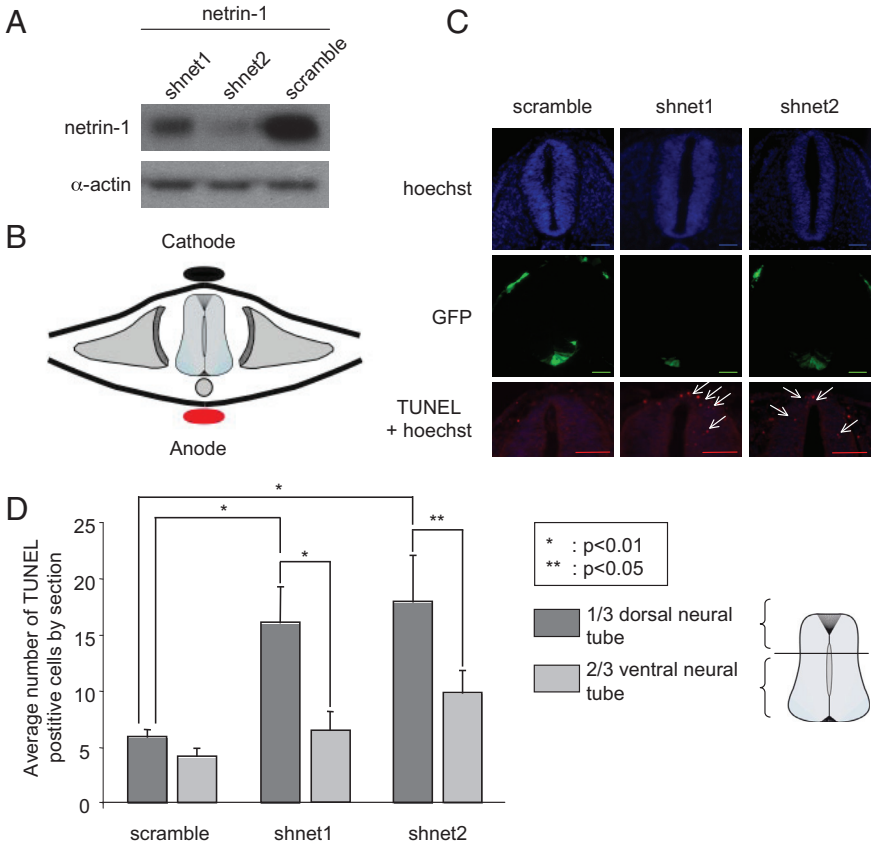


Fig. 4. Netrin-1 is a survival factor in the developing chick neural tube. (*A*) Effect of netrin-1 shRNA on chick netrin-1. HEK293-EBNA cell producing chick netrin-1 were transfected with netrin-1 shRNA and netrin-1 level was assessed by immunoblot. Actin is shown as loading control. (*B–D*) HH10–11 chick embryos were electroporated at the level of the ventral neural tube with a scramble shRNA plasmid (Scramble), or with a netrin-1 shRNA together with a GFP encoding plasmid. (*B*) Scheme representing the electroporation procedure. (*C*) Representative hoechst (*Upper*), GFP (*Middle*), and TUNEL (*Lower*) staining is shown. Arrows indicate the apoptotic cells located in the dorsal neural tube. (Scale bars, 50 μM) (*D*) Quantification of TUNEL immunostaining in the 1/3 dorsal versus 2/3 ventral neural tube. Five to eight embryos were analyzed for each condition. Error bars, SEM; * indicates a $P < 0.05$ and ** indicates a $P < 0.01$ calculated using a two-sided Mann–Whitney test.

ment. In some experiments, cells were treated with z-VAD-fmk (Biomol International; 20 μM).

Netrin-1 Protein and Plasmid Constructs. Netrin-1, which is from Apotech (Axora) is a human Flag-tagged netrin-1 produced from CHO cells. For the *in ovo* chick electroporation, constructs were cloned in pCAGGS, which was also used as empty vector. Empty pCAGGS was a kind gift from R. Sadoul (25). pCAGGS-GFP has been obtained by cloning GFP into the EcoRI site of pCAGGS. pCAGGS-DCC and pCAGGS-DCC-D1290N have been respectively constructed by subcloning *Eco*RI-*Bgl*II fragments from pcDNA3-DCC and pcDNA3-DCC-D1290N into the corresponding sites of pCAGGS. pCAGGS-netrin-1 has been constructed by subcloning an *Xho*I-*Eco*RI fragment from pGNET1-myc into pCAGGS. Netrin-1 shRNA was generated using PSilencer^{TM}1.0-U6siRNA Expression vector (Ambion) and the sh sequences sh1: G GCG CTG CCG CTT CAA CAT and sh2 : G GGT GCC CTT CCA GTT CTA. The Scramble sh sequence was: G TGG CCC CGA AGC CTT TAC.

Chick Electroporation. Fertilized chicken eggs were obtained from a local supplier (Morizeau. EARL, Danger, France) and incubated at 38°C. Neural tube electroporation and cell death assay were perfomed as previously described (11). The various pCAGGS plasmids (1 μg/μl) were introduced into stage HH10–11chick embryos by *in ovo* electroporation using CUY-21 electroporator and CUY-610 standard electrode (NEPA gene) as previously done (11). We routinely carried out electroporation with 3 pulses of 50-ms duration at 20 V. Green fluorescent protein (GFP) expression vector (0.5 μg/μl pCAGGS-GFP) was coelectroporated to check the electroporation efficiency. Chick embryos were collected 24 h after electroporation. Loss of function of netrin-1 was induced by *in ovo* shRNA at stage HH10–11 chick embryos. Embryos were injected with a solution containing shRNA plasmid (2.5 μg/μl) mixed with GFP expression vector (0.5 μg/μl). Then embryos were electroporated with specifically designed electrodes. These electrodes allowed us to fit the anode under the embryo and to lay the cathode on the embryo with 3-mm spacing. We carried out electroporation with 4 pulses of 50-ms duration at 20 V. The embryos were collected 24 h after electroporation.

Cell Death Assays. Apoptosis was monitored by measuring caspase activation either by counting cells stained with anti-active caspase-3 or with TUNEL technique, or by measuring caspase activity in cell lysate as described before (13, 26). Briefly, immunostaining with anti-active caspase-3 was performed on cells fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min, and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 30 min. The endogenous peroxidase activity was inhibited by preincubation in 5% H_2O_2 in PBS for 30 min. First antibody incubation was performed by using anti-active caspase-3 antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) followed by biotin-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). The peroxidase activity was then provided by a biotin/avidin/peroxidase complex (ABC kit, Vector Laboratories), and staining was performed using 3,3′-diaminobenzidine chromogen. The percentage of caspase-3-stained cells was calculated by comparing the number of active caspase-3-stained cells with the total number of cells present on a given surface. An index is presented as the ratio between the percentage of stained cells in the treated population and the percentage obtained in the non-treated population. Caspase-3 activity was also measured by using the Caspase-3 Fluorometric Assay Kit from Gentaur. This assay utilizes the DEVD-AFC substrate. The activity was determined according to the manufacturer's instructions, and caspase activation is presented as the ratio between the caspase activity of the spinal cords of mutant embryos and that measured in spinal cords of wild-type mice. Apoptosis was also analyzed by counting cells stained by the TUNEL technique according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). Fixation, permeabilization, and staining were performed as for caspase-3 staining except that the antibody reaction

was replaced by cell incubation for 1 h at 37°C with terminal deoxynucleotidyltransferase and biotin-dUTP. For Figs. 2, 3, and 4, TUNEL on sections was performed as above except that it was revealed with streptavidine coupled Cy-3 (Jackson ImmunoResearch).

Cell Death Quantification. For the mouse spinal cord, serial section 20-μm sections were performed and TUNEL-positive cells located in the spinal cord were counted blinded on 200 μm. For the electroporation of DCC and the coelectroporation of DCC+netrin-1, the index corresponds to the number of TUNEL-positive cells on the electroporated side versus the non-electroporated side. For the DCC electroporation experiment, on each slice the spinal cord was divided into three parts: dorsal, median, and ventral via the use of computer analysis (Axovision software, Zeiss). The number of TUNEL-positive cells was counted blinded and an average calculated for each part. For the electroporation of shRNA, chick spinal cord was divided in two parts: 1/3 dorsal and 2/3 ventral using the Axovision software. On each section, the number of TUNEL-positive cells was counted blinded on each part and an average was calculated. In each case, the counting was done in blind by two independent experimenters.

Immunohistolocalisation. DCC and β-tubulin III immunostaining was realized on mouse commissural neurons fixed and permeabilized as described. Anti-DCC antibody (DCC-A20) (Santa Cruz) and anti-β-tubulin III (Tuj-1) (AbCam) were detected with Alexa488-Donkey anti-goat antibody (Invitrogen) and cyanin 3 donkey anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch), respectively. The coverslips were mounted in fluoromount (EMS) and sections photographed with a Zeiss Axiovert 200 microscope. To perform DCC immunostainings on mouse spinal cord, sections were fixed and permeabilized as described above for TUNEL assay. Anti-DCC antibody (DCC-A20; Santa Cruz) was detected with Alexa488-Donkey anti-Goat (Invitrogen). Sections were treated with Hoechst (Sigma) and were mounted as described above. DCC and netrin-1 immunostaining on chick spinal cords was performed with anti-DCC antibody (DCC-A20; Santa Cruz) and anti-c-myc antibody (Sigma), respectively, which were detected with biotinylated-Donkey anti-Goat (Jackson ImmunoResearch) and biotinated-Donkey-anti-mouse (Jackson ImmunoResearch), respectively. The peroxidase activity was revealed as described.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank C.Guix for her excellent technical help, H. Bilak for text correction, and L. Pays for helpful discussion. This work was supported by institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique and by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer, the National Institute of Health (NIH) and the ANR. CF was supported by a doctoral fellowship from the ARC.

1. Fearon ER, Vogelstein B (1990) *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell* 61:759–767.
2. Fearon ER, *et al.* (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49–56.
3. Mehlen P, Fearon (2004) ER Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 22:3420–3428.
4. Keino-Masu K, *et al.* (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87:175–185.
5. Serafini T, *et al.* (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001–1014.
6. Fazeli A, *et al.* (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386:796–804.
7. 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* 395:801–804.
8. Rabizadeh S, *et al.* (1993) Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261:345–348.
9. Bordeaux MC, *et al.* (2000) The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J* 19:4056–4063.
10. Thibert C, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM, Mehlen P (2003) Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* 301:843–846.
11. Matsunaga E, *et al.* (2004) RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat Cell Biol* 6:749–755.
12. Mehlen P, Thibert C (2004) *Dependence receptors: between life and death. Cell Mol Life Sci* 61:1854–1866.
13. Tauszig-Delamasure S, *et al.* (2007) The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13361–13366.
14. Chen YQ, *et al.* (1999) Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 18:2747–2754.
15. Shin SK, *et al.* (2007) Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology* 133:1849–1857.
16. Mazelin L, *et al.* (2004) Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431:80–84.
17. Mehlen P, Llambi F (2005) Role of netrin-1 and netrin-1 dependence receptors in colorectal cancers. *Br J Cancer* 93:1–6.
18. Grady WM (2007) Making the case for DCC and UNC5C as tumor-suppressor genes in the colon. *Gastroenterology* 133:2045–2049.
19. Fitamant J, *et al.* (2008) Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4850–4855.
20. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J* 20:2715–2722.
21. Bernet A, *et al.* (2007) Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* 133:1840–1848.
22. Yao R, Cooper GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267:2003–2006.
23. Campbell DS, Holt CE (2003) Apoptotic Pathway and MAPKs Differentially Regulate Chemotropic Responses of Retinal Growth Cones. *Neuron* 37:939–952.
24. Forcet C, *et al.* (2002) Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* 417:443–447.
25. Mahul-Mellier AL, Hemming FJ, Blot B, Fraboulet S, Sadoul R (2006) Alix, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death *in vivo*. *J Neurosci* 26:542–549.
26. Furne C, Corset V, Herincs Z, Cahuzac N, Hueber AO, Mehlen P (2006) The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4128–4133.

Supporting Information

Furne *et al*. 10.1073/pnas.0803645105

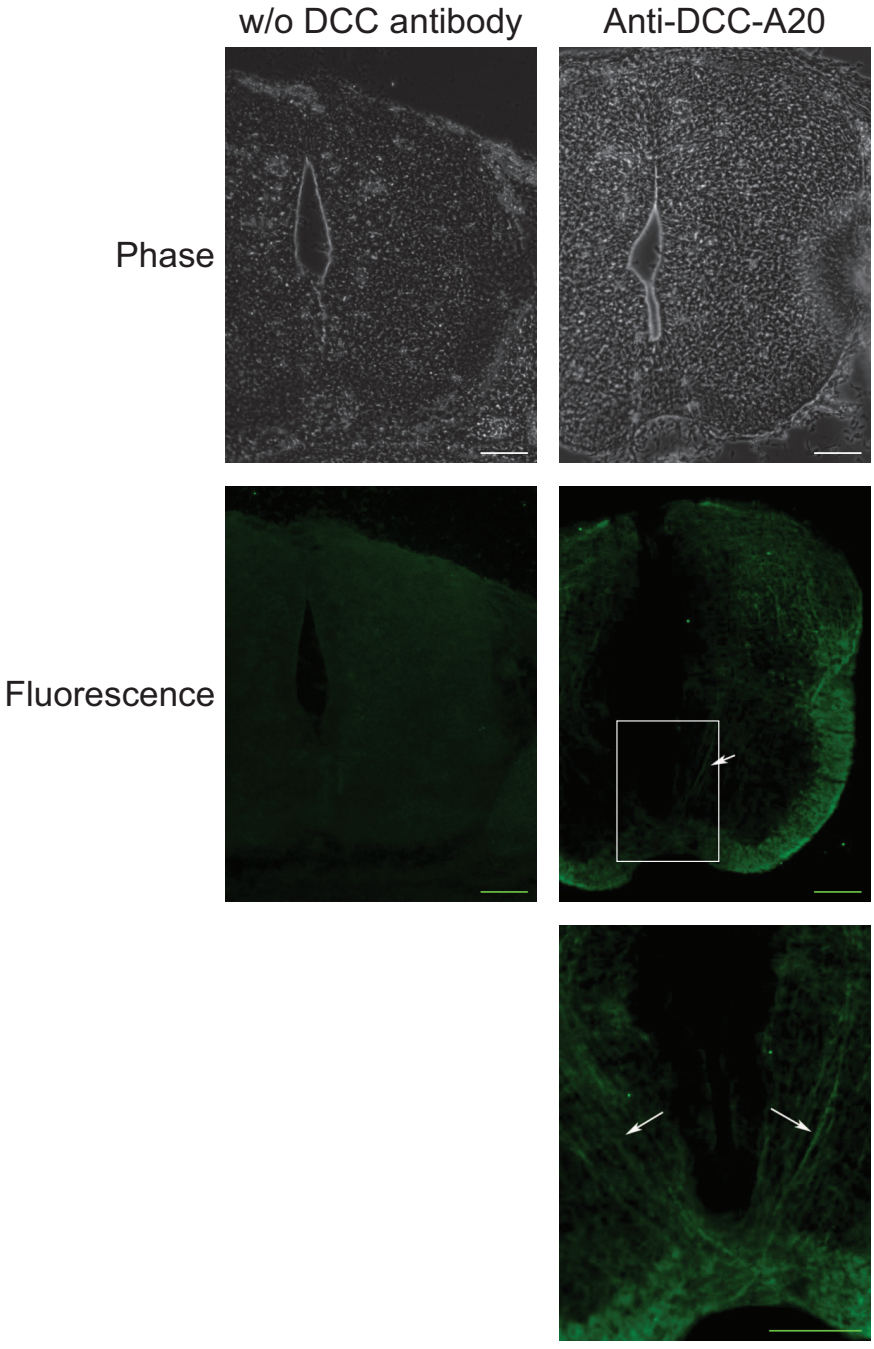


Fig. S1. A20 DCC antibody recognized developing commissural neurons. Representative immunohistochemistries. The left and right columns are respectively stained without and with anti-DCC antibody. The upper panels show the phase, the medium panels the DCC staining and the lower panel is a higher magnification. Arrows indicate commissural axons. (Scale bars, 100 μm.)

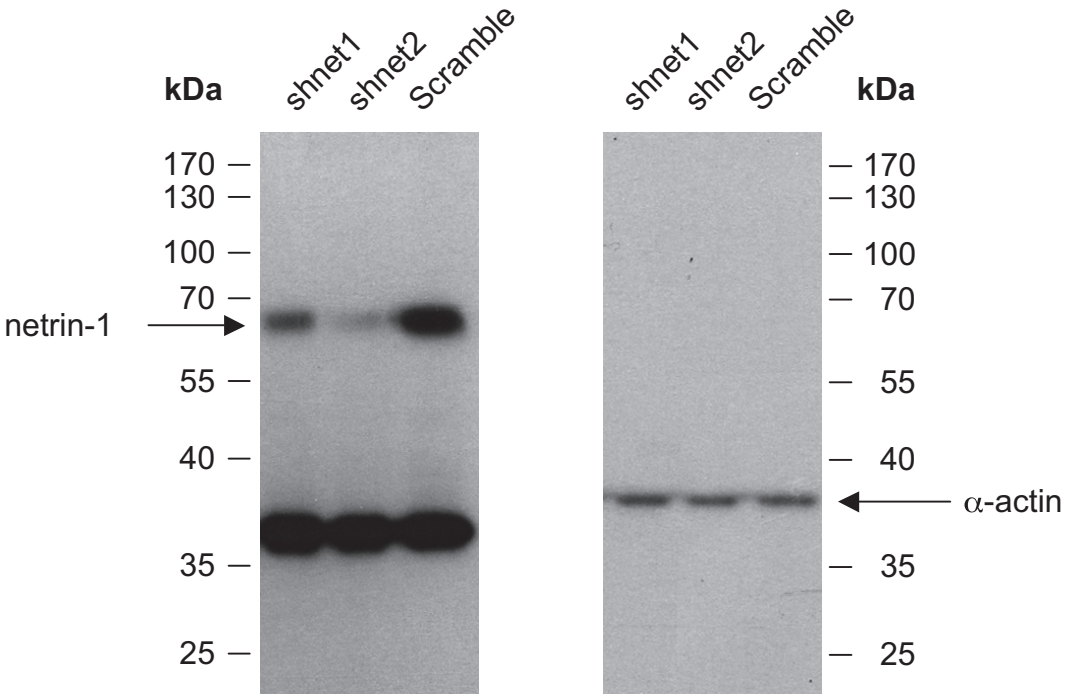


Fig. S2. sh netrin-1 inhibits chick netrin-1 expression. Complete immunoblots against DCC or actin shown in Fig. 4*A*.

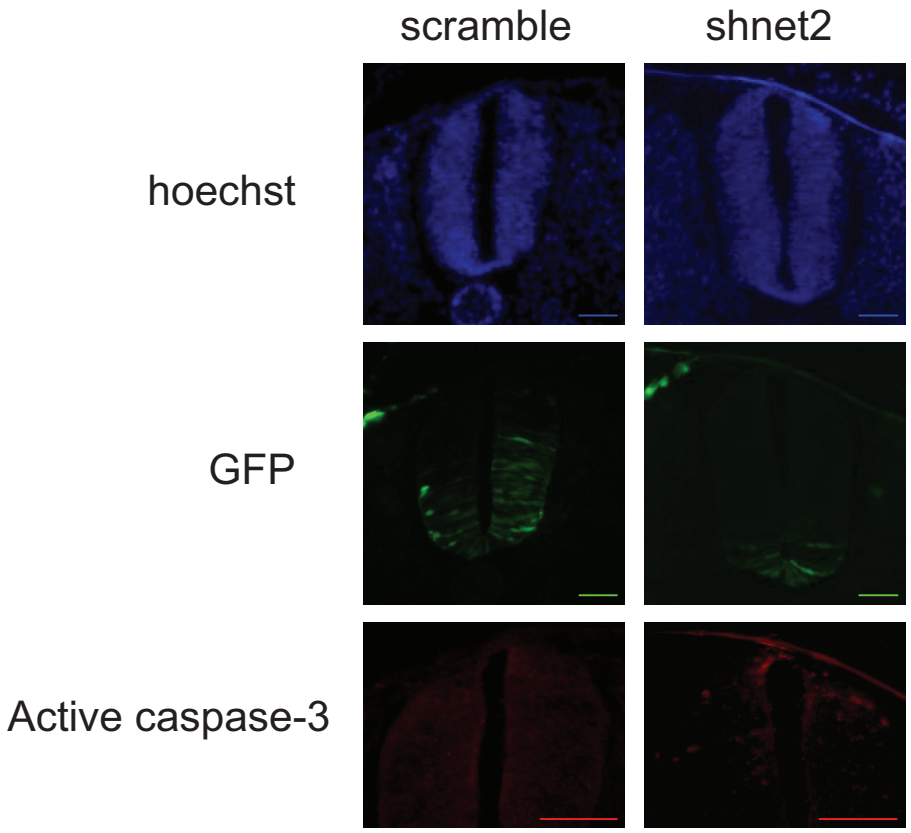
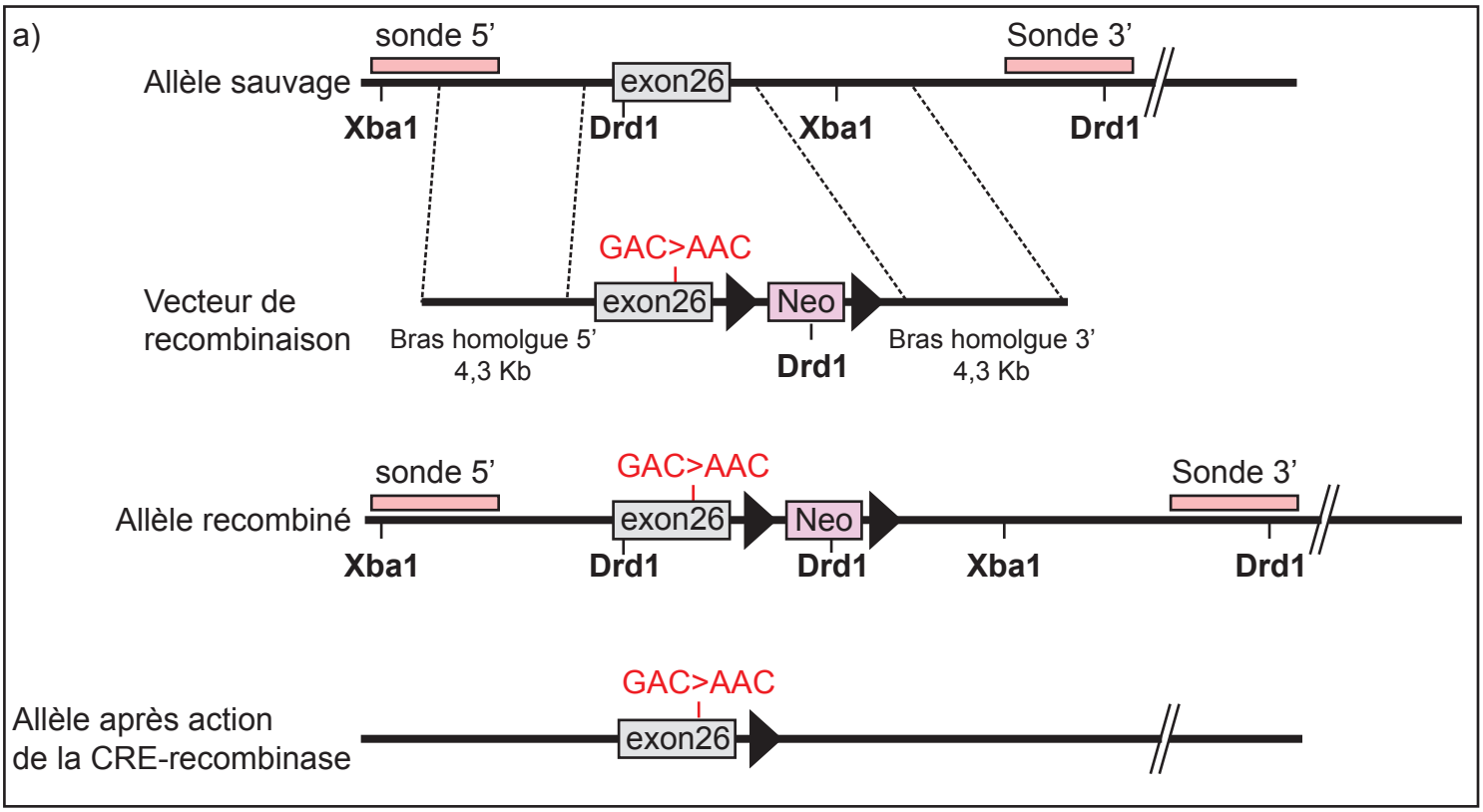
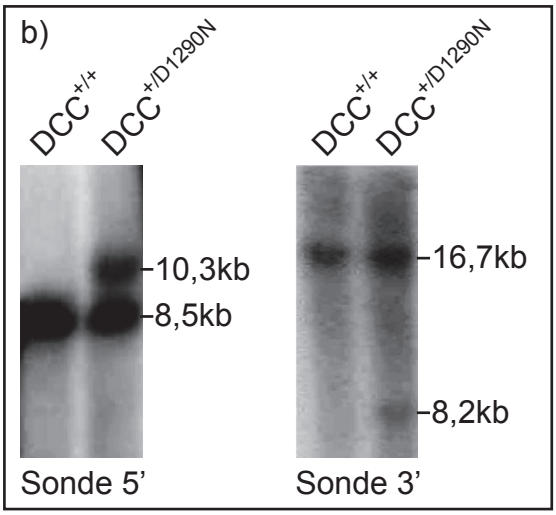


Fig. S3. sh netrin-1 is associated with active caspase-3 staining in developing neural tube. HH10–11 chick embryos were electroporated at the level of the ventral neural tube with a scramble shRNA plasmid (Scramble), or with a netrin-1 shRNA together with a GFP encoding plasmid. Representative hoechst (*Top*), GFP (*Middle*), and active caspase-3 (*Bottom*) staining are shown. (Scale bars, 50 μm.)





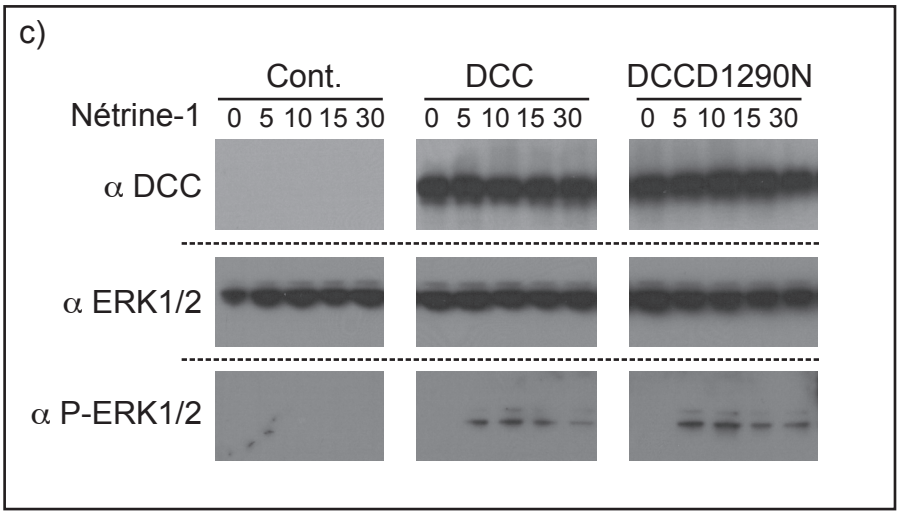


Figure 25 : Génération des souris DCC-D1290N.
a)Schéma des modifications génétiques apportées lors de la "construction" des souris DCC-D1290N
b) Analyse par Southern blot des souris DCC-D1290N. L'ADN a été digéré par Xba1 puis détecté avec la sonde 5'. La bande de 8,5 kb correspond à l'allèle sauvage, tandis que celle de 10,3 kb à l'allèle muté. Un second Southern blot de contrôle a été réalisé après digestion par Drd1 et hybridé avec la sonde 3'. Il montre une bande de 16,7 kb correspondant à l'allèle sauvage, tandis que celle de 8,2 kb représente l'allèle muté.
c) La signalisation positive de DCC n'est pas perturbée par la mutation DCC-D1290N. Des cellules B103 ont été transfectées soit par un vecteur vide (Cont.), soit par DCC (sauvage) ou DCC-D1290N. 24 heures après transfection, un "time course" avec 500 ng/ml de Nétrine-1 a été réalisé, puis une analyse par western blot a permis d'analyser la phosphorylation de Erk1/2.

Etude des souris DCC-D1290N

Dans le but de confirmer notre hypothèse selon laquelle la Nétrine-1 est un facteur de survie neuronale et d'identifier plus précisément le rôle de cette activité de facteur de survie, nous avons généré par recombinaison homologue, des souris transgéniques qui expriment le mutant de clivage de DCC, DCC-D1290N (figures 25 a et b).

Pour cela, dans l'exon 26 de *DCC*, nous avons muté ponctuellement le codon correspondant au site de clivage de DCC par les caspases. L'analyse par Southern blot a permis d'identifier les clones de cellules ES ayant réalisé cette recombinaison, puis la transmission de cette mutation dans la descendance des souris obtenues par réimplantation de ces cellules ES dans des blastocystes.

Au cours de ma thèse, j'ai commencé l'analyse phénotypique de ces souris dans le but de déterminer la contribution de la signalisation pro-apoptotique de DCC au cours du développement du SNC. Dans un premier temps, j'ai mené une analyse globale, afin de détecter d'éventuels défauts au niveau du SNC. Dans un deuxième temps, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à une population neuronale dont la migration et la survie semblent être contrôlées par le couple DCC/Nétrine-1 : les neurones de l'olive inférieure. Enfin, nous avons fait réaliser des tests comportementaux par un laboratoire indépendant (Plate-forme CARDIEX de l'Université de Nantes) afin de tester si les modifications associées à l'abolition de l'activité pro-apoptotique de DCC perturbent les capacités cognitives ou motrices de ces souris.

Avant de commencer l'étude de ces souris, nous avons d'abord vérifié que la mutation du site de clivage par les caspases de DCC ne perturbe pas sa signalisation dite « positive », *ie* en présence de Nétrine-1. En ce sens, j'ai réalisé des tests de phosphorylation des protéines Erk1/2. En effet, la liaison de la Nétrine-1 sur DCC induit la phosphorylation de Erk1/2; ce qui est un événement requis pour la croissance et l'orientation axonale(Forcet et al., 2002). J'ai ainsi pu montrer que l'activation de la voie Erk1/2 n'est pas perturbée par la mutation D1290N sur DCC (figure 25 c). Ce prérequis étant rempli, nous avons alors pu commencer l'étude de ces souris à proprement parler.

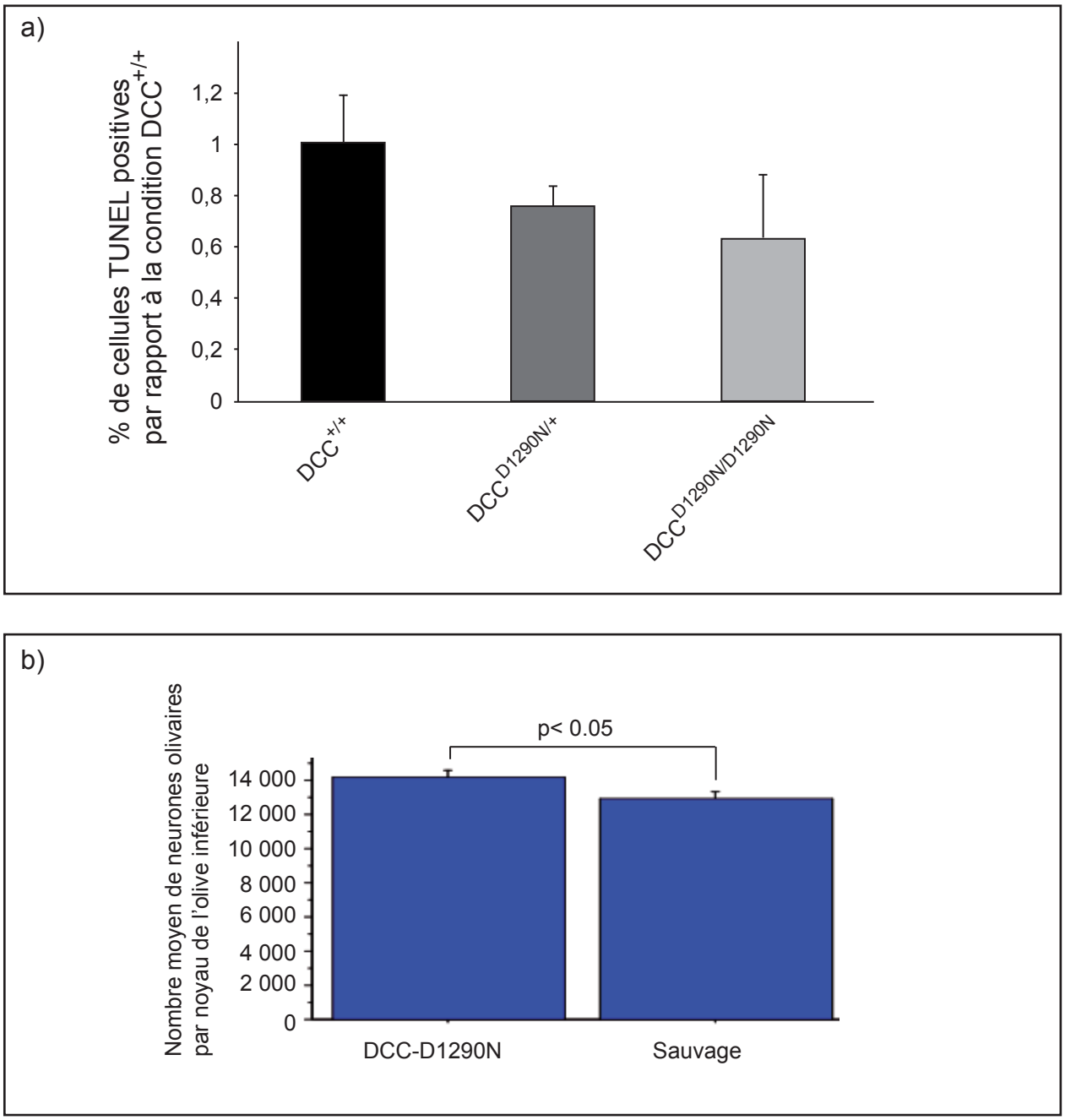


Figure 26 : La survie neuronale est renforcée chez les souris homozygotes DCC-D1290N
a) Analyse TUNEL sur des cultures primaires de neurones commissuraux. Les neurones commissuraux sont prélevés sur des embryons à E11.5 et cultivés pendant 18h en absence de Nétrine-1.
b) Le nombre de neurones olivaires par noyau a été quantifié chez des souris âgées de trois mois. N=7 pour chaque groupe.

Dans un premier temps, nous avons cherché à valider notre modèle. Pour cela, nous avons choisi de travailler sur les neurones commissuraux. En effet, nous avons initialement décrit que la Nétrine-1 est un facteur de survie pour cette population de neurones, car elle bloque chez eux la signalisation pro-apoptotique de DCC(Furne et al., 2008). De la sorte, les neurones commissuraux issus de souris DCC-D1290N ne devraient plus être sensibles à l'absence de Nétrine-1. Nous avons donc réalisé des cultures primaires de neurones commissuraux issus de souris DCC-D1290N en reprenant le protocole expérimental décrit dans l'article précédemment cité(Furne et al., 2008). Ces expériences permettent d'observer que les cultures primaires issues d'embryons homozygotes pour la mutation DCC-D1290N montrent une augmentation de la survie cellulaire par rapport à celles issues d'embryons sauvages (figure 26 a). De plus, les cultures primaires issues d'embryons hétérozygotes ont une augmentation de leur survie intermédiaire, laissant penser à un effet dose. Ces résultats sont encore préliminaires car la différence observée n'est pas statistiquement différente. Cependant, ils suggèrent que notre modèle est valide, puisque, la mutation DCC-D1290N semble abolir l'apoptose des neurones commissuraux de souris en absence de Nétrine-1.

En parallèle, nous avons commencé l'étude phénotypique des souris DCC-D1290N. La mutation du site de clivage de DCC par les caspases ne semble pas être à l'origine d'une létalité embryonnaire ou périnatale. De plus, les souris hétérozygotes ou homozygotes pour la mutation ont à l'âge adulte un comportement qui semble tout à fait normal.

Nous avons alors décidé de faire une analyse globale du SNC sur des animaux de trois semaines car à ce stade, toutes les structures du SNC sont en place. Afin de tester la fonctionnalité de différents aspects du SNC, nous avons réalisé par immunohistofluorescence des marquages généraux à l'aide d'anticorps dirigés contre MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoproteins), ChAT (Choline AcetylTransferase), CaBP (CalBindin Protein) et α-6 ($GABA_A$ receptor $\alpha 6$ subunit). Ces anticorps reconnaissent respectivement (mais pas exclusivement) les faisceaux d'axones, les motoneurones, les cellules de Purkinje et les cellules granulaires du cervelet. Malheureusement, nous n'avons pas détecté d'anomalies flagrantes du SNC à l'aide de ces différents marqueurs.

J'ai également réalisé un marquage Tag-1 sur des embryons homozygotes pour la mutation du site de clivage à E12.5 afin de voir si la trajectoire des axones commissuraux spinaux était perturbée. Là encore, ce ne semble pas être le cas.
Dans ces conditions, nous avons alors choisi de focaliser notre étude sur une population de neurones quantifiables et dont la mise en place fait intervenir le couple DCC/Nétrine-1 : les neurones de l'olive inférieure (OI).

Il s'agit de neurones précérébelleux qui projettent leurs axones controlatérallement dans le cervelet. Ils sont la source exclusive des fibres grimpantes du cervelet qui vont faire des synapses sur les cellules de Purkinje. Ces neurones participent au contrôle et à la coordination des mouvements, notamment les mouvements oculomoteurs(Barmack, 2006).
Notre choix d'étudier ces neurones fut conforté par les observations en accord avec notre hypothèse, selon lesquelles les souris invalidées pour la *nétrine-1* présentent une diminution du nombre de neurones olivaires, tandis que l'invalidation de *DCC* n'influence par le nombre de ces neurones(Bloch-Gallego et al., 1999; Marcos et al., 2009). Nous avons donc réalisé la quantification des neurones olivaires en collaboration avec le docteur Hadi Zanjani du laboratoire Développement et Vieillissement du Système neveux (CNRS UMR 7102) situé à Paris à l'Université P&M Curie, qui est un expert dans ce domaine. Nous avons observé que les souris DCC-D1290N, homozygotes pour la mutation, possèdent une augmentation statistiquement significative de 10% du nombre de neurones olivaires par rapport aux souris contrôles sauvages (figure 26 b), tout en conservant une structure olivaire normale. Ce résultat suggère donc que, puisque son abolition conduit à une augmentation du nombre de neurones olivaires, la signalisation pro-apoptotique de DCC participerait à la régulation du nombre de ces neurones au cours du développement du SNC.

Puisqu'au moins certaines populations neuronales sont affectées par cette mutation, nous avons voulu tester si cela pouvait se traduire par des modifications comportementales. Une série d'études a ainsi été menée par la plate-forme CARDIEX à Nantes, incluant différents types de tests comme le rotarod, l'actimètre, le grip test et le wire test. Le rotarod est une méthode d'analyse de la coordination motrice, de l'équilibre et de la résistance à l'effort. L'actimètre permet de mesurer l'activité motrice

des souris. Le grip test permet de mesurer la force musculaire des animaux. Le wire test permet quant à lui d'évaluer la force et la résistance des souris.
Le rotarod, le grip test et le wire test n'ont pas permis de mettre en évidence de différence entre les souris transgéniques et les souris sauvages. Cependant, l'étude de l'activité motrice a démontré que les souris transgéniques femelles ont une activité motrice diminuée à 8 et 24 semaines (pages 18 et 39 de l'annexe n°6).
D'autre part, l'analyse du poids des souris a démontré que les souris homozygotes pour la mutation ont une masse plus importante que les souris sauvages (page 12 de l'annexe n°6). En outre, l'analyse détaillée de la masse des organes démontre que les souris transgéniques femelles ont des reins et un diaphragme plus lourds (page 52 de l'annexe n°6).
Cette étude, même si elle a ouvert des voies de recherche intéressantes comme le rôle de DCC en tant que DR dans l'homéostasie rénale, n'a pas mis en évidence de défauts majeurs du comportement des souris exprimant DCC-D1290N par rapport aux souris sauvages.

Les résultats pris dans leur ensemble suggèrent donc que la Nétrine-1 pourrait être un facteur de survie neuronale contrôlant le nombre de neurones olivaires puisque l'inhibition de l'activité pro-apoptotique de DCC conduit à une augmentation du nombre de ces neurones. D'autre part, l'abrogation de la signalisation pro-apoptotique de DCC conduit à une augmentation de la masse des souris femelles homozygotes pour la mutation.
Nous interprèterons plus amplement ces résultats dans la discussion, afin de voir quelle suite donner à ces travaux ; notamment en ce qui concerne l'augmentation du nombre de neurones olivaires et de la masse des souris transgéniques femelles.

Discussion

Discussion : La Nétrine-1, un régulateur clef du développement du SNC

Durant ces quatre années de thèse, je me suis intéressé à cette dualité fonctionnelle qui caractérise la Nétrine-1 pendant le développement du SNC_ *ie.* facteur de guidage axonal *versus* facteur de survie. Les différentes études que j'ai menées m'ont conduit à concilier ces deux aspects dont nous allons maintenant discuter. En effet, mes travaux de thèse m'ont permis d'étudier le rôle de la Nétrine-1 comme facteur de guidage, notamment quand je me suis intéressé à APP en tant que récepteur à la Nétrine-1. Mais, ils m'ont aussi amené à étudier le rôle de la Nétrine-1 comme facteur de survie neuronale. Nous verrons que ces deux facettes du rôle de la Nétrine-1 sont étroitement liées.

1 APP collabore avec DCC lors du guidage axonal

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à l'implication du récepteur APP en tant que récepteur à la Nétrine-1. En effet, une étude réalisée au sein du laboratoire a démontré que APP est un récepteur à la Nétrine-1, et que l'interaction APP/Nétrine-1 est à l'origine d'une diminution de la production de peptide amyloïde-β, améliorant les capacités cognitives de souris transgéniques mimant la maladie d'Alzheimer(Lourenco et al., 2009). Cette interaction pourrait donc constituer une cible thérapeutique pour traiter cette maladie.

Si le rôle physiologique de APP est relativement peu connu, son identification comme récepteur au facteur de guidage qu'est la Nétrine-1, nous a conduit à tester si APP ne serait pas lui aussi impliqué dans le guidage axonal. En fait des arguments allant dans ce sens existent déjà. En effet, les souris invalidées pour *APP* présentent des défauts de projections axonales, tels que l'absence de corps calleux, et la diminution de la taille des commissures hippocampique ventrale et antérieure(Magara et al., 1999; Muller et al., 1994). Du fait de leur ressemblance avec celles faites sur les animaux Knock-out pour la *nétrine-1* où ces trois commissures sont absentes, ces observations supportent donc notre hypothèse selon laquelle APP pourrait participer au guidage axonal en réponse à la Nétrine-1.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons choisi comme modèle les neurones commissuraux spinaux car ils sont guidés par la Nétrine-1. Nous avons démontré que

ces neurones expriment APP, et que celui-ci participe au guidage des axones commissuraux, puisque son invalidation conduit à une défasciculation des axones. De plus, APP est retrouvé au sein du complexe DCC/Nétrine-1 où il va moduler la signalisation en aval de DCC. En effet, APP renforce la phosphorylation de Erk1/2 induite par DCC en présence de Nétrine-1, et inhibe l'activité transactivatrice de DCC. Enfin, nous avons mis en évidence que APP est impliqué dans la croissance axonale induite par la Nétrine-1. Afin de savoir si APP pourrait participer à proprement parler au guidage des axones commissuraux en réponse à la Nétrine-1, nous sommes en train de tester à l'aide d'expériences de turning assay sur des neurones commissuraux de souris, si APP intervient également dans l'orientation du cône de croissance.

1-1 APP, un collaborateur de DCC

Il semble effectivement que APP soit impliqué dans le guidage des axones commissuraux puisque son invalidation est associée à des défauts de trajectoires axonales. En effet, les faisceaux d'axones commissuraux sont plus larges suggérant que leur fasciculation ou la projection des axones pionniers pourraient être perturbées.

Une des protéines pouvant permettre d'expliquer le rôle de APP dans la fasciculation des axones commissuraux est Tag-1. En effet, des travaux ont suggéré que ce pourrait être un ligand fonctionnel de APP (Ma et al., 2008). Par ailleurs, Tag-1 est une protéine connue pour participer à la fasciculation des axones et la croissance axonale(Felsenfeld et al., 1994). Toutefois, les souris invalidées pour *Tag-1* ne présentent pas de défauts anatomiques dans la moelle épinière(Fukamauchi et al., 2001). Cette observation suggère donc que même si APP interagit avec Tag-1, cette interaction ne doit pas avoir de conséquence sur le guidage. Elle contrôlerait négativement la neurogenèse(Ma et al., 2008). En effet, l'invalidation de *Tag-1* mène à une neurogenèse aberrante, tandis que l'expression de l'AICD reverse ce phénotype.

Qui plus est, nos résultats démontrent que APP est retrouvé au sein d'un complexe faisant intervenir DCC et la Nétrine-1. En ce sens, nous avons démontré que APP stimule la phosphorylation de Erk1/2; laquelle est un évènement requis lors de la croissance axonale ou de l'orientation du cône de croissance par DCC en réponse à la Nétrine-1(Campbell and Holt, 2003; Forcet et al., 2002). Par conséquent, l'absence de APP pourrait être à l'origine de défauts de guidage des axones commissuraux.

Cette hypothèse est en partie confirmée, notamment en ce qui concerne la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1, puisque l'invalidation de *APP* est à l'origine d'une diminution de la croissance des axones commissuraux en réponse à la Nétrine-1. Toutefois, il semble que APP favorise la croissance axonale en réponse au NGF(Milward et al., 1992; Small et al., 1994). Il faudrait donc tester si l'effet observé en réponse à la Nétrine-1 ne serait pas un effet général de APP sur la croissance axonale. En ce sens, SCF favorise la croissance des axones commissuraux qui ont franchi la ligne médiane(Gore et al., 2008). Il serait donc judicieux de tester si l'invalidation de APP diminue la réponse de ces axones commissuraux en réponse au SCF.

1-2 APP un récepteur autonome à la Nétrine-1 ?

Outre sa collaboration avec DCC, il serait envisageable que APP ait sa propre signalisation dans le guidage axonal en réponse à la Nétrine-1. En effet, la liaison de la Nétrine-1 à APP déclenche l'activité transcriptionnelle de APP, notamment la transcription de *KAI1*(Lourenco et al., 2009). Par ailleurs d'autres études ont décrit parmi les cibles transcriptionnelles de APP, des protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette : la transgeline (organisation et stabilité du cytosquelette d'actine), la tropomyosine 1 (contractilité actinomyosique) et l'actine-α2(Muller et al., 2007). En outre, Erk1/2 phosphoryle la tropomyosine-1, favorisant ainsi le remodelage du cytosquelette(Houle et al., 2003). Or, la Nétrine-1 active Erk1/2 *via* le complexe DCC/APP.

Ces protéines du cytosquelette pourraient donc participer au remodelage du cytosquelette en réponse à la Nétrine-1.

Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que l'AICD active les protéines GSK-3 α et β (Glycogen Synthase Kinase 3)(Ryan and Pimplikar, 2005). Or, la GSK-3β est capable de phosphoryler des protéines impliquées dans le guidage axonal, notamment des protéines contrôlant le cytosquelette. Par exemple, la GSK-3β phosphoryle la protéine MAP-1b qui se trouve être aussi impliquée dans la signalisation de la Nétrine-1(Del Rio et al., 2004).

Il ne serait donc pas invraisemblable que APP possède sa propre signalisation en réponse à la Nétrine-1, et que cette dernière soit impliquée dans le guidage axonal. En effet après invalidation de *DCC*, le nombre d'axones commissuraux atteignant malgré

tout la ligne médiane est plus grand comparé à ce qui est obtenu après l'invalidation de la *nétrine-1*(Fazeli et al., 1997). Il se pourrait donc qu'un autre récepteur à la Nétrine-1 soit impliqué. Afin de tester cette hypothèse et pour poursuivre ce travail, il faudrait réaliser des croisements permettant d'obtenir des embryons invalidés à la fois pour *DCC* et *APP*. De la sorte, il serait possible d'analyser si le nombre d'axones commissuraux atteignant la ligne médiane est plus important chez les embryons invalidés seulement pour DCC.

1-3 APP contrôle le clivage de DCC par les sécrétases

La régulation des récepteurs aux facteurs de guidage par les sécrétases est actuellement très étudiée, notamment en ce qui concerne DCC et les récepteurs Robo(Bai et al., 2011; Coleman et al.; Yang et al., 2009). Au cours de cette étude, nous avons également observé que l'expression de APP perturbe le processing de DCC par les sécrétases. En effet, la co-expression de APP et DCC mène à l'accumulation du fragment α de DCC, aboutissant à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de DCC.

Il serait envisageable que APP puisse contrôler le « processing » de DCC dans les neurones commissuraux et par conséquent participer au guidage de leurs axones. En effet, il a été démontré que l'invalidation de la *préséniline-1* (PS1) est à l'origine d'une accumulation du fragment α de DCC ancré à la membrane, suggérant que la PS1 est la γ-sécrétase qui clive DCC(Parent et al., 2005; Taniguchi et al., 2003). De plus, l'accumulation du fragment α de DCC attaché à la membrane est associée à une augmentation de la croissance axonale, suggérant que ce fragment α stimule la croissance neuritique(Parent et al., 2005). En outre, il a été démontré que ce fragment est capable de se multimériser(Garbe et al., 2007; Stein et al., 2001). De la sorte, cette multimérisation pourrait mimer la signalisation de DCC en présence de Nétrine-1 et stimuler la croissance axonale, comme cela a déjà été décrit chez *C. elegans*(Gitai et al., 2003). En ce sens, nous avons observé que l'invalidation de *APP* est à l'origine d'une diminution de la croissance des axones commissuraux en réponse à la Nétrine-1. L'invalidation de APP aboutirait à l'absence du fragment α de DCC à la membrane, ce qui se traduirait alors par la diminution de la croissance axonale. Afin de confirmer notre hypothèse, il serait également intéressant de comparer le patron de clivage de DCC dans

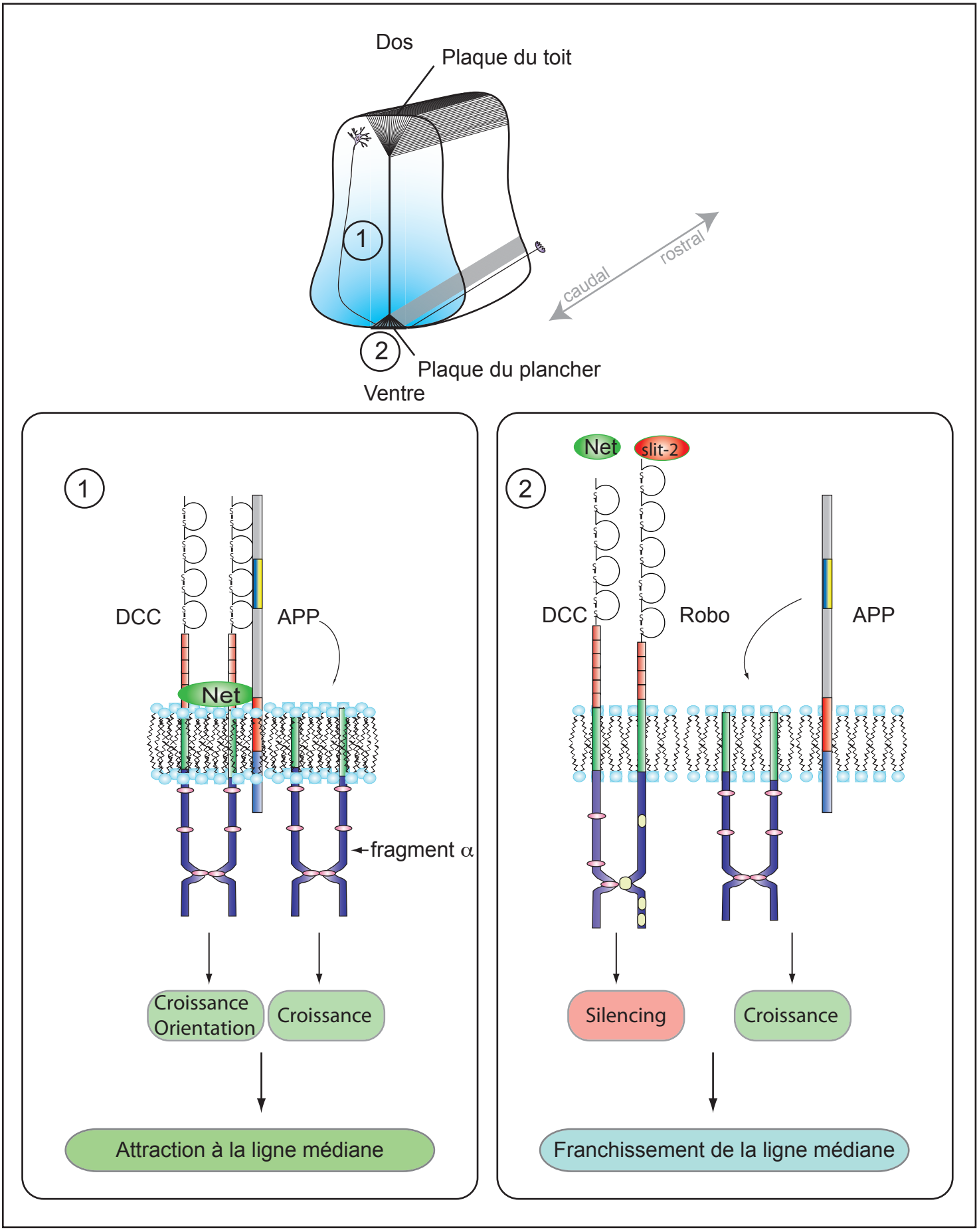


Figure 27: Modèle expliquant le rôle de APP dans le guidage des axones commissuraux
1: lors de l'attraction à la ligne médiane, APP stimule l'activation de Erk1/2 induite par DCC en présence de Nétrine-1. En parallèle, l'accumulation du fragment α de DCC par APP, stimule la croissance axonale *via* la multimérisation des fragments α de DCC. Par conséquent, ces deux voies de signalisation fonctionnent en synergie pour permettre l'attraction à la ligne médiane des axones commissuraux. 2: Lors du franchissement de la ligne médiane, DCC est "silencé" par le couple Slit/Robo. Cependant, l'accumulation du fragment α de DCC *via* l'intervention de APP, permet de stimuler la croissance axonale afin de franchir la ligne médiane indépendamment de la Nétrine-1. Net: Nétrine-1

la moelle épinière d'embryons invalidés pour *APP* et d'embryons sauvages pour tester si APP inhibe aussi le clivage γ de DCC *in vivo*.

Dans notre hypothèse APP stimulerait la croissance axonale *via* deux mécanismes. Le premier serait Nétrine-1 dépendant (renforcement de l'activation de la voie Erk1/2). Le second serait Nétrine-1 indépendant (accumulation du fragment α de DCC).

La croissance axonale pourrait être stimulée par ces deux mécanismes jusqu'à la ligne médiane, et seulement par le mécanisme Nétrine-1 indépendant lors du franchissement de celle-ci (figure 27).

Cependant, une étude très récente suggère que l'accumulation du fragment α de DCC suite à l'invalidation de la *PS1* prévient le « silencing » médié par les récepteurs Robo lors du franchissement de la ligne médiane(Bai et al., 2011). En effet, ces travaux montrent que les axones commissuraux ont du mal à franchir la ligne médiane et que quand ils y parviennent, certains d'entre-eux la franchissent de nouveau. Ces auteurs expliquent ces défauts en suggérant que le fragment α de DCC serait incapable d'interagir avec les récepteurs Robo, alors qu'il pourrait le faire avec le récepteur DCC entier en présence de Nétrine-1. Dans ces conditions, le fragment α de DCC *via* son interaction avec DCC entier stimulerait l'attraction et préviendrait le « silencing » des récepteurs Robo en empêchant l'interaction DCC/Robo. Toutefois, les auteurs n'ont pas testé si le fragment α de DCC est capable d'interagir avec le DCC entier en absence de Nétrine-1. On sait que c'est le cas chez la drosophile où le fragment α de Frazzled interagit avec le Frazzled entier en absence de Nétrine -A ou -B(Garbe et al., 2007). Si c'était le cas chez la souris, les neurones commissuraux perdraient l'information de guidage liée à la Nétrine-1 puisque DCC activerait sa signalisation indépendamment de la Nétrine-1. Or, les auteurs présentent des coupes de moelle épinière de souris $PS1^{-/-}$ ne montrant que la région ventrale, il aurait été vraiment intéressant de voir si les axones atteignent bien tous la ligne médiane, car si le fragment α de DCC active de manière autonome la signalisation de DCC, il devrait y avoir des axones commissuraux présentant une trajectoire aberrante, y compris dans la partie dorsale de la moelle.

En outre dans notre cas, APP conduit à une faible accumulation du fragment α de DCC (cf publication n°1 figure 3 a), alors qu'elle est plus drastique suite à l'invalidation de la *PS1*, puisque la quantité de fragment α de DCC est identique à celle du récepteur entier(Bai et al., 2011). Par conséquent, les effets observés lors de l'invalidation de *PS1* ne sont absolument pas physiologiques et ne permettent pas de tirer de conclusion quant au

rôle du fragment α de DCC issu de l'invalidation de *PS1*. Notre hypothèse de stimulation la croissance axonale par APP *via* deux mécanismes n'est donc pas réfutée par cette étude.

Par ailleurs, le « processing » de DCC par les sécrétases aboutit à la libération d'un fragment DICD capable d'activer la transcription génique. Il semble que le contrôle de cette activité transcriptionnelle soit indépendant de la Nétrine-1, puisque celle-ci ne stimule pas le clivage de DCC par les sécrétases. De plus, l'expression de APP inhibe cette activité transcriptionnelle suggérant que cette dernière pourrait être contrôlée par APP. Toutefois, l'étude de cette voie de signalisation est relativement compliquée par le fait qu'aucun gène cible du DICD de DCC n'ait encore été identifié chez les mammifères. *A contrario*, chez la drosophile, l'expression du fragment intracellulaire de Frazzled par des embryons invalidés pour *frazzled* est capable de restaurer la transcription du gène *commissureless* (Com. Voir son rôle dans le §2-3-1-4), permettant ainsi à certains axones commissuraux de franchir la ligne médiane(Yang et al., 2009). En outre chez la drosophile, les mutants invalidés pour les Nétrines -A et -B expriment correctement Commissureless, confirmant que le contrôle transcriptionnel de Frazzled est indépendant des Nétrines(Yang et al., 2009).
Par conséquent, il est probable que l'activité transactivatrice de DCC contrôle l'expression de gènes impliqués dans le guidage des axones commissuraux. Sa régulation par APP pourrait être une piste d'étude, mais l'absence de gènes cibles de DCC rend pour le moment presque impossible cette étude.

1-4 APP, pourrait-il être impliqué dans l'apoptose induite par DCC ?

A ce jour, le rôle de *APP* dans la mort neuronale ne fait nul doute puisque ce gène est impliqué dans la neurodégénération observée dans la maladie d'Alzheimer. En effet, le peptide amyloïde-β issu de la protéolyse de APP induit l'apoptose des neurones, notamment *via* l'activation de la caspase-3(Loo et al., 1993; Marin et al., 2000). En outre, APP est une cible de la caspase-3; ce clivage stimulant quant à lui la production de peptide amyloïde-β(Gervais et al., 1999; Uetsuki et al., 1999).
Par ailleurs, APP contrôle l'apoptose induite par le récepteur de mort DR6. En effet, le fragment extracellulaire issu du clivage β de APP lie le récepteur DR6 qui active alors la

caspase-6(Nikolaev et al., 2009). Par conséquent, APP est étroitement lié à l'apoptose neuronale.

Des études préliminaires réalisées au sein du laboratoire visant à identifier des partenaires pro-apoptotiques communs entre les différents DRs ont permis d'identifier la protéine DRAL-1 (Downregulated in RhAbdomyosarcoma LIM-domain protein). En particulier, DRAL-1 interagirait avec DCC et Trk-C. On sait de plus que DRAL-1 est un composant de la machinerie pro-apoptotique du DR patched, puisqu'en absence de shh, patched recrute DRAL-1 qui se lie à la protéine Tucan qui recrute à son tour la caspase-9 *via* son domaine CARD(Mille et al., 2009b). Un lien existe également entre DRAL-1 et APP, puisque le clivage de ce dernier par les sécrétases serait contrôlé par la protéine DRAL-1(Tanahashi and Yoshioka, 2008). En effet, le knock-down de DRAL-1 augmente la production de peptide amyloïde-β et diminue la production du fragment α. D'autre part, DRAL-1 interagit avec ADAM -10 et -17 responsables du clivage α de APP. Il semble donc que DRAL-1 contrôle le clivage α de APP.

Au vu des rapports étroits entre DRAL-1 et APP, mais aussi du fait que APP possède un site de clivage par la caspase-3 dans son domaine intracellulaire(Gervais et al., 1999), il était tentant d'imaginer que APP puisse être un DR. Une étude réalisée au laboratoire a testé cette hypothèse mais n'identifia pas APP comme DR (communication personnelle de Jérémy Lambert).

Néanmoins, l'interaction Nétrine-1/APP stimule la voie non-amyloïdogénique (communication personnelle de Véronique Corset). Or, le fragment extracellulaire soluble issu du clivage α (sAPPα) prévient la dégénération dendritique et la mort neuronale(Copanaki et al., 2010). Cette étude suggère donc que la Nétrine-1 abolirait les effets délétères de APP.

Dans ces conditions, il est envisageable de penser qu'en présence de Nétrine-1, la production du fragment α de APP favorise la survie, alors que le couple DCC/Nétrine-1 médie une signalisation de guidage axonal ou de migration neuronale. En revanche, l'absence de Nétrine-1 pourrait déplacer DRAL-1, de APP vers DCC. De ce fait, il y aurait production de peptide amyloïde-β, et DCC activerait sa signalisation pro-apoptotique *via* DRAL-1. Ces deux voies seraient donc synergiques pour l'induction de l'apoptose (figure 28).

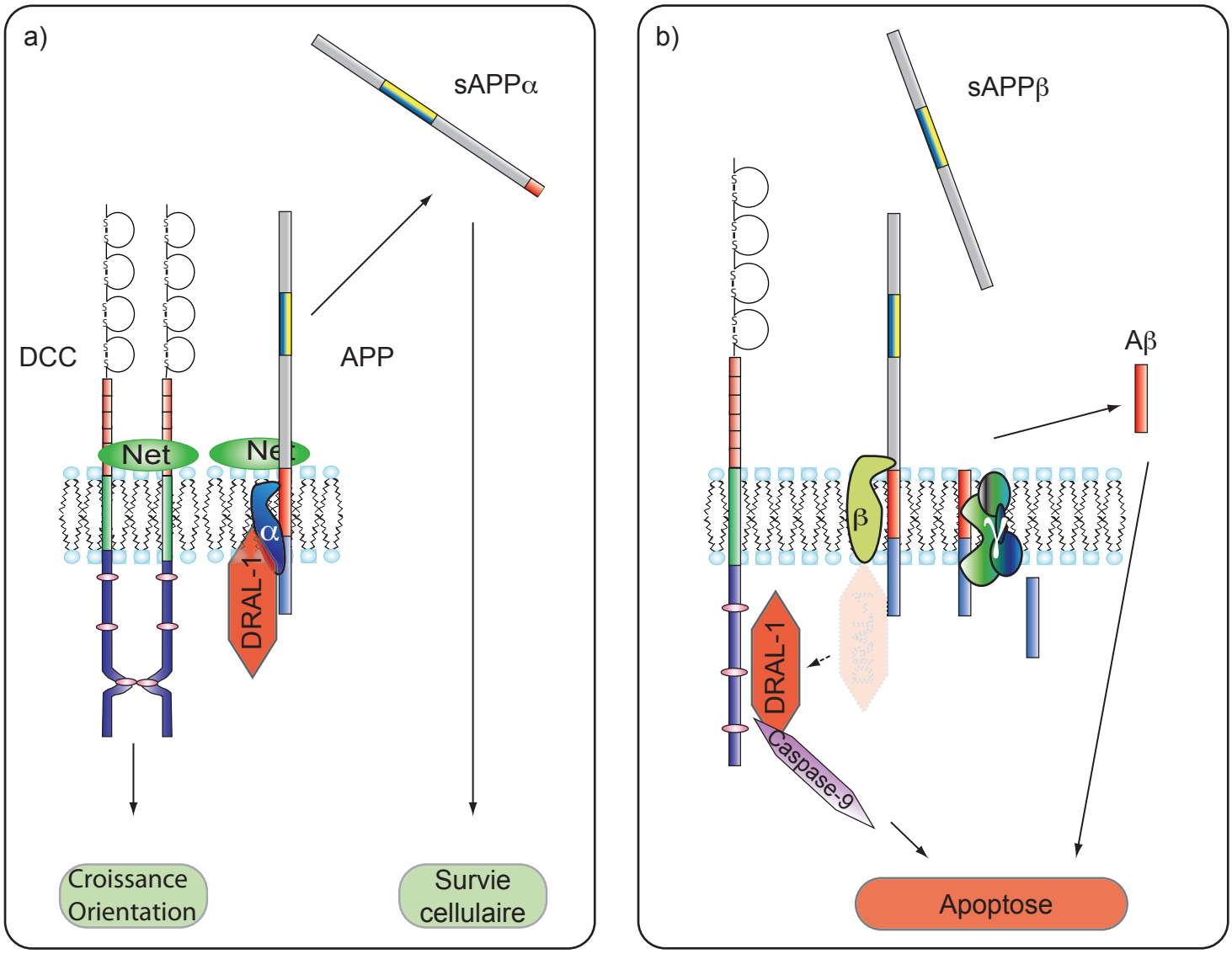


Figure 28: Modèle de collaboration entre DCC et APP lors de l'induction de l'apoptose par DCC
a) En présence de Nétrine-1, DCC transduit une signalisation de croissance, orientation axonale et migration neuronale. En parallèle, APP subit un clivage par l'α-sécrétase *via* l'interaction entre DRAL-1 et l'α-sécrétase qui aboutit à la production de sAPPα favorisant la survie neuronale. b) En absence de Nétrine-1, DRAL-1 se délocaliserait de APP vers DCC. Ainsi, DRAL-1 recruterait et activerait la machinerie pro-apoptotique de DCC. En parallèle, la délocalisation de DRAL-1 vers DCC, conduirait au clivage β de APP aboutissant à la formation de Aβ qui activerait l'apoptose. Net: Nétrine-1

2 La Nétrine-1 est un facteur de survie neuronale

Dans l'étude fondatrice du concept de récepteur à dépendance, il a été montré *in vitro* que la surexpression de DCC conduit à l'élimination des cellules par apoptose; ce qu'empêche au contraire l'ajout de Nétrine-1(Mehlen et al., 1998). Ces travaux suggèrent que la Nétrine-1 serait un facteur de survie cellulaire *via* l'inhibition de l'activité pro-apoptotique de DCC. Depuis cette découverte, quelques études commencèrent à décrypter la signalisation pro-apoptotique de DCC(Forcet et al., 2001; Liu et al., 2002). Quant à son rôle physiologique, peu de choses sont connues, si ce n'est sa dérégulation au cours du processus tumoral(Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Fitamant et al., 2008; Mazelin et al., 2004). En ce sens, au cours de ma thèse j'ai testé l'hypothèse selon laquelle la Nétrine-1 serait un facteur de survie neuronale pour des neurones exprimant DCC pendant le développement du SNC.

2-1 La Nétrine-1 est un facteur de survie pour les neurones commissuraux

Afin de tester notre hypothèse, nous avons choisi de travailler sur le modèle des neurones commissuraux spinaux pour deux raisons. (i) Les neurones commissuraux ont permis l'établissement du paradigme de la chimioattraction par la Nétrine-1. (ii) Ces neurones expriment DCC et projettent leur axone en réponse à la Nétrine-1. Ils présentent donc les caractéristiques parfaites afin de tester notre hypothèse.

Au cours de cette étude, nous avons montré *in vitro* que la Nétrine-1 est un facteur de survie pour les neurones commissuraux. De plus, cette activité de survie neuronale est médiée *via* l'inhibition de l'activité pro-apoptotique de DCC. Cette observation permet de différencier la Nétrine-1 des autres facteurs de survie appartenant à la famille des neurotrophines, à l'exception de la NT-3 dont le récepteur Trk-C appartient à la famille des DRs(Tauszig-Delamasure et al., 2007). En effet, les facteurs neurotrophiques génèrent un signal de survie *via* leurs liaisons avec leurs récepteurs. L'invalidation des neurotrophines ou de leurs récepteurs est à l'origine de la mort des neurones par apoptose puisque ces derniers ne reçoivent plus de signaux de survie. Par exemple, l'invalidation du *BDNF* ou de son récepteur *TrkB* est associée à la même perte neuronale(Ernfors et al., 1994; Minichiello et al., 1995). En revanche, l'invalidation de *DCC* permet la survie des neurones commissuraux en absence de Nétrine-1, tandis que l'ajout de Nétrine-1 ne favorise pas la survie des neurones commissuraux $DCC^{-/-}$. Ce

résultat suggère donc que la Nétrine-1 bloque la signalisation pro-apoptotique de DCC et favorise par là même la survie neuronale.

En outre, nous avons démontré que la Nétrine-1 est un facteur de survie *in vivo* pour les neurones commissuraux dans la moelle épinière d'embryons de souris et de poulet. En effet, l'invalidation ou le knock-down de la *nétrine-1* est à l'origine d'une augmentation du nombre de cellules apoptotiques, notamment dans la région des neurones commissuraux.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent donc que la Nétrine-1 contrôle la survie des neurones commissuraux *via* l'inhibition de la signalisation pro-apoptotique de DCC. Néanmoins, les neurones commissuraux spinaux ont leur corps cellulaire situé dans la partie dorsale de la moelle épinière, d'où ils projettent leurs axones en direction ventrale à partir de E9.5(Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995b). Or, la région dorsale est dépourvue de Nétrine-1 à cette période du développement suggérant que les neurones commissuraux exprimant DCC devraient être éliminés par apoptose, mais ce n'est pas le cas.

Plusieurs explications sont alors possibles. (i) Il est envisageable qu'un neurone qui n'a jamais été en présence de Nétrine-1, que l'on pourrait appeler « naïf », ne soit pas sensible à l'absence de Nétrine-1. Cela suggère qu'un neurone ne deviendrait dépendant à la présence de la Nétrine-1 que s'il a été au préalable mis au contact de cette dernière. La sensibilisation par la Nétrine-1 pourrait par exemple initier la production de protéines impliquées dans la voie de signalisation pro-apoptotique de DCC. (ii) Par ailleurs, l'apoptose induite par DCC *in vitro* a lieu 48 heures après transfection(Mehlen et al., 1998). Or, les neurones commissuraux commencent à projeter leurs axones à E9.5 et les premiers atteignent la ligne médiane vers E10.5. *In vivo*, les axones commissuraux rencontreraient donc très rapidement la Nétrine-1 qui forme un gradient qui s'étend jusqu'aux 2/3 ventraux de la moelle épinière, inhibant ainsi la signalisation pro-apoptotique de DCC(Kennedy et al., 2006). (iii) En outre, les axones commissuraux sont immuno-réactifs pour la Nétrine-1(Kennedy et al., 2006). Il est donc possible que les premiers axones commissuraux qui atteignent la ligne médiane, captent la Nétrine-1 *via* les récepteurs DCC présents à leur surface. Dans ces conditions, le complexe DCC/Nétrine-1 pourrait être déplacé vers la région dorsale, le long des axones pionniers et présenter la Nétrine-1 aux neurones commissuraux qui commencent à projeter leur axone. Cette activité de présentation de la Nétrine-1 par DCC a déjà été suggérée chez la

drosophile. En effet, une étude a démontré que Frazzled capture les Nétrines -A et -B à la ligne médiane et les relocaliserait dans la région dorsale au niveau des corps cellulaires des neurones commissuraux pour la présenter à d'autres cônes de croissance(Hiramoto et al., 2000). (iv) Par ailleurs, la plaque du toit sécrète des molécules impliquées dans la répulsion des axones commissuraux en direction ventrale :BMP7 et GDF7(Augsburger et al., 1999; Butler and Dodd, 2003). Or, les protéines BMP -6 et -7 sont connues pour favoriser la survie neuronale des cellules granulaires du cervelet(Yabe et al., 2002). Dans notre modèle, il est envisageable que ces protéines favorisent également la survie des neurones commissuraux avant qu'ils aient rencontré la Nétrine-1, prévenant ainsi la cascade apoptotique induite par DCC.

2-2 La signalisation pro-apoptotique de DCC contrôle la survie cellulaire

Les phénotypes des souris invalidées pour la *nétrine-1* ou *DCC* apparaissent assez similaires, contredisant quelque peu notre théorie des récepteurs à dépendance. En effet chez les souris invalidées pour *DCC*, on s'attendrait à observer une restauration de certaines structures absentes chez les souris invalidées pour la *nétrine-1* ce qui n'est globalement pas le cas. Il est fort probable que la contribution de la signalisation de DCC en présence de Nétrine-1 ait un rôle majeur rendant ainsi difficilement identifiables les défauts spécifiquement dus à l'inhibition du rôle de la signalisation pro-apoptotique de DCC. Néanmoins, deux études supportent l'idée que le contrôle de la signalisation pro-apoptotique de DCC par la Nétrine-1 régulerait la taille de certaines populations neuronales. En effet contrairement aux embryons $DCC^{-/-}$ qui ne présentent qu'une faible diminution du nombre de neurones olivaires, l'invalidation de la *nétrine-1* conduit à une réduction beaucoup plus drastique de cette population neuronale(Bloch-Gallego et al., 1999; Marcos et al., 2009). La comparaison de ces deux travaux suggère donc que la Nétrine-1 serait un facteur de survie neuronale contrôlant la signalisation pro-apoptotique de DCC.

Afin de déterminer plus aisément les contributions respectives de la signalisation classique de DCC, en présence de Nétrine-1, ou pro-apoptotique, en absence de Nétrine-1 ; nous avons généré des souris mutées sur le site de clivage de DCC (DCC-D1290N), abolissant ainsi la signalisation pro-apoptotique de DCC sans toutefois perturber la signalisation classique. Afin de valider notre modèle murin, nous avons donc réalisé des

cultures primaires de neurones commissuraux issus d'embryons DCC-D1290N. Comme attendu, nous avons observé que les cultures primaires issues d'embryons homozygotes pour la mutation présentent une augmentation de la survie cellulaire en absence de Nétrine-1. Toutefois, ces expériences doivent être reproduites afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

2-2-1 les souris DCC-D1290N

L'analyse globale du SNC des souris homozygotes DCC-D1290N ne nous a pas permis d'identifier de défauts anatomiques majeurs. Dans ces conditions, il faut garder à l'esprit que la signalisation classique de DCC n'est pas perturbée et que par conséquent les défauts de navigation neuronale ne sont probablement pas très nombreux. L'observation de tels défauts n'est donc pas une tâche aisée. De plus, nous avons réalisé cette étude sur des animaux de trois semaines. Il est fort probable que les projections axonales aberrantes aient été éliminées par exemple par le manque de facteurs neurotrophiques, ou par d'autres processus dont nous parlerons plus loin.

En ce qui concerne les neurones commissuraux spinaux de rat, ils sont dépendants, à partir de E14 jusqu'à E17, d'un support trophique sécrété à la ligne médiane, autre que la Nétrine-1, mais toujours inconnu à ce jour(Wang and Tessier-Lavigne, 1999). Dans ces conditions, les neurones commissuraux qui se projetteraient de manière aberrante entre E11 et E13 ne bénéficieraient pas de ce support trophique à E14 et seraient ainsi éliminés, ce qui pourrait masquer ces défauts de projection chez les souris DCC-D1290N. En outre, une étude réalisée au sein du laboratoire est en train de démontrer que le récepteur à Sonic HedgeHog, CDO (Cell-adhesion-molecule-releated/ Downregulated by Oncogenes), est un récepteur à dépendance (Delloye et *al,* soumis). Or, SHH participe au guidage des axones commissuraux vers la ligne médiane(Charron et al., 2003). En effet, SHH est exprimé en région ventrale formant ainsi un gradient ventro-dorsal qui attire les axones commissuraux. Les neurones commissuraux expriment à la fois BOC (Brother of CDO) et CDO, mais seul BOC est impliqué dans le guidage des axones commissuraux(Okada et al., 2006). Il se pourrait que CDO puisse éliminer les neurones dont les axones ne se projettent pas correctement car ils sont dépendants de la présence de SHH.

De ce fait, il est envisageable que ces deux processus masquent les défauts des projections commissurales associées à l'abolition de la signalisation pro-apoptotique de

DCC. En outre, il est aussi possible que le support trophique entre E14 et E17 soit SHH, même si cette hypothèse n'a pas encore été testée.

En outre, nous avons croisé des animaux *nétrine-1*$^{+/-}$ avec des DCC-D1290N, afin d'obtenir des animaux double homozygotes *nétrine-1*$^{-/-}$; *DCC*$^{D1290N/D1290N}$. Aucun des animaux doubles homozygotes ne fut viable, suggérant que le rôle prépondérant de la Nétrine-1 au cours du développement du SNC, soit son activité de guidage. De plus, l'analyse des projections commissurales de ces embryons n'a pas révélé de restauration des projections commissurales, soutenant aussi le rôle prééminent de facteur de guidage de la Nétrine-1.

Il semble donc que le rôle de facteur de survie neuronale de la Nétrine-1 soit difficile à observer à cause d'un ensemble de mécanismes redondants prévenant la production de projections axonales aberrantes. En ce sens nous avons focalisé notre attention sur une population neuronale plus restreinte, facilitant ainsi notre étude.

2-2-2 Les souris DCC-D1290N ont un nombre de neurones olivaires plus important

Les neurones olivaires (qui expriment DCC et sont guidés par la Nétrine-1) sont un modèle adéquat pour notre étude puisque l'analyse de cette population neuronale après invalidation de la *nétrine-1* ou de *DCC* soutient notre proposition selon laquelle la Nétrine-1 est un facteur de survie neuronale. Nous avons montré que le nombre de ces neurones chez les souris homozygotes DCC-D1290N est augmenté de 10% ce qui valide ainsi notre hypothèse. Il serait également intéressant de réaliser ces expériences de quantification chez des embryons à E18.5 ayant comme génotype *DCC*$^{+/+}$; *nétrine-1*$^{-/-}$ *versus* *DCC*$^{D1290N/D1290N}$; *nétrine-1*$^{-/-}$. Si notre hypothèse est correcte, les neurones olivaires perdus par apoptose chez les embryons *DCC*$^{+/+}$; *nétrine-1*$^{-/-}$ devraient être sauvés chez les embryons *DCC*$^{D1290N/D1290N}$; *nétrine-1*$^{-/-}$.

En outre, les neurones olivaires expriment d'autres DRs, notamment les récepteurs Unc5H -1, -2 et -3 et la Néogénine(Bloch-Gallego et al., 1999). Nous avons généré au laboratoire des souris exprimant un dominant négatif des récepteurs Unc5h capable de bloquer spécifiquement leur signalisation pro-apoptotique. Il serait intéressant de voir si le croisement de cette lignée avec les souris DCC-D1290N serait à l'origine d'un plus grand nombre de neurones olivaires. Si ce devait être le cas, cette expérience

confirmerait le rôle de facteur de survie de la Nétrine-1 *via* l'inhibition de la signalisation pro-apoptotique de ses DRs.

Il semble donc que la Nétrine-1 puisse contrôler la taille de la population des neurones olivaires. Dans des conditions physiologiques, la sécrétion de Nétrine-1 à la ligne médiane satisferait un nombre limité de liaisons avec ses DRs et permettrait l'élimination des neurones dont les DRs ne sont pas liés à la Nétrine-1. En revanche, les neurones olivaires des souris DCC-D1290N ne seraient plus sensibles à la quantité limitée de Nétrine-1 et de ce fait, la taille de la population des neurones olivaires ne pourrait plus être contrôlée par l'activité de facteur de survie de la Nétrine-1.

Par ailleurs, la structure générale de l'olive inférieure n'est pas altérée chez les souris DCC-D1290N. Néanmoins, le nombre de neurones olivaires étant plus élevé que dans les individus contrôles, il serait intéressant d'analyser les conséquences de cette augmentation sur l'innervation des cellules de Purkinje. En effet, les neurones olivaires sont des neurones précérébelleux qui projettent controlatérallement dans le cervelet pour faire des synapses avec les cellules de Purkinje. A la naissance, chaque cellule de Purkinje est innervée par trois à quatre fibres grimpantes (nom donné aux axones des neurones olivaires), dont la majorité sera éliminée au cours des trois premières semaines post-natales pour aboutir en définitive à une seule fibre grimpante par cellule de Purkinje(Eccles et al., 1966; Kano et al., 1995). Il serait donc intéressant de regarder au cours des premiers jours après la naissance si les souris DCC-D1290N présentent des cellules de Purkinje innervées par plus de trois ou quatre fibres grimpantes comme c'est le cas chez des nouveaux-nés sauvages.

L'existence d'au moins une population neuronale perturbée chez les souris DCC-D1290N nous a conduit à tester si cela pouvait se traduire par des défauts comportementaux. L'ensemble des tests ne nous a pas permis d'identifier de défauts majeurs du comportement de ces souris, il faut cependant noter que nous n'avons pas effectué de test spécifique du noyau de l'olive inférieure. En ce sens, il serait intéressant de réaliser un tel test cognitif spécifique mettant en jeux les neurones olivaires ; à savoir le test du reflexe vestibulo-occulaire (RVO). Le RVO permet la stabilisation de l'image rétinienne sur la fovéa lors des mouvements de la tête(Paige and Seidman, 1999). En d'autres termes, ce reflexe permet aux yeux de suivre une cible lors d'un mouvement de la tête.

Par ailleurs, les tests comportementaux ont aussi montré que les souris homozygotes DCC-D1290N se déplacent moins et ont une masse supérieure aux souris sauvages. Ces

observations sont principalement vraies pour les femelles et nous amènent à nous demander s'il y a un lien entre le poids des souris et leur activité motrice. Si l'on considère les souris prises individuellement et non plus la tendance moyenne, on observe qu'il n'y a pas de corrélation entre les deux paramètres. De plus, en ce qui concerne le poids, il semble que les souris femelles DCC-D1290N sont plus grosses dès la naissance et que l'écart initial est maintenu au cours de leur croissance ce qui tend à confirmer l'absence de lien direct entre poids et activité motrice. Si l'on regarde plus en détail, plusieurs organes sont plus lourds chez les souris homozygotes, ce qui peut au moins en partie expliquer l'augmentation globale de poids chez ces souris. C'est notamment le cas du cœur et du rein. Nous verrons à ce sujet dans le paragraphe suivant que la Nétrine-1 contrôle la survie des cellules rénales, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la taille du rein chez ces souris.

En outre, l'hypothalamus est impliqué dans le contrôle de la prise de nourriture et la régulation du métabolisme(Horvath, 2005). Or, le couple DCC/Nétrine-1 participe à la mise en place de certaines populations neuronales hypothalamiques, notamment les neurones GnRH(Deiner and Sretavan, 1999). En ce qui concerne ces derniers, une étude démontre que l'invalidation de la *nétrine-1* est à l'origine d'une diminution de leur nombre, ce que ne provoque pas l'invalidation de *DCC*(Deiner and Sretavan, 1999). Cette observation soutient encore une fois notre hypothèse. En ce sens, il serait très intéressant de regarder si les souris DCC-D1290N ont plus de neurones GnRH. Il serait possible qu'un surnombre de neurones GnRH puisse expliquer le fait que les souris DCC-D1290N aient une masse supérieure aux sauvages. Toutefois à ce jour, il n'existe aucune preuve démontrant un rôle direct de la GnRH dans la prise de poids.

2-2-3 La Nétrine-1 contrôle la survie cellulaire chez l'adulte

Si la Nétrine-1 est présente dans plusieurs organes chez l'adulte, c'est dans le rein que son niveau d'expression est le plus élevé chez la souris. Il a été décrit dans cet organe, que la Nétrine-1 contrôle la survie des cellules après des expériences d'ischémie-reperfusion (IR). Dans ce modèle expérimentale, l'expression de la Nétrine-1 augmente rapidement puis diminue progressivement après IR du rein. En parallèle, l'expression des récepteurs Unc5h2 et DCC augmente(Wang et al., 2008b). Ces variations d'expression sont accompagnées de sévères disfonctionnements du rein qui peuvent être prévenus par la perfusion de Nétrine-1 avant l'expérience d'IR(Wang et al., 2008b). Afin de déterminer le mode d'action de la Nétrine-1, les auteurs ont utilisé des

souris qui surexpriment la Nétrine-1 dans le rein (et l'intestin)(Mazelin et al., 2004). Dans ce modèle, la surexpression de Nétrine-1 restaure le fonctionnement du rein après IR, notamment en bloquant l'apoptose(Wang et al., 2009a). Ce résultat laisse penser que les récepteurs à la Nétrine-1, Unc5h2 et DCC dont on a vu qu'ils étaient surexprimés après IR, pourraient donc être impliqués dans l'apoptose induite par l'IR chez les souris sauvages. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant de pratiquer ces expériences d'IR sur les souris DCC-D1290N, afin de tester si l'inhibition de l'apoptose induite par la Nétrine-1 pourrait être mimée par l'expression de DCC-D1290N. En effet, les souris DCC-D1290N devraient présenter une diminution de l'apoptose après IR. Toutefois, il est possible que cette diminution ne soit pas complète puisque Unc5h2 serait alors toujours capable d'induire l'apoptose. En outre, il semble que la Nétrine-1 contrôle d'autres évènements restaurant le fonctionnement du rein, comme la réduction de l'inflammation(Wang et al., 2009a).

Un autre exemple de l'importance fonctionnelle de la Nétrine-1 chez l'adulte, est son rôle dans le contrôle de la tumorigenèse. En effet, il a été montré au laboratoire que la perte de la fonction pro-apoptotique de DCC ou l'expression autocrine de Nétrine-1 favorisent la progression tumorale(Fitamant et al., 2008; Mazelin et al., 2004). En effet, une population de cellules tumorales ayant l'une ou l'autre de ces caractéristiques, n'est plus dépendante pour sa survie de la présence du ligand exogène. Par conséquent, cette perte de dépendance au ligand constitue un avantage sélectif propice à la progression et la dissémination des cellules tumorales. Ainsi, une étude réalisée au sein du laboratoire démontre que la surexpression de Nétrine-1 dans l'intestin de souris, où est exprimé DCC, favorise l'apparition d'adénocarcinomes(Mazelin et al., 2004). En ce sens, les souris DCC-D1290N devraient nous permettre de montrer que l'abrogation de la signalisation pro-apoptotique de DCC, pourrait participer soit à l'initiation, soit à la progression tumorale.

Concernant ce projet, deux études sont actuellement en cours de réalisation au laboratoire. La première consiste à laisser vieillir des animaux afin d'étudier la tumorigenèse spontanée. Dans la seconde des souris DCC-D1290N sont croisées avec des souris mutantes pour *APC*, connues pour favoriser l'initiation tumorale dans l'intestin. De la sorte, ce croisement nous permet de voir la conséquence de l'abolition de la signalisation pro-apoptotique de DCC sur la progression tumorale. La seconde étude est en cours de finalisation et démontre que la mutation du site de clivage par les

caspases de DCC, inhibe l'apoptose dans l'intestin de ces souris et qu'elle favorise la progression tumorale. En effet, 50% des souris APC/DCC-sauvage présentent des adénocarcinomes contre 100% des souris APC/DCC-D1290N (Communication personnelle de Marie Castets). Ce résultat démontre donc que la signalisation pro-apoptotique de DCC inhibe la progression tumorale dans l'intestin.

3 Le couple DCC/Nétrine-1, un gage de qualité

Le rôle du couple DCC/Nétrine-1 ne fait aucun doute lors du développement du SNC. En effet, la signalisation induite par la liaison de la Nétrine-1 au récepteur DCC est à l'origine d'une cascade de signalisation requise pendant la navigation neuronale. En ce qui concerne le contrôle de la signalisation pro-apoptotique de DCC par la Nétrine-1, nous avons pu démontrer qu'elle peut participer au contrôle de la taille d'une population neuronale, et nous avons des arguments qui comme nous allons le voir, nous permettent de proposer qu'elle pourrait être impliquée pendant le guidage axonal à deux niveaux : l'élimination des projections axonales aberrantes et le remodelage du cytosquelette du cône de croissance.

3-1 DCC/Nétrine-1 contrôle qualité des projections axonales

Nous proposons que la signalisation pro-apoptotique de DCC pourrait participer à un « contrôle qualité » des projections axonales. Plus précisément, nous suggérons qu'un neurone exprimant DCC serait éliminé par apoptose lorsqu'il projette son axone de manière aberrante dans une zone dépourvue de Nétrine-1. En effet, l'absence de Nétrine-1 devrait conduire à l'activation de la signalisation pro-apoptotique de DCC et donc mener à l'apoptose du neurone (figure 29). Cette hypothèse est également applicable à la migration neuronale. En effet, un neurone exprimant DCC, s'il migre dans une région dépourvue de Nétrine-1, serait aussi éliminé par l'apoptose induite par DCC.
Nous avons obtenu des résultats préliminaires soutenant cette hypothèse. En effet, l'injection d'un inhibiteur général des caspases, le z-VAD-fmk, dans le canal central du tube neural d'un embryon de poulet était à l'origine d'une augmentation du nombre d'axones commissuraux réalisant des projections aberrantes. Néanmoins, cet inhibiteur n'est pas spécifique de la signalisation pro-apoptotique de DCC.

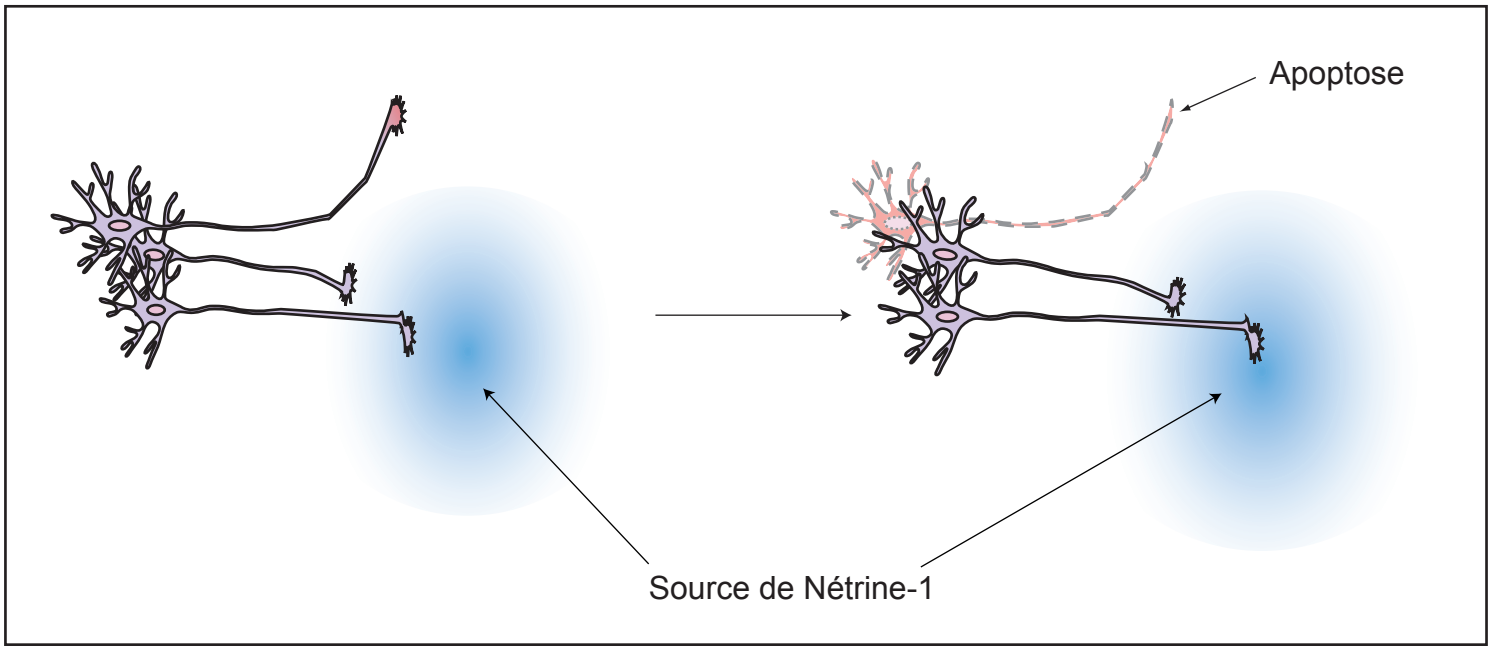


Figure 29 : Contrôle qualité des projections axonales par la signalisation pro-apoptotique de DCC.
La projection aberrante d'un axone exprimant DCC en dehors du champ d'accessibilité de la Nétrine-1 conduirait à l'activation générale de la caspase-3 dans tout le neurone, permettant son élimination par apoptose. Dans ces conditions, la signalisation pro-apoptotique de DCC joue un rôle de "contrôle qualité " des projections axonales.

En ce sens, l'utilisation des souris DCC-D1290N devrait nous permettre de nous focaliser uniquement sur le rôle de la signalisation pro-apoptotique de DCC pendant la navigation neuronale. En ce qui concerne le guidage axonal, nous n'avons pas réussi à identifier de défauts, notamment au niveau des commissures spinales pour les raisons décrites dans le paragraphe 1-2-1. Néanmoins, il pourrait être intéressant d'analyser d'autres commissures comme le corps calleux par exemple.

En terme de migration neuronale, il serait intéressant de se focaliser sur le modèle des neurones olivaires puisqu'il semble que le rôle de facteur de survie de la Nétrine-1 participe à leur bon développement. En ce sens, il serait judicieux de regarder si les souris DCC-D1290N présentent des neurones olivaires ectopiques capables de survivre dans une région dépourvue de Nétrine-1.

Dans les conditions décrites dans ce chapitre, la mise en œuvre de la signalisation pro-apoptotique de DCC passe par l'activation généralisée de la caspase-3 dans les neurones concernés. Cependant, nous allons voir que l'activation de la caspase-3 par DCC peut également rester localisée et participer différemment au guidage axonal.

3-2 DCC/Nétrine-1 et remodelage du cytosquelette du cône de croissance par les caspases

Nous proposons que la dualité d'action de DCC en présence ou en l'absence de Nétrine-1 pourrait aussi se répercuter au niveau de la polarisation du cône de croissance. En effet, si on imagine un axone confronté à un gradient de Nétrine-1, la quantité de Nétrine-1 sera plus importante du côté de la surface du cône de croissance le plus proche de la source de Nétrine-1. Par conséquent, le nombre de récepteurs DCC dont la liaison avec la Nétrine-1 est insatisfaite, doit être plus important de l'autre côté du cône de croissance, à l'opposé de la source de Nétrine-1. Dans ces conditions, nous proposons que du côté de la source de Nétrine-1, DCC activerait sa signalisation classique favorisant la croissance et l'attraction vers la source de Nétrine-1. En revanche, du côté opposé à la source de Nétrine-1, les récepteurs DCC dont la liaison avec la Nétrine-1 est insatisfaite, activeraient la cascade de caspases et plus particulièrement la caspase-3. L'activation de la caspase-3 pourrait alors participer au remodelage du cytosquelette, notamment induire une rétraction des filopodes à l'opposé de la source de Nétrine-1 (figure 30 a). Dans ce modèle, les signalisations classique et

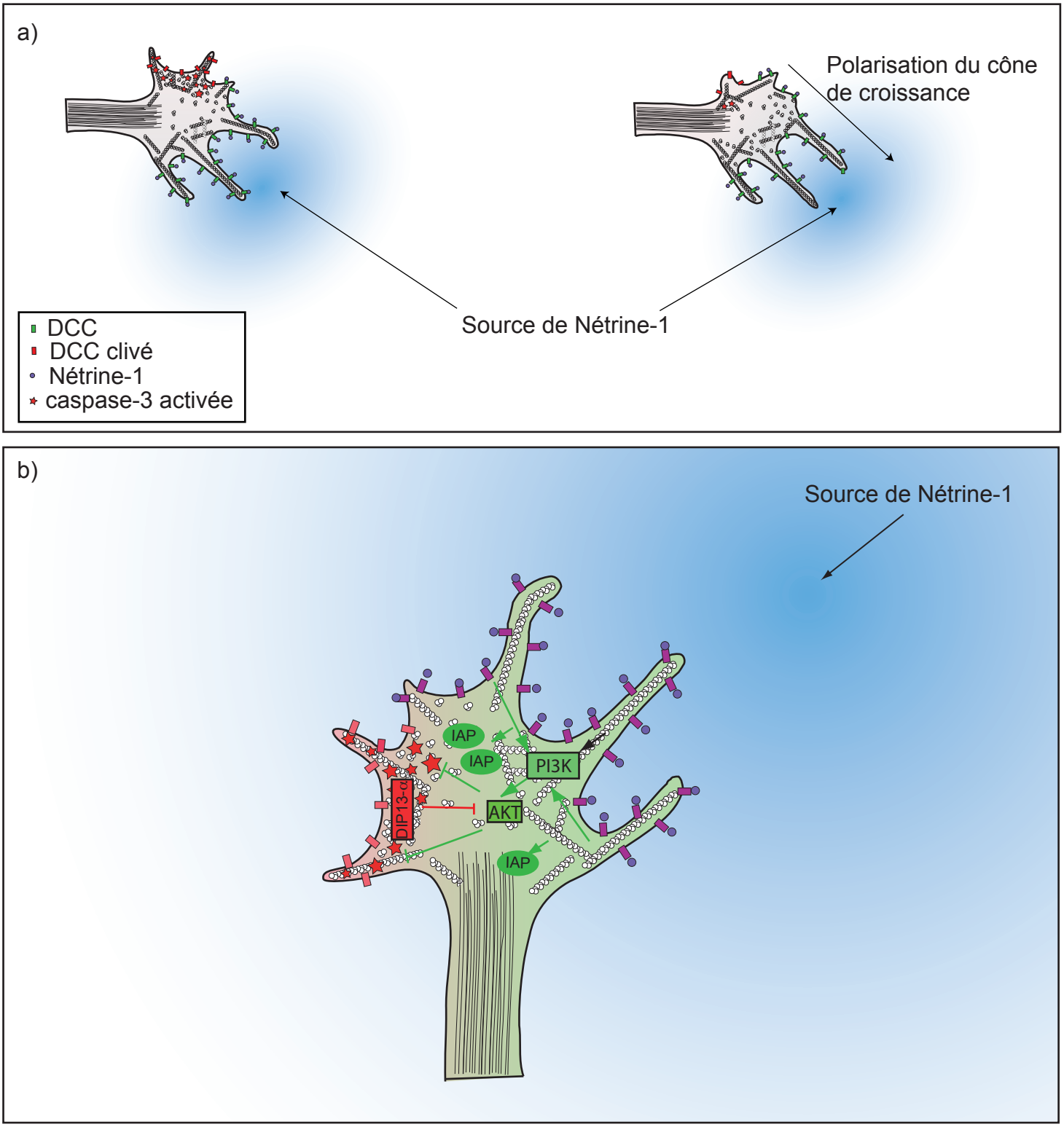


Figure 30 : Contrôle de la polarisation du cône de croissance par la signalisation pro-apoptotique de DCC.
(a) Une distribution hétérogène de Nétrine-1 sur le cône de croissance conduirait à l'activation locale de la caspase-3 qui dégraderait les filaments d'actine des filopodes et des lamellipodes à l'opposé de la source de Nétrine-1. En revanche, du côté de la source de Nétrine-1, les lamellipodes et les filopodes continueraient leur croissance. La dualité d'action du récepteur DCC favoriserait donc la polarisation du cône de croissance vers la source de Nétrine-1.
(b) Contrôle de l'activation de la caspase-3 par DCC dans le cône de croissance.
Du côté de la source de Nétrine-1, DCC activerait la voie PI3K/AKT qui pourrait inhiber l'activation des caspases. A l'opposé de la source de Nétrine-1, les caspases seraient activées par la signalisation pro-apoptotique de DCC. De plus, DIP13-α préviendrait l'inhibition des caspases en inhibant AKT. De ce fait, les caspases seraient activées localement dans le cône de croissance. Les caspases pourraient ensuite remodeler le cytosquelette, favorisant la polarisation du cône de croissance vers la source de Nétrine-1.

pro-apoptotique de DCC collaboreraient afin de faciliter la polarisation du cône de croissance. Notons d'ailleurs ici qu'on peut aussi appliquer les mêmes hypothèses pour expliquer le fonctionnement du prolongement guide d'un neurone en migration.

En tout cas, notre modèle suggère que l'activation des caspases n'est pas nécessairement associée à l'induction de l'apoptose. En accord avec notre hypothèse, il est clairement admis aujourd'hui que les caspases participent à d'autres processus cellulaires que l'apoptose tels que par exemple l'élagage dendritique(Kuo et al., 2006; Schoenmann et al.; Williams et al., 2006a), et la maturation des plaquettes(De Botton et al., 2002). Au cours de ces différents processus, l'activation des caspases est soit localisée, soit contrôlée de manière à ne jamais aboutir à l'élimination de la cellule. En ce qui concerne l'élagage dendritique, l'activation des caspases a lieu essentiellement au niveau de la ramification, permettant l'élimination de la dendrite (Williams et al., 2006a). De la sorte, l'activation des caspases ne s'étendrait pas au soma. En revanche, pour la maturation des plaquettes, il semble que l'activation des caspases ne soit pas compartimentée, suggérant que des molécules régulent et préviennent l'apoptose induite par les caspases(De Botton et al., 2002).

Ce dernier exemple correspondrait à notre modèle. En effet, le cône de croissance n'étant pas séparé en deux compartiments, on pourrait imaginer dans notre cas, que du côté de la source de Nétrine-1, l'activation de la voie PI3K par le couple DCC/Nétrine-1 activerait la voie AKT (figure 30 b). Cette hypothèse s'appuie ici d'une part sur le fait que l'activation d'AKT par la PI3K est maintenant bien décrite(Franke et al., 1997), et d'autre part sur les travaux montrant que l'activation d'AKT est capable d'inhiber l'activation des caspases -9 et -3. Cette inhibition étant probablement effective suite à des modifications post-traductionnelles de facteurs cytosoliques impliqués dans l'activation de l'apoptose comme BAD (BCL2-associated Agonist of cell Death)(Datta et al., 1997), mais aussi *via* la phosphorylation par AKT de la pro-caspase-9 qui prévient l'activation de cette dernière par le cytochrome C(Cardone et al., 1998; Zhou et al., 2000). En outre, il serait possible que le couple DCC/Nétrine-1 favorise la localisation de protéines inhibitrices de l'apoptose, telles que les IAPs, prévenant ainsi la généralisation de l'activation des caspases ayant lieu de l'autre côté du cône de croissance et que nous allons maintenant décrire.

En effet, la seconde partie de notre hypothèse concerne le côté à l'opposé de la source de Nétrine-1. Ici, l'activation de la cascade des caspases pourrait être favorisée par

l'inhibition potentielle de la voie AKT par DIP13-α, mais aussi par le clivage par les caspases du domaine intracellulaire de DCC. En effet, DCC ne peut plus transduire de signalisation autre que celle menant à l'activation des caspases (figure 30 b). Une fois activée, la caspase-3 pourrait participer au remodelage du cytosquelette. En effet, la caspase-3 clive l'actine, des protéines impliquées dans la nucléation de l'actine comme la gelsoline, ou la MAP tau qui stabilise les microtubules(Fasulo et al., 2000; Geng et al., 1998; Kayalar et al., 1996). Le clivage de ces protéines pourrait favoriser un remaniement du cytosquelette conduisant à une rétractation des filopodes. De la sorte, le cône de croissance serait fortement polarisé en direction de la source de Nétrine-1, puisqu'à son opposé les filopodes serait fortement réduits.

En accord avec notre hypothèse de « contrôle qualité », il a été montré que des inhibiteurs de la caspase-3 abolissent l'attraction médiée par la Nétrine-1(Campbell and Holt, 2003). L'effet obtenu étant le même avec des inhibiteurs de l'ubiquitinylation(Campbell and Holt, 2001), on peut noter que chez la drosophile, l'ubiquitinylation de la protéine DIAP-1 (*Drosophilia* Inhibitor of Apoptosis Protein-1) un inhibiteur des caspases, conduit à l'activation des caspases impliquée dans l'élagage dendritique(Kuo et al., 2006). Il serait alors intéressant de tester si au cours du guidage axonal, la Nétrine-1 contrôle l'ubiquitinylation de protéines inhibitrices des caspases.
Enfin, il serait pertinent de réaliser des expériences de turning assay sur des neurones exprimant DCC-D1290N. En effet, si l'activation de la caspase-3 par DCC est effectivement requise pour leur orientation, alors les cônes de croissance ne présentant que cette forme mutée de DCC, devraient avoir des difficultés pour s'orienter.

Conclusion

Tout au long de cette thèse, j'ai pu m'intéresser aux deux facettes de la Nétrine-1 que sont ses rôles de facteur de guidage axonal et de facteur de survie. Concernant son rôle de facteur de guidage axonal, nous avons démontré que la Nétrine-1 possède un nouveau récepteur, APP qui collabore avec DCC pour stimuler la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1. Le rôle de APP dans l'orientation du cône de croissance est en cours d'étude. D'autre part, nous avons aussi démontré que la Nétrine-1 est un facteur de survie neuronale. Il reste encore à déterminer si cette activité de facteur de survie

pourrait, comme nous le pensons, participer activement au guidage axonal. Ce travail soulève donc certaines questions comme le rôle de APP dans l'activité de facteur de survie de la Nétrine-1, ou encore le rôle des autres récepteurs à la Nétrine-1 appartenant à la famille des DRs. En ce sens, de nombreuses études restent à être réalisées afin de décrypter les rôles des DRs dans le développement du SNC.

Bibliographie

Bibliographie

Ackerman, S.L., Kozak, L.P., Przyborski, S.A., Rund, L.A., Boyer, B.B., and Knowles, B.B. (1997). The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. Nature *386*, 838-842.

Alcantara, S., Ruiz, M., De Castro, F., Soriano, E., and 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*, 1359-1372.

Allen-Baume, V., Segui, B., and Cockcroft, S. (2002). Current thoughts on the phosphatidylinositol transfer protein family. FEBS Lett *531*, 74-80.

Altman, J., and Bayer, S.A. (1984). The development of the rat spinal cord. Adv Anat Embryol Cell Biol *85*, 1-164.

Anderson, R.B., and Holt, C.E. (2002). Expression of UNC-5 in the developing Xenopus visual system. Mech Dev *118*, 157-160.

Andrianantoandro, E., and Pollard, T.D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. Mol Cell *24*, 13-23.

Arakawa, T., Iwashita, M., Matsuzaki, F., Suzuki, T., and Yamamoto, T. (2008). Paths, elongation, and projections of ascending chick embryonic spinal commissural neurons after crossing the floor plate. Brain Res *1223*, 25-33.

Augsburger, A., Schuchardt, A., Hoskins, S., Dodd, J., and Butler, S. (1999). BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. Neuron *24*, 127-141.

Avraham, O., Hadas, Y., Vald, L., Zisman, S., Schejter, A., Visel, A., and Klar, A. (2009). Transcriptional control of axonal guidance and sorting in dorsal interneurons by the Lim-HD proteins Lhx9 and Lhx1. Neural Dev *4*, 21.

Bai, G., Chivatakarn, O., Bonanomi, D., Lettieri, K., Franco, L., Xia, C., Stein, E., Ma, L., Lewcock, J.W., and Pfaff, S.L. (2011

). Presenilin-dependent receptor processing is required for axon guidance. Cell *144*, 106-118.

Banyai, L., and Patthy, L. (1999). The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. Protein Sci *8*, 1636-1642.

Barallobre, M.J., Del Rio, J.A., Alcantara, S., Borrell, V., Aguado, F., Ruiz, M., Carmona, M.A., Martin, M., Fabre, M., Yuste, R., *et al.* (2000). Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in netrin 1-deficient mice. Development *127*, 4797-4810.

Barallobre, M.J., Pascual, M., Del Rio, J.A., and Soriano, E. (2005). The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. Brain Res Brain Res Rev *49*, 22-47.

Barmack, N.H. (2006). Inferior olive and oculomotor system. Prog Brain Res *151*, 269-291.

Bartoe, J.L., McKenna, W.L., Quan, T.K., Stafford, B.K., Moore, J.A., Xia, J., Takamiya, K., Huganir, R.L., and Hinck, L. (2006). Protein interacting with C-kinase 1/protein kinase Calpha-mediated endocytosis converts netrin-1-mediated repulsion to attraction. J Neurosci *26*, 3192-3205.

Bennett, K.L., Bradshaw, J., Youngman, T., Rodgers, J., Greenfield, B., Aruffo, A., and Linsley, P.S. (1997). Deleted in colorectal carcinoma (DCC) binds heparin via its fifth fibronectin type III domain. J Biol Chem *272*, 26940-26946.

Bernet, A., Mazelin, L., Coissieux, M.M., Gadot, N., Ackerman, S.L., Scoazec, J.Y., and Mehlen, P. (2007). Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. Gastroenterology *133*, 1840-1848.

Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. Neuron *21*, 13-26.

Beyreuther, K., Bush, A.I., Dyrks, T., Hilbich, C., Konig, G., Monning, U., Multhaup, G., Prior, R., Rumble, B., Schubert, W.*, et al.* (1991). Mechanisms of amyloid deposition in Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci *640*, 129-139.

Blaschke, A.J., Weiner, J.A., and Chun, J. (1998). Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system. J Comp Neurol *396*, 39-50.

Bloch-Gallego, E., Ezan, F., Tessier-Lavigne, M., and Sotelo, C. (1999). Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. J Neurosci *19*, 4407-4420.

Bokoch, G.M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. Annu Rev Biochem *72*, 743-781.

Bonnin, A., Torii, M., Wang, L., Rakic, P., and Levitt, P. (2007). Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. Nat Neurosci *10*, 588-597.

Bordeaux, M.C., Forcet, C., Granger, L., Corset, V., Bidaud, C., Billaud, M., Bredesen, D.E., Edery, P., and Mehlen, P. (2000). The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. EMBO J *19*, 4056-4063.

Bouchard, J.F., Moore, S.W., Tritsch, N.X., Roux, P.P., Shekarabi, M., Barker, P.A., and Kennedy, T.E. (2004). Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an intracellular pool: A novel mechanism regulating commissural axon extension. J Neurosci *24*, 3040-3050.

Boucher, J., Macotela, Y., Bezy, O., Mori, M.A., Kriauciunas, K., and Kahn, C.R. (2010). A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis. Sci Signal *3*, ra87.

Bourikas, D., Pekarik, V., Baeriswyl, T., Grunditz, A., Sadhu, R., Nardo, M., and Stoeckli, E.T. (2005). Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. Nat Neurosci *8*, 297-304.

Boya, P., and de la Rosa, E.J. (2005). Cell death in early neural life. Birth Defects Res C Embryo Today *75*, 281-293.

Braisted, J.E., Catalano, S.M., Stimac, R., Kennedy, T.E., Tessier-Lavigne, M., Shatz, C.J., and O'Leary, D.D. (2000). Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. J Neurosci *20*, 5792-5801.

Brankatschk, M., and Dickson, B.J. (2006). Netrins guide Drosophila commissural axons at short range. Nat Neurosci *9*, 188-194.

Briancon-Marjollet, A., Ghogha, A., Nawabi, H., Triki, I., Auziol, C., Fromont, S., Piche, C., Enslen, H., Chebli, K., Cloutier, J.F.*, et al.* (2008). Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. Mol Cell Biol *28*, 2314-2323.

Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. Cell *96*, 795-806.

Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz, A., and Holt, C. (2005). The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. Nature *438*, 94-98.

Buck, K.B., and Zheng, J.Q. (2002). Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. J Neurosci *22*, 9358-9367.

Butler, S.J., and Dodd, J. (2003). A role for BMP heterodimers in roof plate-mediated repulsion of commissural axons. Neuron *38*, 389-401.

Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., and Black, R.A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. J Biol Chem *273*, 27765-27767.

Campbell, D.S., and Holt, C.E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. Neuron *32*, 1013-1026.

Campbell, D.S., and Holt, C.E. (2003). Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. Neuron *37*, 939-952.

Cao, X., and Sudhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. Science *293*, 115-120.

Cao, X., and Sudhof, T.C. (2004). Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. J Biol Chem *279*, 24601-24611.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science *282*, 1318-1321.

Castets, M., Coissieux, M.M., Delloye-Bourgeois, C., Bernard, L., Delcros, J.G., Bernet, A., Laudet, V., and Mehlen, P. (2009). Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis. Dev Cell *16*, 614-620.

Causeret, F., Danne, F., Ezan, F., Sotelo, C., and Bloch-Gallego, E. (2002). Slit antagonizes netrin-1 attractive effects during the migration of inferior olivary neurons. Dev Biol *246*, 429-440.

Causeret, F., Hidalgo-Sanchez, M., Fort, P., Backer, S., Popoff, M.R., Gauthier-Rouviere, C., and Bloch-Gallego, E. (2004). Distinct roles of Rac1/Cdc42 and Rho/Rock for axon outgrowth and nucleokinesis of precerebellar neurons toward netrin 1. Development *131*, 2841-2852.

Chan, S.S., Zheng, H., Su, M.W., Wilk, R., Killeen, M.T., Hedgecock, E.M., and Culotti, J.G. (1996). UNC-40, a C. elegans homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. Cell *87*, 187-195.

Chang, C., Adler, C.E., Krause, M., Clark, S.G., Gertler, F.B., Tessier-Lavigne, M., and Bargmann, C.I. (2006). MIG-10/lamellipodin and AGE-1/PI3K promote axon guidance and outgrowth in response to slit and netrin. Curr Biol *16*, 854-862.

Chang, C., Yu, T.W., Bargmann, C.I., and Tessier-Lavigne, M. (2004). Inhibition of netrin-mediated axon attraction by a receptor protein tyrosine phosphatase. Science *305*, 103-106.

Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A.P., and Tessier-Lavigne, M. (2003). The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. Cell *113*, 11-23.

Chen, B.E., Kondo, M., Garnier, A., Watson, F.L., Puettmann-Holgado, R., Lamar, D.R., and Schmucker, D. (2006). The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in Drosophila. Cell *125*, 607-620.

Chen, Y.Y., Hehr, C.L., Atkinson-Leadbeater, K., Hocking, J.C., and McFarlane, S. (2007). Targeting of retinal axons requires the metalloproteinase ADAM10. J Neurosci *27*, 8448-8456.

Chien, C.B., Rosenthal, D.E., Harris, W.A., and Holt, C.E. (1993). Navigational errors made by growth cones without filopodia in the embryonic Xenopus brain. Neuron *11*, 237-251.

Chilton, J.K. (2006). Molecular mechanisms of axon guidance. Dev Biol *292*, 13-24.

Cho, K.R., Oliner, J.D., Simons, J.W., Hedrick, L., Fearon, E.R., Preisinger, A.C., Hedge, P., Silverman, G.A., and Vogelstein, B. (1994). The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. Genomics *19*, 525-531.

Choo, Q.L., and Bray, D. (1978). Two forms of neuronal actin. J Neurochem *31*, 217-224.

Cohen, G.M., Sun, X.M., Fearnhead, H., MacFarlane, M., Brown, D.G., Snowden, R.T., and Dinsdale, D. (1994). Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. J Immunol *153*, 507-516.

Cohen, S., and Levi-Montalcini, R. (1957). Purification and properties of a nerve growth-promoting factor isolated from mouse sarcoma 180. Cancer Res *17*, 15-20.

Colamarino, S.A., and Tessier-Lavigne, M. (1995a). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. Cell *81*, 621-629.

Colamarino, S.A., and Tessier-Lavigne, M. (1995b). The role of the floor plate in axon guidance. Annu Rev Neurosci *18*, 497-529.

Coleman, H.A., Labrador, J.P., Chance, R.K., and Bashaw, G.J. (2010). The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. Development *137*, 2417-2426.

Colon-Ramos, D.A., Margeta, M.A., and Shen, K. (2007). Glia promote local synaptogenesis through UNC-6 (netrin) signaling in C. elegans. Science *318*, 103-106.

Copanaki, E., Chang, S., Vlachos, A., Tschape, J.A., Muller, U.C., Kogel, D., and Deller, T. (2010). sAPPalpha antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. Mol Cell Neurosci *44*, 386-393.

Corset, V., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Forcet, C., Moyse, E., Chedotal, A., and Mehlen, P. (2000). Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. Nature *407*, 747-750.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell *91*, 231-241.

De Botton, S., Sabri, S., Daugas, E., Zermati, Y., Guidotti, J.E., Hermine, O., Kroemer, G., Vainchenker, W., and Debili, N. (2002). Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. Blood *100*, 1310-1317.

de la Rosa, E.J., and de Pablo, F. (2000). Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. Trends Neurosci *23*, 454-458.

de la Torre, J.R., Hopker, V.H., Ming, G.L., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., Hemmati-Brivanlou, A., and Holt, C.E. (1997). Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. Neuron *19*, 1211-1224.

Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., and Sretavan, D.W. (1997). Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. Neuron *19*, 575-589.

Deiner, M.S., and Sretavan, D.W. (1999). Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin-1- and DCC-deficient mice. J Neurosci *19*, 9900-9912.

del Rio, G., Kane, D.J., Ball, K.D., and Bredesen, D.E. (2007). A novel motif identified in dependence receptors. PLoS One *2*, e463.

Del Rio, J.A., Gonzalez-Billault, C., Urena, J.M., Jimenez, E.M., Barallobre, M.J., Pascual, M., Pujadas, L., Simo, S., La Torre, A., Wandosell, F.*, et al.* (2004). MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. Curr Biol *14*, 840-850.

Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.M., Guenebeaud, C., Pedeux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., and Bernet, A. (2009a). Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. J Natl Cancer Inst *101*, 237-247.

Delloye-Bourgeois, C., Fitamant, J., Paradisi, A., Cappellen, D., Douc-Rasy, S., Raquin, M.A., Stupack, D., Nakagawara, A., Rousseau, R., Combaret, V.*, et al.* (2009b). Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. J Exp Med *206*, 833-847.

Dent, E.W., Barnes, A.M., Tang, F., and Kalil, K. (2004). Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. J Neurosci *24*, 3002-3012.

Dent, E.W., and Gertler, F.B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. Neuron *40*, 209-227.

Di Meglio, T., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., and Chedotal, A. (2008). Molecular mechanisms controlling midline crossing by precerebellar neurons. J Neurosci *28*, 6285-6294.

Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. Science *298*, 1959-1964.

Dillon, A.K., Fujita, S.C., Matise, M.P., Jarjour, A.A., Kennedy, T.E., Kollmus, H., Arnold, H.H., Weiner, J.A., Sanes, J.R., and Kaprielian, Z. (2005). Molecular control of spinal accessory motor neuron/axon development in the mouse spinal cord. J Neurosci *25*, 10119-10130.

Dillon, A.K., Jevince, A.R., Hinck, L., Ackerman, S.L., Lu, X., Tessier-Lavigne, M., and Kaprielian, Z. (2007). UNC5C is required for spinal accessory motor neuron development. Mol Cell Neurosci *35*, 482-489.

Dodd, J., Morton, S.B., Karagogeos, D., Yamamoto, M., and Jessell, T.M. (1988). Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. Neuron *1*, 105-116.

Domanitskaya, E., Wacker, A., Mauti, O., Baeriswyl, T., Esteve, P., Bovolenta, P., and Stoeckli, E.T. (2010). Sonic hedgehog guides post-crossing commissural axons both directly and indirectly by regulating Wnt activity. J Neurosci *30*, 11167-11176.

Dorsten, J.N., Kolodziej, P.A., and VanBerkum, M.F. (2007). Frazzled regulation of myosin II activity in the Drosophila embryonic CNS. Dev Biol *308*, 120-132.

Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M., and Bonhoeffer, F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. Cell *82*, 359-370.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem *68*, 383-424.

Eccles, J.C., Llinas, R., and Sasaki, K. (1966). The excitatory synaptic action of climbing fibres on the purinje cells of the cerebellum. J Physiol *182*, 268-296.

Eide, A.L., Glover, J., Kjaerulff, O., and Kiehn, O. (1999). Characterization of commissural interneurons in the lumbar region of the neonatal rat spinal cord. J Comp Neurol *403*, 332-345.

Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Propp, S.S., Ellerby, H.M., Rabizadeh, S., Cashman, N.R., Trifiro, M.A., Pinsky, L., Wellington, C.L., Salvesen, G.S.*, et al.* (1999). Kennedy's disease:

caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. J Neurochem *72*, 185-195.

Ellezam, B., Selles-Navarro, I., Manitt, C., Kennedy, T.E., and McKerracher, L. (2001). Expression of netrin-1 and its receptors DCC and UNC-5H2 after axotomy and during regeneration of adult rat retinal ganglion cells. Exp Neurol *168*, 105-115.

Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. Cell *44*, 817-829.

Engelkamp, D. (2002). Cloning of three mouse Unc5 genes and their expression patterns at mid-gestation. Mech Dev *118*, 191-197.

Ernfors, P., Lee, K.F., and Jaenisch, R. (1994). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. Nature *368*, 147-150.

Ethell, D.W., and Buhler, L.A. (2003). Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. J Clin Immunol *23*, 439-446.

Evans, A.R., Euteneuer, S., Chavez, E., Mullen, L.M., Hui, E.E., Bhatia, S.N., and Ryan, A.F. (2007). Laminin and fibronectin modulate inner ear spiral ganglion neurite outgrowth in an in vitro alternate choice assay. Dev Neurobiol *67*, 1721-1730.

Eyer, J., and Peterson, A. (1994). Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. Neuron *12*, 389-405.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., and Henson, P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. Nature *405*, 85-90.

Fambrough, D., Pan, D., Rubin, G.M., and Goodman, C.S. (1996). The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 13233-13238.

Fasulo, L., Ugolini, G., Visintin, M., Bradbury, A., Brancolini, C., Verzillo, V., Novak, M., and Cattaneo, A. (2000). The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. J Neurochem *75*, 624-633.

Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R.V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H.*, et al.* (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. Nature *386*, 796-804.

Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., Kinzler, K.W.*, et al.* (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science *247*, 49-56.

Felsenfeld, D.P., Hynes, M.A., Skoler, K.M., Furley, A.J., and Jessell, T.M. (1994). TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and beta 1 integrins. Neuron *12*, 675-690.

Feoktistov, I., and Biaggioni, I. (1997). Adenosine A2B receptors. Pharmacol Rev *49*, 381-402.

Finger, J.H., Bronson, R.T., Harris, B., Johnson, K., Przyborski, S.A., and Ackerman, S.L. (2002). The netrin 1 receptors Unc5h3 and Dcc are necessary at multiple choice points for the guidance of corticospinal tract axons. J Neurosci *22*, 10346-10356.

Fisher, S., Gearhart, J.D., and Oster-Granite, M.L. (1991). Expression of the amyloid precursor protein gene in mouse oocytes and embryos. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 1779-1782.

Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M.M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J.Y., Bachelot, T., Bernet, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 4850-4855.

Forcet, C., Stein, E., Pays, L., Corset, V., Llambi, F., Tessier-Lavigne, M., and Mehlen, P. (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. Nature *417*, 443-447.

Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D.E., and Mehlen, P. (2001). The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 3416-3421.

Forsthoefel, D.J., Liebl, E.C., Kolodziej, P.A., and Seeger, M.A. (2005). The Abelson tyrosine kinase, the Trio GEF and Enabled interact with the Netrin receptor Frazzled in Drosophila. Development *132*, 1983-1994.

Frank, K.M., Sharpless, N.E., Gao, Y., Sekiguchi, J.M., Ferguson, D.O., Zhu, C., Manis, J.P., Horner, J., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. Mol Cell *5*, 993-1002.

Franke, T.F., Kaplan, D.R., and Cantley, L.C. (1997). PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. Cell *88*, 435-437.

French, L.E., and Tschopp, J. (2003). Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. Cell Death Differ *10*, 117-123.

Friedman, W.J., and Greene, L.A. (1999). Neurotrophin signaling via Trks and p75. Exp Cell Res *253*, 131-142.

Fuerst, P.G., Bruce, F., Tian, M., Wei, W., Elstrott, J., Feller, M.B., Erskine, L., Singer, J.H., and Burgess, R.W. (2009). DSCAM and DSCAML1 function in self-avoidance in multiple cell types in the developing mouse retina. Neuron *64*, 484-497.

Fuerst, P.G., Koizumi, A., Masland, R.H., and Burgess, R.W. (2008). Neurite arborization and mosaic spacing in the mouse retina require DSCAM. Nature *451*, 470-474.

Fukamauchi, F., Aihara, O., Wang, Y.J., Akasaka, K., Takeda, Y., Horie, M., Kawano, H., Sudo, K., Asano, M., Watanabe, K.*, et al.* (2001). TAG-1-deficient mice have marked elevation of adenosine A1 receptors in the hippocampus. Biochem Biophys Res Commun *281*, 220-226.

Furne, C., Corset, V., Herincs, Z., Cahuzac, N., Hueber, A.O., and Mehlen, P. (2006). The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 4128-4133.

Furne, C., Rama, N., Corset, V., Chedotal, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 14465-14470.

Furne, C., Ricard, J., Cabrera, J.R., Pays, L., Bethea, J.R., Mehlen, P., and Liebl, D.J. (2009). EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis. Biochim Biophys Acta *1793*, 231-238.

Gad, J.M., Keeling, S.L., Shu, T., Richards, L.J., and Cooper, H.M. (2000). The spatial and temporal expression patterns of netrin receptors, DCC and neogenin, in the developing mouse retina. Exp Eye Res *70*, 711-722.

Gad, J.M., Keeling, S.L., Wilks, A.F., Tan, S.S., and Cooper, H.M. (1997). The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis. Dev Biol *192*, 258-273.

Gan, W.B., Wong, V.Y., Phillips, A., Ma, C., Gershon, T.R., and Macagno, E.R. (1999). Cellular expression of a leech netrin suggests roles in the formation of longitudinal nerve tracts and in regional innervation of peripheral targets. J Neurobiol *40*, 103-115.

Garbe, D.S., O'Donnell, M., and Bashaw, G.J. (2007). Cytoplasmic domain requirements for Frazzled-mediated attractive axon turning at the Drosophila midline. Development *134*, 4325-4334.

Garcia, M.C., Abbasi, M., Singh, S., and He, Q. (2007). Role of Drosophila gene dunc-115 in nervous system. Invert Neurosci *7*, 119-128.

Geisbrecht, B.V., Dowd, K.A., Barfield, R.W., Longo, P.A., and Leahy, D.J. (2003). Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. J Biol Chem *278*, 32561-32568.

Geng, Y.J., Azuma, T., Tang, J.X., Hartwig, J.H., Muszynski, M., Wu, Q., Libby, P., and Kwiatkowski, D.J. (1998). Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. Eur J Cell Biol *77*, 294-302.

Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S.*, et al.* (1999). Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. Cell *97*, 395-406.

Giam, M., Huang, D.C., and Bouillet, P. (2008). BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. Oncogene *27 Suppl 1*, S128-136.

Gilthorpe, J.D., Papantoniou, E.K., Chedotal, A., Lumsden, A., and Wingate, R.J. (2002). The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. Development *129*, 4719-4728.

Gitai, Z., Yu, T.W., Lundquist, E.A., Tessier-Lavigne, M., and Bargmann, C.I. (2003). The netrin receptor UNC-40/DCC stimulates axon attraction and outgrowth through enabled and, in parallel, Rac and UNC-115/AbLIM. Neuron *37*, 53-65.

Glücksmann, A. (1951). Cell death in normal vertebrate ontogeny. Biol Rev *26*, 59-86.

Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U., and Gajdusek, D.C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. Science *235*, 877-880.

Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. Oncogene *29*, 1865-1882.

Gore, B.B., Wong, K.G., and Tessier-Lavigne, M. (2008). Stem cell factor functions as an outgrowth-promoting factor to enable axon exit from the midline intermediate target. Neuron *57*, 501-510.

Goulding, M., Lanuza, G., Sapir, T., and Narayan, S. (2002). The formation of sensorimotor circuits. Curr Opin Neurobiol *12*, 508-515.

Govek, E.E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. Genes Dev *19*, 1-49.

Graef, I.A., Wang, F., Charron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M., and Crabtree, G.R. (2003). Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. Cell *113*, 657-670.

Grant, A., Hoops, D., Labelle-Dumais, C., Prevost, M., Rajabi, H., Kolb, B., Stewart, J., Arvanitogiannis, A., and Flores, C. (2007). Netrin-1 receptor-deficient mice show enhanced mesocortical dopamine transmission and blunted behavioural responses to amphetamine. Eur J Neurosci *26*, 3215-3228.

Green, D.R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. Cell *121*, 671-674.

Greenhalgh, D.G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. Int J Biochem Cell Biol *30*, 1019-1030.

Grillner, S. (2003). The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. Nat Rev Neurosci *4*, 573-586.

Guijarro, P., Simo, S., Pascual, M., Abasolo, I., Del Rio, J.A., and Soriano, E. (2006). Netrin1 exerts a chemorepulsive effect on migrating cerebellar interneurons in a Dcc-independent way. Mol Cell Neurosci *33*, 389-400.

Guirland, C., Suzuki, S., Kojima, M., Lu, B., and Zheng, J.Q. (2004). Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. Neuron *42*, 51-62.

Gundersen, R.W., and Barrett, J.N. (1979). Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. Science *206*, 1079-1080.

Hamasaki, T., Goto, S., Nishikawa, S., and Ushio, Y. (2001). A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons. J Neurosci *21*, 4272-4280.

Hamelin, M., Zhou, Y., Su, M.W., Scott, I.M., and Culotti, J.G. (1993). Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of C. elegans steers their axons dorsally. Nature *364*, 327-330.

Harris, R., Sabatelli, L.M., and Seeger, M.A. (1996). Guidance cues at the Drosophila CNS midline: identification and characterization of two Drosophila Netrin/UNC-6 homologs. Neuron *17*, 217-228.

Hattori, D., Millard, S.S., Wojtowicz, W.M., and Zipursky, S.L. (2008). Dscam-mediated cell recognition regulates neural circuit formation. Annu Rev Cell Dev Biol *24*, 597-620.

Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Flavell, R.A., and Rakic, P. (1999). The role of cell death in regulating the size and shape of the mammalian forebrain. Cereb Cortex *9*, 621-626.

Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., and Hall, D.H. (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in C. elegans. Neuron *4*, 61-85.

Hehr, C.L., Hocking, J.C., and McFarlane, S. (2005). Matrix metalloproteinases are required for retinal ganglion cell axon guidance at select decision points. Development *132*, 3371-3379.

Helms, A.W., and Johnson, J.E. (1998). Progenitors of dorsal commissural interneurons are defined by MATH1 expression. Development *125*, 919-928.

Hendry, I.A., and Campbell, J. (1976). Morphometric analysis of rat superior cervical ganglion after axotomy and nerve growth factor treatment. J Neurocytol *5*, 351-360.

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. Nature *407*, 770-776.

Hengst, U., Deglincerti, A., Kim, H.J., Jeon, N.L., and Jaffrey, S.R. (2009). Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein. Nat Cell Biol *11*, 1024-1030.

Hensey, C., and Gautier, J. (1998). Programmed cell death during Xenopus development: a spatio-temporal analysis. Dev Biol *203*, 36-48.

Herincs, Z., Corset, V., Cahuzac, N., Furne, C., Castellani, V., Hueber, A.O., and Mehlen, P. (2005). DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. J Cell Sci *118*, 1687-1692.

Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretzschmar, H., Sisodia, S., and Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. EMBO J *23*, 4106-4115.

Hiramoto, M., Hiromi, Y., Giniger, E., and Hotta, Y. (2000). The Drosophila Netrin receptor Frazzled guides axons by controlling Netrin distribution. Nature *406*, 886-889.

Hofmann, C., Shepelev, M., and Chernoff, J. (2004). The genetics of Pak. J Cell Sci *117*, 4343-4354.

Homma, S., Yaginuma, H., and Oppenheim, R.W. (1994). Programmed cell death during the earliest stages of spinal cord development in the chick embryo: a possible means of early phenotypic selection. J Comp Neurol *345*, 377-395.

Honarpour, N., Du, C., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Wang, X., and Herz, J. (2000). Adult Apaf-1-deficient mice exhibit male infertility. Dev Biol *218*, 248-258.

Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. Cell *97*, 927-941.

Hong, K., Nishiyama, M., Henley, J., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M. (2000). Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. Nature *403*, 93-98.

Hopker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., and Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. Nature *401*, 69-73.

Horvath, T.L. (2005). The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. Nat Neurosci *8*, 561-565.

Houle, F., Rousseau, S., Morrice, N., Luc, M., Mongrain, S., Turner, C.E., Tanaka, S., Moreau, P., and Huot, J. (2003). Extracellular signal-regulated kinase mediates phosphorylation of tropomyosin-1 to promote cytoskeleton remodeling in response to oxidative stress: impact on membrane blebbing. Mol Biol Cell *14*, 1418-1432.

Hu, G., Zhang, S., Vidal, M., Baer, J.L., Xu, T., and Fearon, E.R. (1997). Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. Genes Dev *11*, 2701-2714.

Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. Annu Rev Biochem *72*, 609-642.

Huang, X., Cheng, H.J., Tessier-Lavigne, M., and Jin, Y. (2002). MAX-1, a novel PH/MyTH4/FERM domain cytoplasmic protein implicated in netrin-mediated axon repulsion. Neuron *34*, 563-576.

Huang, Z. (2009). Molecular regulation of neuronal migration during neocortical development. Mol Cell Neurosci *42*, 11-22.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell *69*, 11-25.

Imondi, R., and Kaprielian, Z. (2001). Commissural axon pathfinding on the contralateral side of the floor plate: a role for B-class ephrins in specifying the dorsoventral position of longitudinally projecting commissural axons. Development *128*, 4859-4871.

Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., and Hedgecock, E.M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in C. elegans. Neuron *9*, 873-881.

Jarjour, A.A., Bull, S.J., Almasieh, M., Rajasekharan, S., Baker, K.A., Mui, J., Antel, J.P., Di Polo, A., and Kennedy, T.E. (2008). Maintenance of axo-oligodendroglial paranodal junctions requires DCC and netrin-1. J Neurosci *28*, 11003-11014.

Jarjour, A.A., Manitt, C., Moore, S.W., Thompson, K.M., Yuh, S.J., and Kennedy, T.E. (2003). Netrin-1 is a chemorepellent for oligodendrocyte precursor cells in the embryonic spinal cord. J Neurosci *23*, 3735-3744.

Jaworski, A., Long, H., and Tessier-Lavigne, M. (2010). Collaborative and specialized functions of Robo1 and Robo2 in spinal commissural axon guidance. J Neurosci *30*, 9445-9453.

Jessell, T.M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. Nat Rev Genet *1*, 20-29.

Jiang, Y., Liu, M.T., and Gershon, M.D. (2003). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. Dev Biol *258*, 364-384.

Jin, M., Guan, C.B., Jiang, Y.A., Chen, G., Zhao, C.T., Cui, K., Song, Y.Q., Wu, C.P., Poo, M.M., and Yuan, X.B. (2005). Ca2+-dependent regulation of rho GTPases triggers turning of nerve growth cones. J Neurosci *25*, 2338-2347.

Johnson, E.M., Jr., Gorin, P.D., Brandeis, L.D., and Pearson, J. (1980). Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor. Science *210*, 916-918.

Kadison, S.R., Makinen, T., Klein, R., Henkemeyer, M., and Kaprielian, Z. (2006). EphB receptors and ephrin-B3 regulate axon guidance at the ventral midline of the embryonic mouse spinal cord. J Neurosci *26*, 8909-8914.

Kajta, M. (2004). Apoptosis in the central nervous system: Mechanisms and protective strategies. Pol J Pharmacol *56*, 689-700.

Kano, M., Hashimoto, K., Chen, C., Abeliovich, A., Aiba, A., Kurihara, H., Watanabe, M., Inoue, Y., and Tonegawa, S. (1995). Impaired synapse elimination during cerebellar development in PKC gamma mutant mice. Cell *83*, 1223-1231.

Kappler, J., Franken, S., Junghans, U., Hoffmann, R., Linke, T., Muller, H.W., and Koch, K.W. (2000). Glycosaminoglycan-binding properties and secondary structure of the C-terminus of netrin-1. Biochem Biophys Res Commun *271*, 287-291.

Kawasaki, T., Ito, K., and Hirata, T. (2006). Netrin 1 regulates ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. Development *133*, 845-853.

Kayalar, C., Ord, T., Testa, M.P., Zhong, L.T., and Bredesen, D.E. (1996). Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 2234-2238.

Keeling, S.L., Gad, J.M., and Cooper, H.M. (1997). Mouse Neogenin, a DCC-like molecule, has four splice variants and is expressed widely in the adult mouse and during embryogenesis. Oncogene *15*, 691-700.

Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. Cell *87*, 175-185.

Keleman, K., and Dickson, B.J. (2001). Short- and long-range repulsion by the Drosophila Unc5 netrin receptor. Neuron *32*, 605-617.

Keleman, K., Ribeiro, C., and Dickson, B.J. (2005). Comm function in commissural axon guidance: cell-autonomous sorting of Robo in vivo. Nat Neurosci *8*, 156-163.

Kennedy, T.E., Serafini, T., de la Torre, J.R., and Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. Cell *78*, 425-435.

Kennedy, T.E., Wang, H., Marshall, W., and Tessier-Lavigne, M. (2006). Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord. J Neurosci *26*, 8866-8874.

Kerr, J.F., Winterford, C.M., and Harmon, B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer *73*, 2013-2026.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer *26*, 239-257.

Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in Drosophila. Cell *96*, 785-794.

Killeen, M., Tong, J., Krizus, A., Steven, R., Scott, I., Pawson, T., and Culotti, J. (2002). UNC-5 function requires phosphorylation of cytoplasmic tyrosine 482, but its UNC-40-independent functions also require a region between the ZU-5 and death domains. Dev Biol *251*, 348-366.

Kim, T.H., Lee, H.K., Seo, I.A., Bae, H.R., Suh, D.J., Wu, J., Rao, Y., Hwang, K.G., and Park, H.T. (2005). Netrin induces down-regulation of its receptor, Deleted in Colorectal Cancer, through the ubiquitin-proteasome pathway in the embryonic cortical neuron. J Neurochem *95*, 1-8.

Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 6382-6387.

Kjaerulff, O., and Kiehn, O. (1997). Crossed rhythmic synaptic input to motoneurons during selective activation of the contralateral spinal locomotor network. J Neurosci *17*, 9433-9447.

Klein, R., Smeyne, R.J., Wurst, W., Long, L.K., Auerbach, B.A., Joyner, A.L., and Barbacid, M. (1993). Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. Cell *75*, 113-122.

Kolodziej, P.A., Timpe, L.C., Mitchell, K.J., Fried, S.R., Goodman, C.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. Cell *87*, 197-204.

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Koths, K., Kwiatkowski, D.J.*, et al.* (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science *278*, 294-298.

Kruger, R.P., Lee, J., Li, W., and Guan, K.L. (2004). Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation. J Neurosci *24*, 10826-10834.

Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. Cell *94*, 325-337.

Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature *384*, 368-372.

Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. Cell Death Differ *14*, 32-43.

Kuo, C.T., Zhu, S., Younger, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2006). Identification of E2/E3 ubiquitinating enzymes and caspase activity regulating Drosophila sensory neuron dendrite pruning. Neuron *51*, 283-290.

Lavrik, I., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Death receptor signaling. J Cell Sci *118*, 265-267.

Lebrand, C., Dent, E.W., Strasser, G.A., Lanier, L.M., Krause, M., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., and Gertler, F.B. (2004). Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. Neuron *42*, 37-49.

Lee, A.C., and Suter, D.M. (2008). Quantitative analysis of microtubule dynamics during adhesion-mediated growth cone guidance. Dev Neurobiol *68*, 1363-1377.

Lee, J., Li, W., and Guan, K.L. (2005). SRC-1 mediates UNC-5 signaling in Caenorhabditis elegans. Mol Cell Biol *25*, 6485-6495.

Leonardo, E.D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S.L., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Vertebrate homologues of C. elegans UNC-5 are candidate netrin receptors. Nature *386*, 833-838.

Leung, K.M., van Horck, F.P., Lin, A.C., Allison, R., Standart, N., and Holt, C.E. (2006). Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. Nat Neurosci *9*, 1247-1256.

Leung-Hagesteijn, C., Spence, A.M., Stern, B.D., Zhou, Y., Su, M.W., Hedgecock, E.M., and Culotti, J.G. (1992). UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in C. elegans. Cell *71*, 289-299.

Levi-Montalcini, R., and Hamburger, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. J Exp Zool *116*, 321-361.

Levy-Strumpf, N., and Culotti, J.G. (2007). VAB-8, UNC-73 and MIG-2 regulate axon polarity and cell migration functions of UNC-40 in C. elegans. Nat Neurosci *10*, 161-168.

Li, W., Aurandt, J., Jurgensen, C., Rao, Y., and Guan, K.L. (2006). FAK and Src kinases are required for netrin-induced tyrosine phosphorylation of UNC5. J Cell Sci *119*, 47-55.

Li, W., Fan, J., and Woodley, D.T. (2001). Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. Oncogene *20*, 6403-6417.

Li, W., Lee, J., Vikis, H.G., Lee, S.H., Liu, G., Aurandt, J., Shen, T.L., Fearon, E.R., Guan, J.L., Han, M.*, et al.* (2004a). Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. Nat Neurosci *7*, 1213-1221.

Li, W.C., Soffe, S.R., and Roberts, A. (2004b). Dorsal spinal interneurons forming a primitive, cutaneous sensory pathway. J Neurophysiol *92*, 895-904.

Li, X., Gao, X., Liu, G., Xiong, W., Wu, J., and Rao, Y. (2008). Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling. Nat Neurosci *11*, 28-35.

Li, X., Meriane, M., Triki, I., Shekarabi, M., Kennedy, T.E., Larose, L., and Lamarche-Vane, N. (2002a). The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism. J Biol Chem *277*, 37788-37797.

Li, X., Saint-Cyr-Proulx, E., Aktories, K., and Lamarche-Vane, N. (2002b). Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells. J Biol Chem *277*, 15207-15214.

Lim, Y.S., Mallapur, S., Kao, G., Ren, X.C., and Wadsworth, W.G. (1999). Netrin UNC-6 and the regulation of branching and extension of motoneuron axons from the ventral nerve cord of Caenorhabditis elegans. J Neurosci *19*, 7048-7056.

Lin, J.C., Ho, W.H., Gurney, A., and Rosenthal, A. (2003). The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons. Nat Neurosci *6*, 1270-1276.

Liu, G., Beggs, H., Jurgensen, C., Park, H.T., Tang, H., Gorski, J., Jones, K.R., Reichardt, L.F., Wu, J., and Rao, Y. (2004a). Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. Nat Neurosci *7*, 1222-1232.

Liu, G., Li, W., Gao, X., Li, X., Jurgensen, C., Park, H.T., Shin, N.Y., Yu, J., He, M.L., Hanks, S.K.*, et al.* (2007). p130CAS is required for netrin signaling and commissural axon guidance. J Neurosci *27*, 957-968.

Liu, G., Li, W., Wang, L., Kar, A., Guan, K.L., Rao, Y., and Wu, J.Y. (2009). DSCAM functions as a netrin receptor in commissural axon pathfinding. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 2951-2956.

Liu, J., Yao, F., Wu, R., Morgan, M., Thorburn, A., Finley, R.L., Jr., and Chen, Y.Q. (2002). Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. J Biol Chem *277*, 26281-26285.

Liu, Y., Stein, E., Oliver, T., Li, Y., Brunken, W.J., Koch, M., Tessier-Lavigne, M., and Hogan, B.L. (2004b). Novel role for Netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis. Curr Biol *14*, 897-905.

Livesey, F.J., and Hunt, S.P. (1997). Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. Mol Cell Neurosci *8*, 417-429.

Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. EMBO J *20*, 2715-2722.

Long, H., Sabatier, C., Ma, L., Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D.M., Tamada, A., Murakami, F., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (2004). Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. Neuron *42*, 213-223.

Loo, D.T., Copani, A., Pike, C.J., Whittemore, E.R., Walencewicz, A.J., and Cotman, C.W. (1993). Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 7951-7955.

Lourenco, F.C., Galvan, V., Fombonne, J., Corset, V., Llambi, F., Muller, U., Bredesen, D.E., and Mehlen, P. (2009). Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. Cell Death Differ *16*, 655-663.

Lowery, L.A., and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 332-343.

Lu, X., Le Noble, F., Yuan, L., Jiang, Q., De Lafarge, B., Sugiyama, D., Breant, C., Claes, F., De Smet, F., Thomas, J.L.*, et al.* (2004). The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. Nature *432*, 179-186.

Lucanic, M., Kiley, M., Ashcroft, N., L'Etoile, N., and Cheng, H.J. (2006). The Caenorhabditis elegans P21-activated kinases are differentially required for UNC-6/netrin-mediated commissural motor axon guidance. Development *133*, 4549-4559.

Luduena, R.F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. Int Rev Cytol *178*, 207-275.

Lumsden, A.G., and Davies, A.M. (1986). Chemotropic effect of specific target epithelium in the developing mammalian nervous system. Nature *323*, 538-539.

Lund, L.R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M.J., Dano, K., and Werb, Z. (1996). Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. Development *122*, 181-193.

Luo, Y., Raible, D., and Raper, J.A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. Cell *75*, 217-227.

Ly, A., Nikolaev, A., Suresh, G., Zheng, Y., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (2008). DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1. Cell *133*, 1241-1254.

Lyuksyutova, A.I., Lu, C.C., Milanesio, N., King, L.A., Guo, N., Wang, Y., Nathans, J., Tessier-Lavigne, M., and Zou, Y. (2003). Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. Science *302*, 1984-1988.

Ma, Q.H., Futagawa, T., Yang, W.L., Jiang, X.D., Zeng, L., Takeda, Y., Xu, R.X., Bagnard, D., Schachner, M., Furley, A.J.*, et al.* (2008). A TAG1-APP signalling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis. Nat Cell Biol *10*, 283-294.

Ma, W., Shang, Y., Wei, Z., Wen, W., Wang, W., and Zhang, M. (2010). Phosphorylation of DCC by ERK2 is facilitated by direct docking of the receptor P1 domain to the kinase. Structure *18*, 1502-1511.

Madison, R.D., Zomorodi, A., and Robinson, G.A. (2000). Netrin-1 and peripheral nerve regeneration in the adult rat. Exp Neurol *161*, 563-570.

Magara, F., Muller, U., Li, Z.W., Lipp, H.P., Weissmann, C., Stagljar, M., and Wolfer, D.P. (1999). Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 4656-4661.

Maness, P.F., and Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. Nat Neurosci *10*, 19-26.

Manitt, C., Colicos, M.A., Thompson, K.M., Rousselle, E., Peterson, A.C., and Kennedy, T.E. (2001). Widespread expression of netrin-1 by neurons and oligodendrocytes in the adult mammalian spinal cord. J Neurosci *21*, 3911-3922.

Manitt, C., Nikolakopoulou, A.M., Almario, D.R., Nguyen, S.A., and 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*, 11065-11077.

Manitt, C., Thompson, K.M., and Kennedy, T.E. (2004). Developmental shift in expression of netrin receptors in the rat spinal cord: predominance of UNC-5 homologues in adulthood. J Neurosci Res *77*, 690-700.

Marcos, S., Backer, S., Causeret, F., Tessier-Lavigne, M., and Bloch-Gallego, E. (2009). Differential roles of Netrin-1 and its receptor DCC in inferior olivary neuron migration. Mol Cell Neurosci *41*, 429-439.

Marin, N., Romero, B., Bosch-Morell, F., Llansola, M., Felipo, V., Roma, J., and Romero, F.J. (2000). Beta-amyloid-induced activation of caspase-3 in primary cultures of rat neurons. Mech Ageing Dev *119*, 63-67.

Marin, O., Valiente, M., Ge, X., and Tsai, L.H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. Cold Spring Harb Perspect Biol *2*, a001834.

Marsick, B.M., Flynn, K.C., Santiago-Medina, M., Bamburg, J.R., and Letourneau, P.C. (2010). Activation of ADF/cofilin mediates attractive growth cone turning toward nerve growth factor and netrin-1. Dev Neurobiol *70*, 565-588.

Martin, S.J., and Green, D.R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? Cell *82*, 349-352.

Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C., and Green, D.R. (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. J Biol Chem *270*, 6425-6428.

Masuda, T., Watanabe, K., Sakuma, C., Ikenaka, K., Ono, K., and Yaginuma, H. (2008). Netrin-1 acts as a repulsive guidance cue for sensory axonal projections toward the spinal cord. J Neurosci *28*, 10380-10385.

Matsumoto, H., and Nagashima, M. (2010). Netrin-1 elevates the level and induces cluster formation of its receptor DCC at the surface of cortical axon shafts in an exocytosis-dependent manner. Neurosci Res *67*, 99-107.

Matsunaga, E., Tauszig-Delamasure, S., Monnier, P.P., Mueller, B.K., Strittmatter, S.M., Mehlen, P., and Chedotal, A. (2004). RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. Nat Cell Biol *6*, 749-755.

Mattson, M.P., Dou, P., and Kater, S.B. (1988). Outgrowth-regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. J Neurosci *8*, 2087-2100.

Matus, D.Q., Pang, K., Marlow, H., Dunn, C.W., Thomsen, G.H., and Martindale, M.Q. (2006). Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 11195-11200.

Mazelin, L., Bernet, A., Bonod-Bidaud, C., Pays, L., Arnaud, S., Gespach, C., Bredesen, D.E., Scoazec, J.Y., and Mehlen, P. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. Nature *431*, 80-84.

McKenna, W.L., Wong-Staal, C., Kim, G.C., Macias, H., Hinck, L., and Bartoe, J.L. (2008). Netrin-1-independent adenosine A2b receptor activation regulates the response of axons to netrin-1 by controlling cell surface levels of UNC5A receptors. J Neurochem *104*, 1081-1090.

Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: the trophic theory revisited. Sci Signal *3*, pe47.

Mehlen, P., and Furne, C. (2005). Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis. Cell Mol Life Sci *62*, 2599-2616.

Mehlen, P., and Guenebeaud, C. (2009). Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy. Curr Opin Oncol *22*, 46-54.

Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S.J., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Bredesen, D.E. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. Nature *395*, 801-804.

Mehlen, P., and Rama, N. (2007). [Netrin-1 and axonal guidance: signaling and asymmetrical translation]. Med Sci (Paris) *23*, 311-315.

Meriane, M., Tcherkezian, J., Webber, C.A., Danek, E.I., Triki, I., McFarlane, S., Bloch-Gallego, E., and Lamarche-Vane, N. (2004). Phosphorylation of DCC by Fyn mediates Netrin-1 signaling in growth cone guidance. J Cell Biol *167*, 687-698.

Metin, C., Deleglise, D., Serafini, T., Kennedy, T.E., and Tessier-Lavigne, M. (1997). A role for netrin-1 in the guidance of cortical efferents. Development *124*, 5063-5074.

Meyerhardt, J.A., Caca, K., Eckstrand, B.C., Hu, G., Lengauer, C., Banavali, S., Look, A.T., and Fearon, E.R. (1999). Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas. Cell Growth Differ *10*, 35-42.

Meyerhardt, J.A., Look, A.T., Bigner, S.H., and Fearon, E.R. (1997). Identification and characterization of neogenin, a DCC-related gene. Oncogene *14*, 1129-1136.

Mille, F., Llambi, F., Guix, C., Delloye-Bourgeois, C., Guenebeaud, C., Castro-Obregon, S., Bredesen, D.E., Thibert, C., and Mehlen, P. (2009a). Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death. Cell Death Differ *16*, 1344-1351.

Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Rama, N., Guix, C., Hayashi, H., Corset, V., Reed, J.C., and Mehlen, P. (2009b). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. Nat Cell Biol *11*, 739-746.

Milward, E.A., Papadopoulos, R., Fuller, S.J., Moir, R.D., Small, D., Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1992). The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. Neuron *9*, 129-137.

Ming, G., Henley, J., Tessier-Lavigne, M., Song, H., and Poo, M. (2001). Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. Neuron *29*, 441-452.

Ming, G., Song, H., Berninger, B., Inagaki, N., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M. (1999). Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance. Neuron *23*, 139-148.

Ming, G.L., Song, H.J., Berninger, B., Holt, C.E., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M.M. (1997). cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. Neuron *19*, 1225-1235.

Ming, G.L., Wong, S.T., Henley, J., Yuan, X.B., Song, H.J., Spitzer, N.C., and Poo, M.M. (2002). Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. Nature *417*, 411-418.

Minichiello, L., Piehl, F., Vazquez, E., Schimmang, T., Hokfelt, T., Represa, J., and Klein, R. (1995). Differential effects of combined trk receptor mutations on dorsal root ganglion and inner ear sensory neurons. Development *121*, 4067-4075.

Monnier, P.P., Sierra, A., Macchi, P., Deitinghoff, L., Andersen, J.S., Mann, M., Flad, M., Hornberger, M.R., Stahl, B., Bonhoeffer, F.*, et al.* (2002). RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. Nature *419*, 392-395.

Moore, S.W., Correia, J.P., Lai Wing Sun, K., Pool, M., Fournier, A.E., and Kennedy, T.E. (2008a). Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1. Development *135*, 2855-2864.

Moore, S.W., and Kennedy, T.E. (2006). Protein kinase A regulates the sensitivity of spinal commissural axon turning to netrin-1 but does not switch between chemoattraction and chemorepulsion. J Neurosci *26*, 2419-2423.

Moore, S.W., Lai Wing Sun, K., Xie, F., Barker, P.A., Conti, M., and Kennedy, T.E. (2008b). Soluble adenylyl cyclase is not required for axon guidance to netrin-1. J Neurosci *28*, 3920-3924.

Moskowitz, M.A., Lo, E.H., and Iadecola, C. (2010). The science of stroke: mechanisms in search of treatments. Neuron *67*, 181-198.

Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., and et al. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. Science *267*, 1506-1510.

Mourali, J., Benard, A., Lourenco, F.C., Monnet, C., Greenland, C., Moog-Lutz, C., Racaud-Sultan, C., Gonzalez-Dunia, D., Vigny, M., Mehlen, P.*, et al.* (2006). Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. Mol Cell Biol *26*, 6209-6222.

Mrkusich, E.M., Osman, Z.B., Bates, K.E., Marchingo, J.M., Duman-Scheel, M., and Whitington, P.M. (2010). Netrin-guided accessory cell morphogenesis dictates the dendrite orientation and migration of a Drosophila sensory neuron. Development *137*, 2227-2235.

Muller, T., Concannon, C.G., Ward, M.W., Walsh, C.M., Tirniceriu, A.L., Tribl, F., Kogel, D., Prehn, J.H., and Egensperger, R. (2007). Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). Mol Biol Cell *18*, 201-210.

Muller, U., Cristina, N., Li, Z.W., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., Rulicke, T., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1994). Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. Cell *79*, 755-765.

Murray, A., Naeem, A., Barnes, S.H., Drescher, U., and Guthrie, S. (2010). Slit and Netrin-1 guide cranial motor axon pathfinding via Rho-kinase, myosin light chain kinase and myosin II. Neural Dev *5*, 16.

Murray, A.J., Tucker, S.J., and Shewan, D.A. (2009). cAMP-dependent axon guidance is distinctly regulated by Epac and protein kinase A. J Neurosci *29*, 15434-15444.

Nadarajah, B., and Parnavelas, J.G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. Nat Rev Neurosci *3*, 423-432.

Nakashiba, T., Ikeda, T., Nishimura, S., Tashiro, K., Honjo, T., Culotti, J.G., and Itohara, S. (2000). Netrin-G1: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. J Neurosci *20*, 6540-6550.

Nakashiba, T., Nishimura, S., Ikeda, T., and Itohara, S. (2002). Complementary expression and neurite outgrowth activity of netrin-G subfamily members. Mech Dev *111*, 47-60.

Nawabi, H., Briancon-Marjollet, A., Clark, C., Sanyas, I., Takamatsu, H., Okuno, T., Kumanogoh, A., Bozon, M., Takeshima, K., Yoshida, Y., *et al.* (2010). A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. Genes Dev *24*, 396-410.

Niederkofler, V., Salie, R., Sigrist, M., and Arber, S. (2004). Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. J Neurosci *24*, 808-818.

Nijhawan, D., Honarpour, N., and Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. Annu Rev Neurosci *23*, 73-87.

Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. Nature *457*, 981-989.

Nikoletopoulou, V., Lickert, H., Frade, J.M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., Bibel, M., and Barde, Y.A. (2010). Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. Nature *467*, 59-63.

Nikolopoulos, S.N., and Giancotti, F.G. (2005). Netrin-integrin signaling in epithelial morphogenesis, axon guidance and vascular patterning. Cell Cycle *4*, e131-135.

Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J.R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M.M., and Hong, K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca2+ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. Nature *423*, 990-995.

Nishiyama, M., von Schimmelmann, M.J., Togashi, K., Findley, W.M., and Hong, K. (2008). Membrane potential shifts caused by diffusible guidance signals direct growth-cone turning. Nat Neurosci *11*, 762-771.

Okada, A., Charron, F., Morin, S., Shin, D.S., Wong, K., Fabre, P.J., Tessier-Lavigne, M., and McConnell, S.K. (2006). Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. Nature *444*, 369-373.

Opferman, J.T., and Korsmeyer, S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. Nat Immunol *4*, 410-415.

Oppenheim, R.W. (1991). Cell death during development of the nervous system. Annu Rev Neurosci *14*, 453-501.

Oppenheim, R.W., Homma, S., Marti, E., Prevette, D., Wang, S., Yaginuma, H., and McMahon, A.P. (1999). Modulation of early but not later stages of programmed cell death in embryonic avian spinal cord by sonic hedgehog. Mol Cell Neurosci *13*, 348-361.

Osborne, P.B., Halliday, G.M., Cooper, H.M., and Keast, J.R. (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*, 671-681.

Paganelli, A.R., Ocana, O.H., Prat, M.I., Franco, P.G., Lopez, S.L., Morelli, L., Adamo, A.M., Riccomagno, M.M., Matsubara, E., Shoji, M., *et al.* (2001). The Alzheimer-related gene presenilin-1 facilitates sonic hedgehog expression in Xenopus primary neurogenesis. Mech Dev *107*, 119-131.

Paige, G.D., and Seidman, S.H. (1999). Characteristics of the VOR in response to linear acceleration. Ann N Y Acad Sci *871*, 123-135.

Pak, C.W., Flynn, K.C., and Bamburg, J.R. (2008). Actin-binding proteins take the reins in growth cones. Nat Rev Neurosci *9*, 136-147.

Panchision, D.M., and McKay, R.D. (2002). The control of neural stem cells by morphogenic signals. Curr Opin Genet Dev *12*, 478-487.

Panchision, D.M., Pickel, J.M., Studer, L., Lee, S.H., Turner, P.A., Hazel, T.G., and McKay, R.D. (2001). Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. Genes Dev *15*, 2094-2110.

Paradisi, A., Maisse, C., Coissieux, M.M., Gadot, N., Lepinasse, F., Delloye-Bourgeois, C., Delcros, J.G., Svrcek, M., Neufert, C., Flejou, J.F.*, et al.* (2009). Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 17146-17151.

Parent, A.T., Barnes, N.Y., Taniguchi, Y., Thinakaran, G., and Sisodia, S.S. (2005). Presenilin attenuates receptor-mediated signaling and synaptic function. J Neurosci *25*, 1540-1549.

Park, K.W., Crouse, D., Lee, M., Karnik, S.K., Sorensen, L.K., Murphy, K.J., Kuo, C.J., and Li, D.Y. (2004). The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 16210-16215.

Park, K.W., Urness, L.D., Senchuk, M.M., Colvin, C.J., Wythe, J.D., Chien, C.B., and Li, D.Y. (2005). Identification of new netrin family members in zebrafish: developmental expression of netrin 2 and netrin 4. Dev Dyn *234*, 726-731.

Parkin, E.T., Trew, A., Christie, G., Faller, A., Mayer, R., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2002). Structure-activity relationship of hydroxamate-based inhibitors on the secretases that cleave the amyloid precursor protein, angiotensin converting enzyme, CD23, and pro-tumor necrosis factor-alpha. Biochemistry *41*, 4972-4981.

Pascual, M., Pozas, E., Barallobre, M.J., Tessier-Lavigne, M., and Soriano, E. (2004). Coordinated functions of Netrin-1 and Class 3 secreted Semaphorins in the guidance of reciprocal septohippocampal connections. Mol Cell Neurosci *26*, 24-33.

Petrie, R.J., Zhao, B., Bedford, F., and Lamarche-Vane, N. (2009). Compartmentalized DCC signalling is distinct from DCC localized to lipid rafts. Biol Cell *101*, 77-90.

Picard, M., Petrie, R.J., Antoine-Bertrand, J., Saint-Cyr-Proulx, E., Villemure, J.F., and Lamarche-Vane, N. (2009). Spatial and temporal activation of the small GTPases RhoA and Rac1 by the netrin-1 receptor UNC5a during neurite outgrowth. Cell Signal *21*, 1961-1973.

Pierceall, W.E., Reale, M.A., Candia, A.F., Wright, C.V., Cho, K.R., and Fearon, E.R. (1994). Expression of a homologue of the deleted in colorectal cancer (DCC) gene in the nervous system of developing Xenopus embryos. Dev Biol *166*, 654-665.

Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Jessell, T., and Dodd, J. (1990). Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant. Development *110*, 19-30.

Powell, A.W., Sassa, T., Wu, Y., Tessier-Lavigne, M., and Polleux, F. (2008). Topography of thalamic projections requires attractive and repulsive functions of Netrin-1 in the ventral telencephalon. PLoS Biol *6*, e116.

Przyborski, S.A., Knowles, B.B., and Ackerman, S.L. (1998). Embryonic phenotype of Unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary. Development *125*, 41-50.

Quinn, C.C., Pfeil, D.S., and Wadsworth, W.G. (2008). CED-10/Rac1 mediates axon guidance by regulating the asymmetric distribution of MIG-10/lamellipodin. Curr Biol *18*, 808-813.

Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L.T., Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L., and Bredesen, D.E. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. Science *261*, 345-348.

Rajagopalan, S., Deitinghoff, L., Davis, D., Conrad, S., Skutella, T., Chedotal, A., Mueller, B.K., and Strittmatter, S.M. (2004). Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. Nat Cell Biol *6*, 756-762.

Rajasekharan, S., Baker, K.A., Horn, K.E., Jarjour, A.A., Antel, J.P., and Kennedy, T.E. (2009). Netrin 1 and Dcc regulate oligodendrocyte process branching and membrane extension via Fyn and RhoA. Development *136*, 415-426.

Rajasekharan, S., Bin, J.M., Antel, J.P., and Kennedy, T.E. (2010). A central role for RhoA during oligodendroglial maturation in the switch from netrin-1-mediated chemorepulsion to process elaboration. J Neurochem *113*, 1589-1597.

Reale, M.A., Hu, G., Zafar, A.I., Getzenberg, R.H., Levine, S.M., and Fearon, E.R. (1994). Expression and alternative splicing of the deleted in colorectal cancer (DCC) gene in normal and malignant tissues. Cancer Res *54*, 4493-4501.

Ren, X.R., Hong, Y., Feng, Z., Yang, H.M., Mei, L., and Xiong, W.C. (2008). Tyrosine phosphorylation of netrin receptors in netrin-1 signaling. Neurosignals *16*, 235-245.

Ren, X.R., Ming, G.L., Xie, Y., Hong, Y., Sun, D.M., Zhao, Z.Q., Feng, Z., Wang, Q., Shim, S., Chen, Z.F.*, et al.* (2004). Focal adhesion kinase in netrin-1 signaling. Nat Neurosci *7*, 1204-1212.

Renehan, A.G., Booth, C., and Potten, C.S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? BMJ *322*, 1536-1538.

Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. Genes Dev *13*, 3179-3184.

Round, J., and Stein, E. (2007). Netrin signaling leading to directed growth cone steering. Curr Opin Neurobiol *17*, 15-21.

Ryan, K.A., and Pimplikar, S.W. (2005). Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. J Cell Biol *171*, 327-335.

Saitoh, T., Sundsmo, M., Roch, J.M., Kimura, N., Cole, G., Schubert, D., Oltersdorf, T., and Schenk, D.B. (1989). Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. Cell *58*, 615-622.

Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature *391*, 96-99.

Salminen, M., Meyer, B.I., Bober, E., and Gruss, P. (2000). Netrin 1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear. Development *127*, 13-22.

Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 10964-10967.

Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat Rev Mol Cell Biol *3*, 401-410.

Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., and Zipursky, S.L. (2000). Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. Cell *101*, 671-684.

Schoenmann, Z., Assa-Kunik, E., Tiomny, S., Minis, A., Haklai-Topper, L., Arama, E., and Yaron, A. (2010). Axonal degeneration is regulated by the apoptotic machinery or a NAD+-sensitive pathway in insects and mammals. J Neurosci *30*, 6375-6386.

Schubert, D., Jin, L.W., Saitoh, T., and Cole, G. (1989). The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. Neuron *3*, 689-694.

Schulte, M., Reiss, K., Lettau, M., Maretzky, T., Ludwig, A., Hartmann, D., de Strooper, B., Janssen, O., and Saftig, P. (2007). ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. Cell Death Differ *14*, 1040-1049.

Schwarting, G.A., Kostek, C., Bless, E.P., Ahmad, N., and Tobet, S.A. (2001). Deleted in colorectal cancer (DCC) regulates the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the basal forebrain. J Neurosci *21*, 911-919.

Schwarting, G.A., Raitcheva, D., Bless, E.P., Ackerman, S.L., and Tobet, S. (2004). Netrin 1-mediated chemoattraction regulates the migratory pathway of LHRH neurons. Eur J Neurosci *19*, 11-20.

Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. Cell *87*, 1001-1014.

Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6. Cell *78*, 409-424.

Shatzmiller, R.A., Goldman, J.S., Simard-Emond, L., Rymar, V., Manitt, C., Sadikot, A.F., and Kennedy, T.E. (2008). Graded expression of netrin-1 by specific neuronal subtypes in the adult mammalian striatum. Neuroscience *157*, 621-636.

Shekarabi, M., and Kennedy, T.E. (2002). The netrin-1 receptor DCC promotes filopodia formation and cell spreading by activating Cdc42 and Rac1. Mol Cell Neurosci *19*, 1-17.

Shekarabi, M., Moore, S.W., Tritsch, N.X., Morris, S.J., Bouchard, J.F., and Kennedy, T.E. (2005). Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. J Neurosci *25*, 3132-3141.

Shewan, D., Dwivedy, A., Anderson, R., and Holt, C.E. (2002). Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway. Nat Neurosci *5*, 955-962.

Shi, M., Zheng, M.H., Liu, Z.R., Hu, Z.L., Huang, Y., Chen, J.Y., Zhao, G., Han, H., and Ding, Y.Q. (2010). DCC is specifically required for the survival of retinal ganglion and displaced amacrine cells in the developing mouse retina. Dev Biol *348*, 87-96.

Shim, S., Goh, E.L., Ge, S., Sailor, K., Yuan, J.P., Roderick, H.L., Bootman, M.D., Worley, P.F., Song, H., and Ming, G.L. (2005). XTRPC1-dependent chemotropic guidance of neuronal growth cones. Nat Neurosci *8*, 730-735.

Small, D.H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. J Neurosci *14*, 2117-2127.

Spassky, N., de Castro, F., Le Bras, B., Heydon, K., Queraud-LeSaux, F., Bloch-Gallego, E., Chedotal, A., Zalc, B., and Thomas, J.L. (2002). Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. J Neurosci *22*, 5992-6004.

Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G.C., and Hinck, L. (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. Dev Cell *4*, 371-382.

Stanco, A., Szekeres, C., Patel, N., Rao, S., Campbell, K., Kreidberg, J.A., Polleux, F., and Anton, E.S. (2009). Netrin-1-alpha3beta1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 7595-7600.

Stein, E., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. Science *291*, 1928-1938.

Stein, E., Zou, Y., Poo, M., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. Science *291*, 1976-1982.

Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. (1998). Properties of the caspases. Biochim Biophys Acta *1387*, 17-31.

Strizzi, L., Mancino, M., Bianco, C., Raafat, A., Gonzales, M., Booth, B.W., Watanabe, K., Nagaoka, T., Mack, D.L., Howard, B.*, et al.* (2008). Netrin-1 can affect morphogenesis and differentiation of the mouse mammary gland. J Cell Physiol *216*, 824-834.

Stupack, D.G., Puente, X.S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C.M., and Cheresh, D.A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. J Cell Biol *155*, 459-470.

Sugimoto, Y., Taniguchi, M., Yagi, T., Akagi, Y., Nojyo, Y., and Tamamaki, N. (2001). Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. Development *128*, 3321-3330.

Tamamaki, N., Fujimori, K.E., and Takauji, R. (1997). Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. J Neurosci *17*, 8313-8323.

Tanahashi, H., and Yoshioka, K. (2008). RNA interference silencing of DRAL affects processing of amyloid precursor protein. Neurosci Lett *439*, 293-297.

Tang, F., and Kalil, K. (2005). Netrin-1 induces axon branching in developing cortical neurons by frequency-dependent calcium signaling pathways. J Neurosci *25*, 6702-6715.

Tang, X., Jang, S.W., Okada, M., Chan, C.B., Feng, Y., Liu, Y., Luo, S.W., Hong, Y., Rama, N., Xiong, W.C.*, et al.* (2008). Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B. Nat Cell Biol *10*, 698-706.

Taniguchi, Y., Kim, S.H., and Sisodia, S.S. (2003). Presenilin-dependent "gamma-secretase" processing of deleted in colorectal cancer (DCC). J Biol Chem *278*, 30425-30428.

Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M., and Neve, R.L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. Science *235*, 880-884.

Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.C., Arumae, U., and Mehlen, P. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 13361-13366.

Tcherkezian, J., Brittis, P.A., Thomas, F., Roux, P.P., and Flanagan, J.G. (2010). Transmembrane receptor DCC associates with protein synthesis machinery and regulates translation. Cell *141*, 632-644.

Teichmann, H.M., and Shen, K. (2010). UNC-6 and UNC-40 promote dendritic growth through PAR-4 in Caenorhabditis elegans neurons. Nat Neurosci *14*, 165-172.

Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A.G., Dodd, J., and Jessell, T.M. (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. Nature *336*, 775-778.

Thibert, C., Teillet, M.A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N.M., and Mehlen, P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. Science *301*, 843-846.

Tong, J., Killeen, M., Steven, R., Binns, K.L., Culotti, J., and Pawson, T. (2001). Netrin stimulates tyrosine phosphorylation of the UNC-5 family of netrin receptors and induces Shp2 binding to the RCM cytodomain. J Biol Chem *276*, 40917-40925.

Tsai, H.H., Macklin, W.B., and Miller, R.H. (2006). Netrin-1 is required for the normal development of spinal cord oligodendrocytes. J Neurosci *26*, 1913-1922.

Tsai, H.H., Tessier-Lavigne, M., and Miller, R.H. (2003). Netrin 1 mediates spinal cord oligodendrocyte precursor dispersal. Development *130*, 2095-2105.

Tsai, N.P., Bi, J., and Wei, L.N. (2007). The adaptor Grb7 links netrin-1 signaling to regulation of mRNA translation. EMBO J *26*, 1522-1531.

Tulasne, D., Deheuninck, J., Lourenco, F.C., Lamballe, F., Ji, Z., Leroy, C., Puchois, E., Moumen, A., Maina, F., Mehlen, P.*, et al.* (2004). Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage. Mol Cell Biol *24*, 10328-10339.

Uetsuki, T., Takemoto, K., Nishimura, I., Okamoto, M., Niinobe, M., Momoi, T., Miura, M., and Yoshikawa, K. (1999). Activation of neuronal caspase-3 by intracellular accumulation of wild-type Alzheimer amyloid precursor protein. J Neurosci *19*, 6955-6964.

Varela-Echavarria, A., Tucker, A., Puschel, A.W., and Guthrie, S. (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. Neuron *18*, 193-207.

Vassar, R., and Citron, M. (2000). Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research. Neuron *27*, 419-422.

Vielmetter, J., Kayyem, J.F., Roman, J.M., and Dreyer, W.J. (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*, 2009-2020.

von Hilchen, C.M., Hein, I., Technau, G.M., and Altenhein, B. (2010). Netrins guide migration of distinct glial cells in the Drosophila embryo. Development *137*, 1251-1262.

Wajant, H. (2003). Death receptors. Essays Biochem *39*, 53-71.

Wang, G.X., and Poo, M.M. (2005). Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. Nature *434*, 898-904.

Wang, H., Ozaki, T., Shamim Hossain, M., Nakamura, Y., Kamijo, T., Xue, X., and Nakagawara, A. (2008a). A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. Biochem Biophys Res Commun *370*, 594-598.

Wang, H., and Tessier-Lavigne, M. (1999). En passant neurotrophic action of an intermediate axonal target in the developing mammalian CNS. Nature *401*, 765-769.

Wang, W., Reeves, W.B., Pays, L., Mehlen, P., and Ramesh, G. (2009a). Netrin-1 overexpression protects kidney from ischemia reperfusion injury by suppressing apoptosis. Am J Pathol *175*, 1010-1018.

Wang, W., Reeves, W.B., and Ramesh, G. (2008b). Netrin-1 and kidney injury. I. Netrin-1 protects against ischemia-reperfusion injury of the kidney. Am J Physiol Renal Physiol *294*, F739-747.

Wang, W., Reeves, W.B., and Ramesh, G. (2009b). Netrin-1 increases proliferation and migration of renal proximal tubular epithelial cells via the UNC5B receptor. Am J Physiol Renal Physiol *296*, F723-729.

Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E., and Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 10758-10762.

Watanabe, K., Tamamaki, N., Furuta, T., Ackerman, S.L., Ikenaka, K., and Ono, K. (2006). Dorsally derived netrin 1 provides an inhibitory cue and elaborates the 'waiting period' for primary sensory axons in the developing spinal cord. Development *133*, 1379-1387.

Watari-Goshima, N., Ogura, K., Wolf, F.W., Goshima, Y., and Garriga, G. (2007). C. elegans VAB-8 and UNC-73 regulate the SAX-3 receptor to direct cell and growth-cone migrations. Nat Neurosci *10*, 169-176.

Wehrle, R., Camand, E., Chedotal, A., Sotelo, C., and Dusart, I. (2005). Expression of netrin-1, slit-1 and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions. Eur J Neurosci *22*, 2134-2144.

Wen, Z., Guirland, C., Ming, G.L., and Zheng, J.Q. (2004). A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca(2+)-dependent growth cone guidance. Neuron *43*, 835-846.

Wilkinson, D.G. (2001). Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. Nat Rev Neurosci *2*, 155-164.

Williams, D.W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y., and Truman, J.W. (2006a). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. Nat Neurosci *9*, 1234-1236.

Williams, M.E., Lu, X., McKenna, W.L., Washington, R., Boyette, A., Strickland, P., Dillon, A., Kaprielian, Z., Tessier-Lavigne, M., and Hinck, L. (2006b). UNC5A promotes neuronal apoptosis during spinal cord development independent of netrin-1. Nat Neurosci *9*, 996-998.

Williams, M.E., Wu, S.C., McKenna, W.L., and Hinck, L. (2003). Surface expression of the netrin receptor UNC5H1 is regulated through a protein kinase C-interacting protein/protein kinase-dependent mechanism. J Neurosci *23*, 11279-11288.

Wilson, B.D., Ii, M., Park, K.W., Suli, A., Sorensen, L.K., Larrieu-Lahargue, F., Urness, L.D., Suh, W., Asai, J., Kock, G.A.*, et al.* (2006). Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. Science *313*, 640-644.

Winberg, M.L., Mitchell, K.J., and Goodman, C.S. (1998). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. Cell *93*, 581-591.

Wu, K.Y., Zippin, J.H., Huron, D.R., Kamenetsky, M., Hengst, U., Buck, J., Levin, L.R., and Jaffrey, S.R. (2006). Soluble adenylyl cyclase is required for netrin-1 signaling in nerve growth cones. Nat Neurosci *9*, 1257-1264.

Xie, Y., Ding, Y.Q., Hong, Y., Feng, Z., Navarre, S., Xi, C.X., Zhu, X.J., Wang, C.L., Ackerman, S.L., Kozlowski, D.*, et al.* (2005). Phosphatidylinositol transfer protein-alpha in netrin-1-induced PLC signalling and neurite outgrowth. Nat Cell Biol *7*, 1124-1132.

Xie, Y., Hong, Y., Ma, X.Y., Ren, X.R., Ackerman, S., Mei, L., and Xiong, W.C. (2006). DCC-dependent phospholipase C signaling in netrin-1-induced neurite elongation. J Biol Chem *281*, 2605-2611.

Xu, B., Goldman, J.S., Rymar, V.V., Forget, C., Lo, P.S., Bull, S.J., Vereker, E., Barker, P.A., Trudeau, L.E., Sadikot, A.F.*, et al.* (2010). Critical roles for the netrin receptor deleted in colorectal cancer in dopaminergic neuronal precursor migration, axon guidance, and axon arborization. Neuroscience *169*, 932-949.

Xu, Y.X., Wang, H.Q., Yan, J., Sun, X.B., Guo, J.C., and Zhu, C.Q. (2009). Antibody binding to cell surface amyloid precursor protein induces neuronal injury by deregulating the phosphorylation of focal adhesion signaling related proteins. Neurosci Lett *465*, 276-281.

Yabe, T., Samuels, I., and Schwartz, J.P. (2002). Bone morphogenetic proteins BMP-6 and BMP-7 have differential effects on survival and neurite outgrowth of cerebellar granule cell neurons. J Neurosci Res *68*, 161-168.

Yaginuma, H., Tomita, M., Takashita, N., McKay, S.E., Cardwell, C., Yin, Q.W., and Oppenheim, R.W. (1996). A novel type of programmed neuronal death in the cervical spinal cord of the chick embryo. J Neurosci *16*, 3685-3703.

Yamada, K.M., Spooner, B.S., and Wessells, N.K. (1971). Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. J Cell Biol *49*, 614-635.

Yamagata, M., and Sanes, J.R. (2008). Dscam and Sidekick proteins direct lamina-specific synaptic connections in vertebrate retina. Nature *451*, 465-469.

Yamakawa, K., Huot, Y.K., Haendelt, M.A., Hubert, R., Chen, X.N., Lyons, G.E., and Korenberg, J.R. (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*, 227-237.

Yang, L., Garbe, D.S., and Bashaw, G.J. (2009). A frazzled/DCC-dependent transcriptional switch regulates midline axon guidance. Science *324*, 944-947.

Yang, X., Chang, H.Y., and Baltimore, D. (1998). Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. Science *281*, 1355-1357.

Yang, Y., Zou, L., Wang, Y., Xu, K.S., Zhang, J.X., and Zhang, J.H. (2007). Axon guidance cue Netrin-1 has dual function in angiogenesis. Cancer Biol Ther *6*, 743-748.

Yao, J., Sasaki, Y., Wen, Z., Bassell, G.J., and Zheng, J.Q. (2006). An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca2+-dependent growth cone guidance. Nat Neurosci *9*, 1265-1273.

Yebra, M., Montgomery, A.M., Diaferia, G.R., Kaido, T., Silletti, S., Perez, B., Just, M.L., Hildbrand, S., Hurford, R., Florkiewicz, E.*, et al.* (2003). Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. Dev Cell *5*, 695-707.

Yee, K.T., Simon, H.H., Tessier-Lavigne, M., and O'Leary, D.M. (1999). Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. Neuron *24*, 607-622.

Yeo, W., and Gautier, J. (2003). A role for programmed cell death during early neurogenesis in xenopus. Dev Biol *260*, 31-45.

Yeo, W., and Gautier, J. (2004). Early neural cell death: dying to become neurons. Dev Biol *274*, 233-244.

Yin, Y., Sanes, J.R., and Miner, J.H. (2000). Identification and expression of mouse netrin-4. Mech Dev *96*, 115-119.

Yoshida, H., Kong, Y.Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M., and Mak, T.W. (1998). Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. Cell *94*, 739-750.

Young-Pearse, T.L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J.B., LoTurco, J.J., and Selkoe, D.J. (2007). A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. J Neurosci *27*, 14459-14469.

Yuan, J., and Kroemer, G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. Genes Dev *24*, 2592-2602.

Zhang, Y.W., Wang, R., Liu, Q., Zhang, H., Liao, F.F., and Xu, H. (2007). Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 10613-10618.

Zhou, H., Li, X.M., Meinkoth, J., and Pittman, R.N. (2000). Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. J Cell Biol *151*, 483-494.

Zhu, X.J., Wang, C.Z., Dai, P.G., Xie, Y., Song, N.N., Liu, Y., Du, Q.S., Mei, L., Ding, Y.Q., and Xiong, W.C. (2007). Myosin X regulates netrin receptors and functions in axonal path-finding. Nat Cell Biol *9*, 184-192.

Zimmermann, K.C., Bonzon, C., and Green, D.R. (2001). The machinery of programmed cell death. Pharmacol Ther *92*, 57-70.

Zou, Y., Stoeckli, E., Chen, H., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. Cell *102*, 363-375.

Annexes

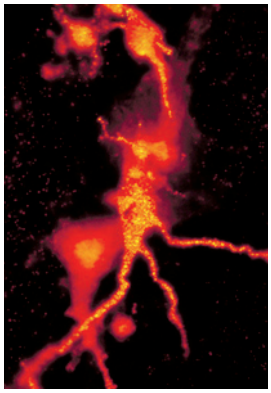
Annexe N°1 : Netrin-1 and axonal guidance: signaling and asymmetrical translation

MEDECINE/SCIENCES 2007 ; 23 : 311-5

Nétrine-1 et guidage axonal
Signalisation et traduction asymétrique

Patrick Mehlen, Nicolas Rama

> Plus de 10 ans après sa découverte, la nétrine-1 - première molécule chimioattractive contrôlant le guidage des axones commissuraux - suscite un engouement tout particulier pour son implication dans le développement du système nerveux, mais également pour son rôle dans l'angiogenèse et dans la tumorigenèse *via* son activité de facteur de survie. Nous traiterons successivement, dans cet article, des voies de la transduction du signal de la nétrine-1 *via* son récepteur principal DCC (*deleted in colorectal cancer*) et de la traduction asymétrique de β-actine dans le cône de croissance, en réponse à ce signal nétrine-1/DCC, un mécanisme du processus attraction/répulsion du cône axonal. <



Laboratoire Apoptose, Cancer et Développement, Équipe labellisée « La Ligue », CNRS UMR 5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 28, rue Laennec, 69008 Lyon, France.
mehlen@lyon.fnclcc.fr

Lorsque l'un de nos plus brillants neurobiologistes actuels, Marc Tessier-Lavigne, découvrit en 1994 la première molécule chimioattractive[1] contrôlant le guidage des axones commissuraux et qu'il la nomma nétrine-1 - du sanscrit « celui qui guide » [1] - il était bien loin de s'imaginer que, plus de 10 ans après, naîtrait un engouement tout particulier pour cette molécule, bien sûr et d'abord, pour son implication dans le développement du système nerveux, mais aussi, plus récemment, pour son rôle dans l'angiogenèse [2, 3] et dans la tumorigenèse *via* son activité de facteur de survie [4, 5]. Si on ne connaissait rien ou presque rien jusqu'en 2002 de la signalisation située en aval de la nétrine-1, tout semble s'accélérer aujourd'hui. La publication d'une série d'articles dans la revue *Nature Neuroscience* [6-8] décrivant, entre autre, l'effet de la nétrine-1 sur la traduction asymétrique de messagers spécifiques au niveau du cône de croissance - structure distale et effectrice du guidage axonal - nous conduit à faire un bref point des voies de signalisation de la nétrine-1 au cours du guidage axonal.

[1] On parle d'attraction ou de répulsion lorsque le cône de croissance tourne respectivement en direction ou à l'opposé d'un gradient de molécule chimiotropique.

En aval du couple nétrine-1/DCC : que c'est déjà compliqué...

Dans cet article, nous traiterons principalement la transduction du signal de la nétrine-1 *via* son récepteur principal DCC (*deleted in colorectal cancer*). DCC est un récepteur simple transmembranaire décrit dans les années 1990, et montrant des similitudes avec les protéines de la famille des NCAM (*neural cell adhesion molecule*). Cependant, l'absence de motif particulier dans son domaine intracellulaire a freiné la caractérisation des voies de signalisation en aval de cette protéine. La transduction du signal du couple nétrine-1/DCC dans les processus de migration et de guidage axonaux fait intervenir de nombreux acteurs et nécessite la localisation de DCC dans des zones membranaires favorisant les interactions de protéines de signalisation : les radeaux lipidiques [9, 10]. En particulier, l'activité chimiotropique de la nétrine-1 fait intervenir les protéines de signalisation de la famille des Rho GTPases (guanine triphosphatases), comme Rac1 et Cdc42, qui sont activées en présence de nétrine-1 *via* DCC et favorisent respectivement la formation des lamellipodes et des filopodes *(Figure 1)*.

Rac1 peut être activée par différentes voies. La première implique la protéine Nck1, qui est associée constitutivement au domaine intracellulaire (IC) de DCC *via* 2 domaines SH3, et pourrait, en présence de nétrine-1, participer à l'activation de Rac1 [11]. En effet, en présence de nétrine-1, Nck1 subirait un changement conformationnel lui permettant d'interagir *via* son domaine SH2 avec la protéine Fyn connue pour phospho-

Article reçu le 22 novembre 2006, accepté le 22 décembre 2006.

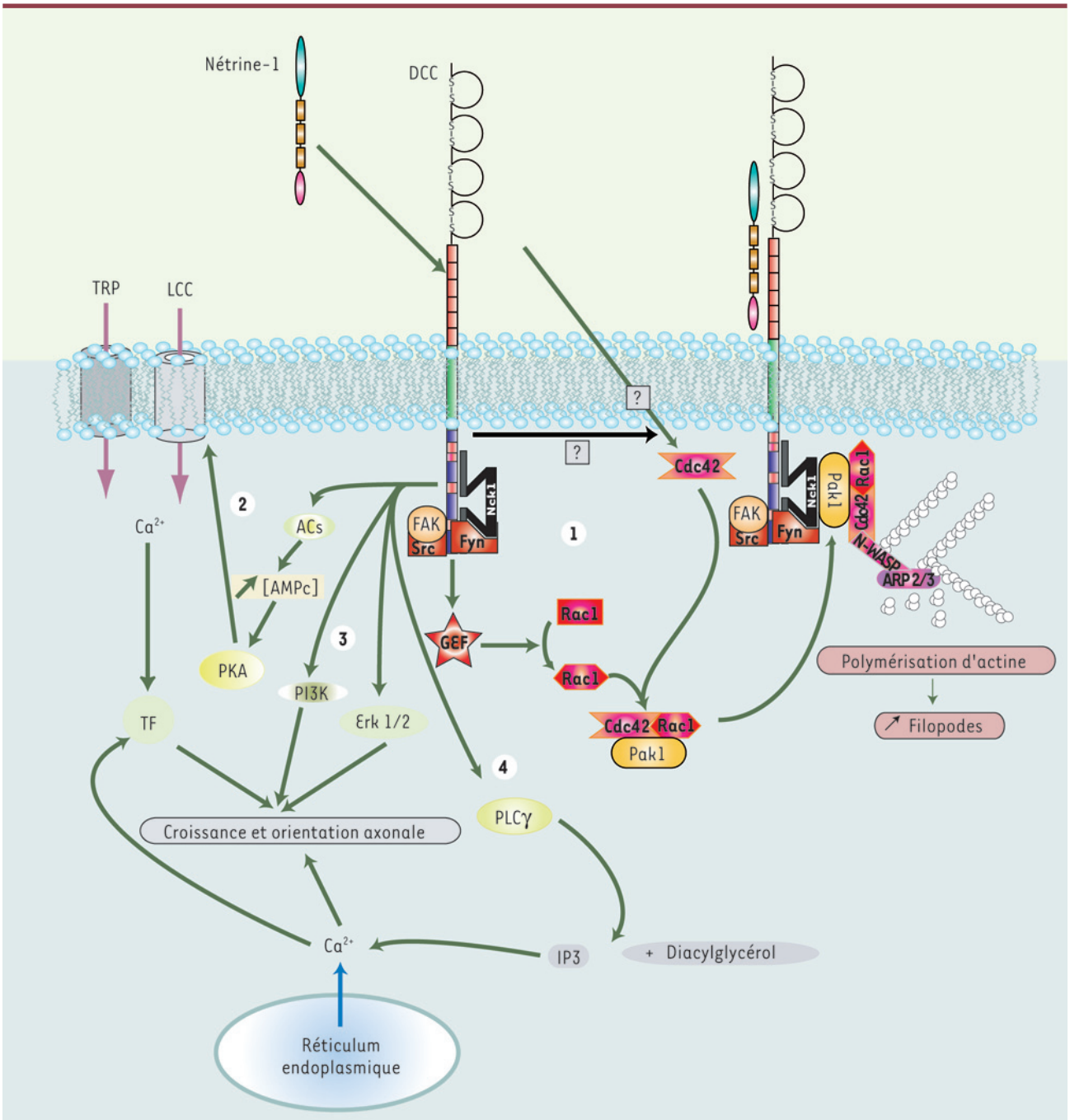


Figure 1. ***Voies de signalisation de la nétrine-1.*** ***(1)*** En présence de nétrine-1, DCC et Nck1 recrutent Fyn qui phosphoryle DCC activant ainsi Rac1 probablement par une GEF. Rac1 et Cdc42 activées forment un complexe avec Pak1 et le phosphorylent. Pak1 activée interagit avec Nck1 pour former un complexe contenant DCC, Nck1, Pak1, Rac1 et Cdc42. Cdc42 recrute alors N-WASP impliquée dans la polymérisation de l'actine et lie Arp2/3 qui favorise la nucléation et la formation de branchements d'actine. Cette cascade moléculaire aboutit à la formation de filopodes nécessaires au guidage axonal. ***(2)*** La nétrine-1 *via* DCC produit des seconds messagers. En présence de nétrine-1, l'activation de l'adénylate cyclase soluble (ACs) produit une augmentation de l'AMPc, tout comme par DCC. Cette production d'AMPc active la PKA qui active les LCC permettant l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire qui active des facteurs de transcription (TF). La nétrine-1 conduit aussi à l'ouvertue des TRP permettant l'entrée de Ca^{2+}. ***(3)*** En présence de nétrine-1, La PI3K est activée aboutissant à la phosphorylation de facteur de traduction favorisant la croissance et l'orientation axonales. De plus, DCC active des protéines de la famille des MAPK : ERK ½. ***(4)*** L'activation de la PLCγ par DCC en présence de nétrine-1 conduit à la formation de PIP2 permettant le relargage du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique.

ryler DCC sur la tyrosine (Y) 1418. Cette phosphorylation est nécessaire à l'activation de Rac1 par une protéine intermédiaire inconnue, probablement une GEF (*guanosine exchange factor)* qui permettrait le chargement en GTP de Rac1.

La seconde implique la protéine FAK [12] (*focal adhesion kinase*), une protéine tyrosine kinase impliquée dans la mobilité cellulaire, interagissant avec le domaine P3 de DCC. En présence de nétrine-1, la protéine FAK liée à DCC s'autophosphoryle sur le résidu Y397 conduisant ainsi au recrutement d'une protéine de la famille des Src. Ce complexe va pouvoir à son tour phosphoryler des protéines cibles, notamment DCC sur la Y1420 qui pourrait aussi conduire à l'activation de Rac1 comme décrit précédemment. L'activation de Cdc42 a lieu en amont de l'activation de Rac1, mais les mécanismes moléculaires sont encore mystérieux.

Rac1 et Cdc42 ainsi activées vont phosphoryler la protéine Pak1 [13] (*p21 activated kinase*) connue pour favoriser la polymérisation de l'actine. Cette phosphorylation conduit à l'interaction de Pak1 avec Nck1 *via* son second domaine SH3 entraînant la formation d'un complexe moléculaire contenant DCC, Nck1, Rac1, Cdc42 et Pak1 et nécessaire à la croissance axonale. En plus d'agir directement sur la polymérisation des filaments d'actine, Cdc42 catalyse, par l'intermédiaire des protéines N-WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) et ARP 2/3, la formation de branchements de filaments d'actine favorisant l'extension axonale.

L'activation du récepteur DCC par la nétrine-1 provoque aussi la formation de seconds messagers comme l'AMP cyclique (AMPc) et/ou l'augmentation du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire favorisant la croissance et l'attraction d'axones *(Figure 1)*. En effet, les variations de la concentration de Ca^{2+} dans le cône de croissance sont régulées par le rapport AMPc/GMPc [14]. Un rapport élevé (forte concentration en Ca^{2+}) conduit à une attraction alors qu'un rapport faible (faible concentration en Ca^{2+}) conduit à une répulsion. C'est l'activation par l'AMPc, ou l'inhibition par le GMPc, de la protéine kinase A (PKA) qui active ou inhibe les LCC (*L-type Ca^{2+} channel*) permettant l'entrée ou non du Ca^{2+}. Par ailleurs, la nétrine-1 est à l'origine de l'ouverture des canaux TRP [15] (*transient receptor potential*) conduisant à une dépolarisation membranaire associée à l'entrée de Ca^{2+} et nécessaire à l'orientation du cône de croissance.

Plus récemment, une étude a montré que des axones embryonnaires expriment une adénylate cyclase soluble (ACs) capable de produire de l'AMPc [6]. La surexpression de l'ACs ou la présence de nétrine-1 conduit à l'augmentation du nombre de filopodes sur le cône de croissance suggérant ainsi que la nétrine-1 active l'ACs. De plus, l'utilisation soit d'un anticorps dirigé contre DCC, soit d'un inhibiteur de l'ACs ou de la PKA, bloque la réponse à la nétrine-1 *via* DCC et indique qu'en réponse à la nétrine-1, l'AMPc produit par l'ACs agit sur la PKA. Cette étude montre donc que l'activité de l'ACs est nécessaire à la croissance axonale induite par la nétrine-1.

Par ailleurs, l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire provient aussi de la mobilisation du Ca^{2+} contenu dans le réticulum endo-

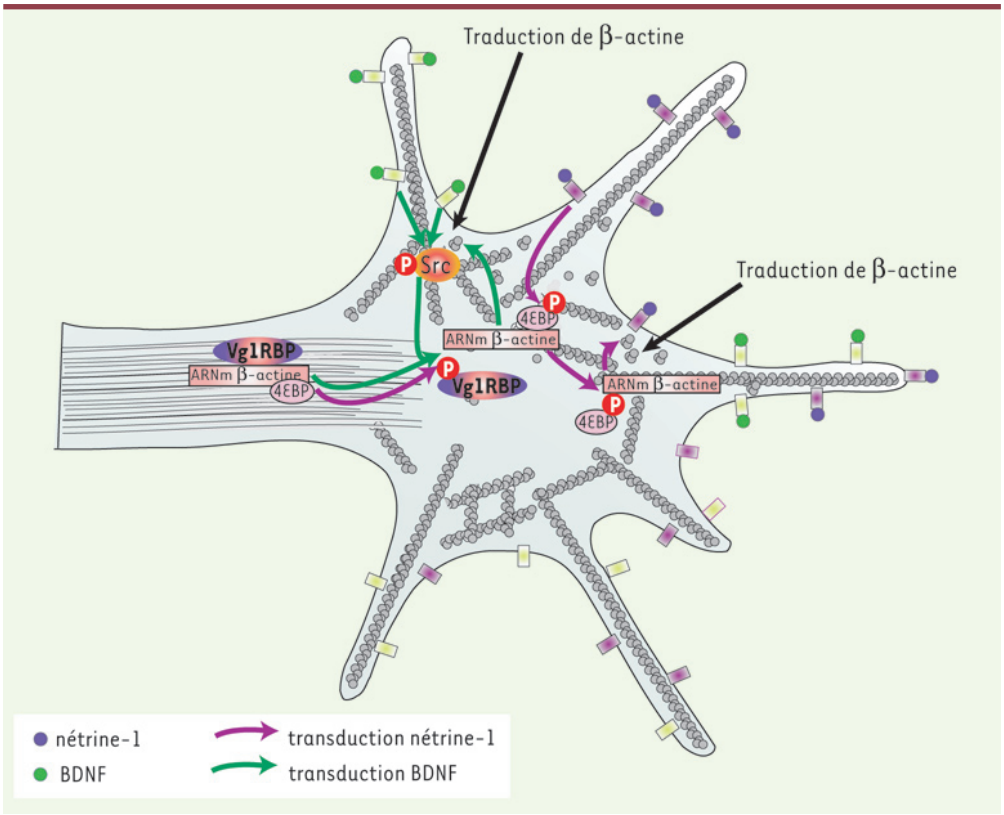


Figure 2. ***Modèle de la traduction polarisée sur le cône de croissance en présence de deux molécules chimiotropiques : la nétrine-1 et le BDNF.*** *Voie violette :* La fixation de la nétrine-1 sur DCC conduit à la localisation asymétrique des granules sur le cône de croissance du côté de la source de nétrine-1. Cette localisation des granules est associée à la phosphorylation asymétrique du facteur inhibiteur de la traduction 4EBP permettant la traduction polarisée du transcrit de la β-actine. *Voie verte :* l'arrivée du BDNF sur les récepteurs Trk conduit aussi à la localisation asymétrique de Vg1RBP-transcrit de β-actine sur le cône de croissance et à l'activation asymétrique de la protéine src. La protéine src phosphorylée va pouvoir à son tour phosphoryler Vg1RBP libérant ainsi le transcrit de β-actine qui va pouvoir être traduit de façon polarisée sur le cône de croissance.

plasmique (RE). En effet, en présence de nétrine-1, DCC interagit avec la PLCγ qui hydrolyse du PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5 diphosphate)* en diacylglycérol et IP3 (*inositol 1,4,5 triphosphate*). L'IP3 provoque un relargage du Ca^{2+} présent dans le RE favorisant la croissance des neurites et stimulant des facteurs de transcription comme la calcineurine ou NFAT.
Enfin, la nétrine-1, *via* DCC, active la voie des MAPK (*mitogen activated protein kinases*), en l'occurrence ERK 1-2 [16] (*extracellular signal-regulated kinase*) favorisant ainsi la croissance et l'orientation des axones *(Figure1)*. Toutefois, les cibles transcriptionnelles de ERK 1-2 sont encore inconnues. Certaines cibles pourraient cependant être des facteurs impliqués dans la traduction [16], ce qui nous amène à commenter la série d'articles publiés le mois dernier.

Comment répondre à la nétrine-1 lorsque l'on est un cône de croissance : moduler et régionaliser sa traduction !

En 2001, une publication « scandaleuse » paraissait : Christine Holt *et al.* [17] osaient prétendre que : (1) le cône de croissance pouvait répondre à la nétrine-1 indépendamment du corps cellulaire, et (2) la traduction au niveau du cône de croissance pouvait être un régulateur clé de la réponse à la nétrine-1. Trois ans après ce crime de lèse-majesté, l'importance de la traduction dans le cône de croissance a été plusieurs fois confirmée et deux publications viennent encore conforter cette notion. Clairement, la nétrine-1 est impliquée dans la régulation de la traduction et de la dégradation protéique [17] puisque l'inhibition d'un de ces deux processus conduit à une absence de réponse du cône de croissance mis en présence de nétrine-1. Ainsi, la nétrine-1 activerait la PI3K (*phosphoinositide-OH-3 kinase*) qui, *via* une cascade de phosphorylation, libère eIF-4E, un facteur d'initiation de la traduction qui permet le recrutement du complexe ribosomique sur l'ARNm.
Plus récemment, Leung *et al.* [7] ont montré que la nétrine-1 participe au transport, vers le cône de croissance, du transcrit de la β-actine qui est essentielle à la mobilité du cône de croissance *(Figure 2)*. En effet, une étude sur des cônes de croissance d'axones de xénope montre que le transcrit de la β-actine est associé constitutivement, *via* sa région 3' non transcrite (3' UTR), à la protéine Vg1RBP (*Vg1 RNA binding protein*). Cette protéine est connue pour être impliquée dans le transport du transcrit de β-actine dans des fibroblastes en migration. De plus, l'analyse de la dynamique des granules (transcrit de β-actine/Vg1RBP) indique qu'en présence de nétrine-1, les granules se localisent au niveau des filopodes suggérant ainsi que la nétrine-1 induit un mouvement des granules dans le cône de croissances vers les filopodes par lesquels arrivent les signaux extracellulaires. Par ailleurs, en présence de nétrine-1, l'ARNm de β-actine est traduit localement dans le cône de croissance puisqu'un inhibiteur de la traduction protéique empêche l'augmentation de β-actine associée à la présence de nétrine-1. De plus, il semble que l'effet de la nétrine-1 sur la traduction de β-actine est contrôlé par DCC car la présence d'un anticorps bloquant dirigé contre DCC inhibe la traduction de β-actine. Cette régulation de la traduction de β-actine par la nétrine-1 est réalisée *via* l'extrémité 3'UTR du transcrit de β-actine.
Ces résultats suggèrent donc que la nétrine-1 induit la translocation des granules à proximité du site de réception du signal et pourrait être à l'origine d'un transport polarisé des granules. Par conséquent, Leung *et al.* ont analysé la localisation des granules dans le cône de croissance en présence d'un gradient de nétrine-1. Ils ont effectivement mis en évidence un transport polarisé des granules dans le cône de croissance vers la source de nétrine-1. De plus, en présence d'un gradient de nétrine-1, il y a aussi une distribution asymétrique de la forme phosphorylée (4EBP-P) de 4EBP qui se localise du côté de la source de nétrine-1. 4EBP-P initie la traduction, et la phosphorylation de cette protéine semble dépendre de la protéine kinase TOR (*target of rapamycin*) puisqu'un inhibiteur de TOR prévient l'asymétrie du facteur 4EBP-P dans le cône de croissance.
Par conséquent, la localisation asymétrique dans le cône de croissance des granules et de 4EBP-P du côté de la source de nétrine-1 suggère une production asymétrique de β-actine, que confirme l'analyse de la synthèse de β-actine en présence d'un gradient de nétrine-1. Par ailleurs, l'inhibition de la synthèse de β-actine dans le cône de croissance prévient l'attraction du cône de croissance mais ni sa répulsion, ni la croissance axonale, suggérant ainsi que le transport des granules et la traduction asymétrique de β-actine jouent un rôle majeur, mais spécifique, dans la réponse attractive de la nétrine-1.
Ces résultats tout à fait intéressants sur l'effet de la nétrine-1 sur la traduction asymétrique de messagers spécifiques ont été renforcés par l'étude de Yao *et al.* [8]. Ces auteurs ont utilisé comme modèle un système artificiel d'analyse du guidage axonal, induit par l'activation d'un couple ligand/récepteur à activité tyrosine kinase BDNF (*brain derived neurotrophic factor)/récepteur Trk*. Leurs résultats sont tout à fait similaires à ceux de Leung *et al. (Figure 2)*. Les activités attractive et répulsive relayées par le BDNF requièrent la présence de Ca^{2+} et une synthèse protéique puisqu'en présence d'un gradient de BDNF, l'inhibition de la synthèse protéique abolit la réponse du cône de croissance. De plus, une augmentation locale de Ca^{2+} associée à des inhibiteurs de la synthèse protéique atténue l'attraction du cône de croissance habituellement observée, plaçant l'intervention de la synthèse protéique en aval des récepteurs Trk et de la signalisation du Ca^{2+}. Tout comme le montraient Leung *et al.*, en présence de BDNF, la protéine Vg1RBP colocalise avec le transcrit de β-actine, alors qu'en son absence cette colocalisation est faible suggérant que, comme le faisait la nétrine, le BDNF favorise la localisation du transcrit de β-actine au niveau du cône de croissance *via* l'interaction de l'ARNm avec Vg1RBP. De plus, une stimulation localisée par du BDNF sur le cône de croissance conduit à l'augmentation de la colocalisation de la protéine Vg1RBP et du transcrit de β-actine à proximité de la source de BDNF.
L'inhibition de l'interaction entre Vg1RBP et le transcrit de β-actine en présence d'oligonucléotides antisens capables d'interférer avec la liaison Vg1RBP-transcrit de β-actine, bloque à la fois l'attraction et la répulsion relayées par le BDNF et par le Ca^{2+}, suggérant que l'interaction entre Vg1RBP et le transcrit de β-actine est nécessaire lors d'une

réponse attractive ou répulsive du cône de croissance. Les auteurs ont ensuite analysé la localisation sur le cône de croissance de la protéine β-actine. En présence d'un gradient de BDNF, l'attraction du cône de croissance conduit à une distribution asymétrique de la production de β-actine impliquant Vg1RBP, le Ca^{2+} et les protéines de la famille des src. En outre, une telle distribution asymétrique de β-actine est également retrouvée lors de la répulsion du cône de croissance induite par le BDNF en présence d'un inhibiteur de la PKA, mais dans ce cas, elle est inversée. En effet, la β-actine se concentre du côté opposé à la source de BDNF lorsque la PKA est inhibée. Une diminution locale de la synthèse de β-actine associée à l'inhibition de la PKA pourrait ainsi être à l'origine de l'asymétrie inverse associée à la répulsion.

Par ailleurs, on sait que la phosphorylation de Vg1RBP, contrôlée par la kinase src régule la traduction du transcrit de β-actine *via* la levée de l'inhibition de la traduction de β-actine. Or, le BDNF module l'activité des protéine kinases src. Yao *et al.* ont alors mis en évidence une distribution asymétrique de la phosphorylation de src du côté de la source de BDNF lorsqu'il y a attraction du cône de croissance, mais du côté opposé à la source de BDNF lorsqu'il y a répulsion du cône de croissance, suggérant l'implication de P-src dans la régulation de la traduction de β-actine.

Ces deux articles montrent donc que les molécules chimiotropiques induisent un transport et une traduction asymétriques de β-actine par les protéines de la famille Vg1RBP dans le cône de croissance qui pourraient être à l'origine d'un remaniement du cytosquelette du cône de croissance favorisant ainsi l'orientation des lamellipodes et des filopodes en direction de la source de facteur chimiotropique. Néanmoins, pour Leung *et al.*, la régulation de la traduction de β-actine par la nétrine-1 passerait par la régulation du facteur 4EBP, alors que, pour Yao *et al.*, la régulation de la traduction de β-actine par le BDNF passerait par le Ca^{2+} et l'activité src. À ce jour, cependant, un lien entre Src, nétrine-1 et β-actine n'a pas été démontré, même s'il est intéressant de noter que la nétrine-1 active fyn, une protéine de la famille des src. Même si ces deux articles semblent diverger quant au rôle de la β-actine, qui, pour l'un agirait uniquement dans l'attraction, pour l'autre à la fois dans l'attraction et la répulsion, ils offrent une nouvelle perception des signaux de guidage du cône de croissance. Jusqu'ici notre vision, sans doute simpliste, relevait de la classique vision de la transduction du signal, activation en cascade de seconds messagers, de kinases et autre GTPases dans laquelle la traduction protéique ne représentait que l'usine à produire les composants du cône de croissance. Aujourd'hui, notre vision doit considérer ce signal de guidage comme un signal intégrant la « régionalisation » - donc l'asymétrie possible - de la traduction locale de protéines spécifiques comme un élément clé du système. ◊

SUMMARY

Netrin-1 and axonal guidance: indication and asymmetrical translation

More than 10 years after its initial discovery, netrin-1 - the first described chimioattractive molecule controlling the guidance of the commissural axons - has recently known a unsuspected wave of interest because of its implication in the development of the nervous system but also, more recently, fot its role in angiogenesis and tumorigenesis. Because, of a series of recent publications on netrin-1 signaling, we propose here to describe the recent insight in netrin-1 signaling *via* its main receptor DCC (deleted in colorectal cancer), and the recent discovery that netrin controls the assymetric distribution of β-actin in the growth cone. Thus, it seems that netrin-1, but also the neurotrophic factor BDNF, controls acute growth cone responses such as collapse and turning by the regulation of localized protein translation, such as β-actin. This process involves both transport of β-actin mRNA, bound to Vg1RBP, to specific locations, and mRNA translation upon stimulation by local activation of the translation initiation regulator eIF-4E-binding protein 1. Indeed, Netrin-1 induces the movement of Vg1RBP granules into filopodia, and triggers a polarized increase in β-actin translation on the near side of the growth cone before growth cone turning. The binding of BDNF to its receptor Trk has a similar effect for growth cone attraction, althought it is differentially regulated. Thus, this asymetrically synthesized β-actin may direct actin polymerization and consequently the migration of the growth cone toward the cue. ◊

RÉFÉRENCES

1. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, *et al.* The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. Cell 1994 ; 78 : 409-24.
2. Wilson BD, Ii M, Park KW, *et al.* Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science* 2006 ; 313 : 640-4.
3. Lu X, Le Noble F, Yuan L, *et al.* The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 2004 ; 432 : 179-86.
4. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, *et al.* The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998 ; 395 : 801-4.
5. Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, *et al.* Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 2004 ; 431 : 80-4.
6. Wu KY, Zippin JH, Huron DR, *et al.* Soluble adenylyl cyclase is required for netrin-1 signaling in nerve growth cones. *Nat Neurosci* 2006 ; 9 : 1257-64.
7. Leung KM, van Horck FP, Lin AC, *et al.* Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nat Neurosci* 2006 ; 9 : 1247-56.
8. Yao J, Sasaki Y, Wen Z, *et al.* An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca^{2+}-dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci* 2006 ; 9 : 1265-73.
9. Guirland C, Suzuki S, Kojima M, *et al.* Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* 2004 ; 42 : 51-62.
10. Herincs Z, Corset V, Cahuzac N, *et al.* DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance. *J Cell Sci* 2005 ; 118 : 1687-92.
11. Li X, Meriane M, Triki I, *et al.* The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 37788-97.
12. Li W, Lee J, Vikis HG, *et al.* Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nat Neurosci* 2004 ; 7 : 1213-21.
13. Shekarabi M, Moore SW, Tritsch NX, *et al.* 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* 2005 ; 25 : 3132-41.
14. Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, *et al.* Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca^{2+} channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 2003 ; 423 : 990-5.
15. Wang GX, Poo MM. Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature* 2005 ; 434 : 898-904.
16. Forcet C, Stein E, Pays L, *et al.* Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* 2002 ; 417 : 443-7.
17. Campbell DS, Holt CE. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 2001 ; 32 : 1013-26.

TIRÉS À PART

P. Mehlen

Annexe N°2 : The neogenin intracellular domain regulates gene transcription *via* nuclear translocation.

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, June 2008, p. 4068–4079 Vol. 28, No. 12
0270-7306/08/$08.00+0 doi:10.1128/MCB.02114-07
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

The Neogenin Intracellular Domain Regulates Gene Transcription via Nuclear Translocation▽†

David Goldschneider, Nicolas Rama, Catherine Guix, and Patrick Mehlen*

Apoptosis, Cancer, and Development Laboratory, Equipe Labellisée La Ligue, CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

Received 28 November 2007/Returned for modification 19 January 2008/Accepted 28 March 2008

Neogenin is a multifunctional receptor implicated in axon navigation, neuronal differentiation, morphogenesis, and cell death. Very little is known about signaling downstream of neogenin. Because we found that the neogenin intracellular domain (NeICD) interacts with nuclear proteins implicated in transcription regulation, we investigated further whether neogenin signals similarly to the Notch receptor. We show here that neogenin is cleaved by γ-secretase, an event that releases the complete NeICD. We also describe that NeICD is located at the nucleus, a feature regulated through a balance between nuclear import and export. NeICD triggers gene reporter transactivation and associates with nuclear chromatin. Direct transcriptional targets of NeICD were determined and were shown to be up-regulated in the presence of neogenin ligand. Together, we reveal here a novel aspect of neogenin signaling that relies on the direct implication of its intracellular domain in transcriptional regulation.

The seminal work by Fearon and colleagues proposed the 200-kDa-type transmembrane receptor deleted in colorectal cancer (DCC) to be a putative tumor suppressor (12). Even though this role in tumor regulation is still a matter of debate (11, 22), many reports have described the different functions of DCC. More and more attention is now being given to neogenin, a DCC homologue about which very little is currently known (8).

Neogenin displays a large ectodomain homologous to the NCAM protein family members and an intracellular domain with no known specific motifs. Because of the homology between DCC and neogenin, the latter was initially reported to be a receptor for the multifunctional netrin-1 protein (17, 35). Netrin-1 was discovered by Serafini and colleagues as a soluble cue that is key to guiding many axons and neurons during the development of the nervous system (33, 34). Because of the similar nervous system defects in netrin-1 and DCC mutant mice (17, 33), DCC is considered to be the main receptor involved in the role of netrin-1 in neuronal navigation. It has been proposed that neogenin could also be implicated in this guidance effect, although solid evidence is still missing. Netrin-1 and netrin family members are important not only for neuronal navigation but also beyond the brain (6), including in cell adhesion, morphogenesis, cell survival, and angiogenesis. Neogenin has been shown to play a role in mediating part of netrin's role in morphogenesis, especially during breast development (35) and myotube formation (16).

However, the propensity of netrin-1 to act as a ligand for neogenin was recently challenged (9, 18, 19, 32), and it has now been proposed that it is, at best, a low-affinity ligand for neogenin. Rather, neogenin appears to be a high-affinity receptor for the repulsive guidance molecule (RGM). RGM is actually comprised of three family members, RGMa, RGMb, and RGMc (18). Neogenin was proposed to mediate the axon guidance function of RGMa (32), and the RGM/neogenin pair has been shown to play a role in neuronal differentiation (18). Besides this role in neuronal navigation and differentiation, the RGM/neogenin pair also regulates cell survival. Indeed, both DCC and neogenin have been shown to belong to the so-called dependence receptor family (19, 21, 24). Such receptors share the functional property of inducing cell death when disengaged from their ligands, while the presence of their ligands blocks this proapoptotic activity. Such receptors thus create cellular states of dependence on their respective ligands (3, 25) and may consequently act as tumor suppressors by limiting tumor growth to settings of ligand availability (1, 20). This proapoptotic effect of unbound receptors may also be involved in nervous system development: the down-regulation of RGM or overexpression of neogenin in chick embryos is associated with massive cell death in the developing neural tube (19).

The molecular mechanisms that occur downstream of neogenin to promote morphogenesis, neuronal guidance, differentiation, or cell death are unknown. By analogy with its DCC homologue, it is believed that in the absence of RGM, neogenin is cleaved by caspases, exposing a proapoptotic domain, which in turn interacts with proapoptotic proteins (14, 19). On the other hand, in the presence of ligand, neogenin would activate classic positive pathways. Indeed, the RGM/neogenin pair was recently shown to activate the small GTPase RhoA, and it was shown that its role in neuronal navigation required RhoA activation (9). While performing a two-hybrid screen on the intracellular domain of neogenin, we observed that a large fraction of the putative interactors obtained are proteins usually localized within the nucleus and/or involved in transcription regulation. We thus investigated whether neogenin could function similarly to the Notch or amyloid-beta precursor protein (APP) receptors, and here, we present evidence supporting neogenin cleavage by γ-secretase, leading to the release of

* Corresponding author. Mailing address: Apoptosis, Cancer, and Development Laboratory, Equipe Labellisée La Ligue, CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France. Phone: (33) 4 78 78 28 70. Fax: (33) 4 78 78 28 87. E-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr.

† Supplemental material for this article may be found at http://mcb.asm.org/.

▽ Published ahead of print on 7 April 2008.

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

a neogenin intracellular domain (NeICD) that is imported/exported into/from the nucleus and regulates gene transcription.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, transfection procedures, and reagents. Human embryonic kidney HEK293T cells, human breast cancer MCF-7 cells, and mouse mammary tumor 67NR cells were cultured in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) plus 10% serum and 50 μg/ml gentamicin. Transient transfections of HEK293T cells were performed using FuGENE 6 reagent (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. The γ-secretase inhibitor *N*-[*N*-(3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl]-(*S*)-phenylglycine *t*-butyl ester (DAPT) and the proteasome inhibitor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132) were purchased from Sigma and used at 2 μM and 1 μM, respectively. The nuclear export inhibitor leptomycin B (LMB) was purchased from LC Laboratories and used at 1 μM. Lactacystin was purchased from Cayman and used at 10 μM. The α-secretase/TACE/ADAM17 inhibitor TAPI-1 was purchased from Calbiochem and used at 10 μM. Treatments with drugs or the same amount of dimethyl sulfoxide or ethanol vehicle alone were performed at indicated times. Recombinant human RGMa (200 ng/ml) was obtained from Apotech Corp. Mouse embryo brains were rinsed in DMEM-F12, manually dissociated, and incubated for 6 h with the indicated drugs in DMEM-F12 at 37°C.

Two-hybrid analysis. The two-hybrid system Matchmaker II (Clontech) was used according to the manufacturer's instructions. As bait, we inserted the coding sequence of Neogenin IC (positions 1127 to 1323), amplified from pCDNA3-Neogenin, into plasmid pGBKT7 through the SmaI site. *Saccharomyces cerevisiae* AH109 cells were cotransformed with the pGBKT7-Neogenin IC construct and a human fetal brain cDNA library. Yeast cells were grown in the absence of leucine, tryptophan, and histidine and in the presence of α-Gal and 5 mM 3-amino-1,2,4-triazole. Putative candidate interactors were further analyzed through DNA sequencing.

Plasmid constructs. The full-length human neogenin-expressing construct pCDNA3-Neogenin was described previously (19). The Flag-Tip60 construct is a kind gift from C. N. Robson (University of Newcastle Upon Tyne, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom). The green fluorescent protein (GFP)-neogenin constructs were generated by inserting the corresponding coding sequences, amplified by PCR using pCDNA3-Neogenin as a template, into pEGP-C1 (Clontech) through ApaI-KpnI and XhoI-HindIII sites, respectively. Gal4-neogenin constructs were made with the same method by insertion into plasmid pMst through PstI-HindIII and EcoRI-HindIII sites, respectively. pMst is a modified version of pM (Clontech) and is a kind gift from T. Sudhof. The R1129A/R1130A, K1138A/R1139A, and L1455A neogenin mutations were created using the QuikChange site-directed mutagenesis system (Stratagene). The sequences of the primers that we used are available upon request. The Neo-Gal4 construct was generated in multiple steps by PCR amplification and cloning of neogenin fragments at positions 1 to 1144 and Gal4 at positions 1 to 147 into pCDNA3. Neo-Gal4-IC was generated by inserting the neogenin fragment at positions 1145 to 1462 into Neo-Gal4: the resulting plasmid encodes full-length neogenin with the Gal4 DNA binding domain inserted into the IC domain between positions 1144 and 1145 (more details of the strategy are available upon request). The Flag-NeICD L1455A construct was obtained by PCR amplification using GFP-NeICD L1455A as a template and inserted through NotI-KpnI sites into p3X-Flag (Sigma).

Immunoblotting and immunoprecipitation. Antibodies against the neogenin intracellular domain (C-20) and against lamin A/C (346) were purchased from Santa Cruz. Antibody against β-actin (C4) was purchased from Chemicon. Coimmunoprecipitations were carried out on cotransfected 293T cells lysed in a solution containing 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% NP-40 in the presence of protease inhibitors using anti-Flag M2 antibody and protein A-Sepharose (Sigma) to pull down Flag-Tip60. Neogenin IC's interaction with Tip60 was detected with anti-Neogenin IC.

Subcellular fractionation. Cells were harvested and resuspended for 5 min in CLB buffer (10 mM HEPES, 10 mM NaCl, 1 mM KH_2PO_4, 5 mM $NaHCO_3$, 5 mM EDTA, 1 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche), phosphatase inhibitor cocktails (Sigma), and 1 mM trichostatin A (Calbiochem). Forty strokes were applied using a Dounce grinder, and the homogenate was then centrifuged at 4,000 × *g* for 5 min. The supernatant was adjusted to 0.5% NP-40 and used as the membrane plus the cytosol fraction. The nuclear pellet was resuspended in TSE (10 mM Tris, 300 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.1% NP-40 [pH 7.5]) plus protease and phosphatase inhibitors and trichostatin A and homogenized with 25 strokes. After centrifugation, the pure nuclear pellet was resuspended in Laemmli buffer and sonicated to obtain the nuclear extract.

Cell imaging. HEK293T cells seeded onto cell culture slides and transfected with GFP constructs, treated or not with LMB, were fixed with 4% formaldehyde. Nuclei were stained with DAPI (4′,6′-diamidino-2-phenylindole). After mounting with Mowiol, cells were visualized using an Axiovert 200 M epifluorescence Zeiss microscope.

Gene reporter assay. Plasmid pGLuc, encoding the firefly luciferase reporter gene under the control of the Gal4 upstream activation sequence (UAS), and plasmid pCMV-Renilla, encoding the *Renilla* luciferase reporter gene under the control of the cytomegalovirus promoter, were provided by T. Sudhof. HEK293T cells were cotransfected with each pMst construct, the same amount of pGLuc, and 1/50 of pCMV-Renilla. Transcriptional activities were determined 48 h after transfection using a dual-luciferase reporter assay according to the manufacturer's (Promega) instructions.

ChIP cloning. HEK293T cells (1×10^8 cells) were transfected with the Flag-NeICD L1455A construct. Forty-eight hours later, cells were fixed in 2.5 mg/ml dimethyladipimidate (Fluka) in phosphate-buffered saline for 30 min at room temperature and subsequently fixed with 0.8% formaldehyde in phosphate-buffered saline for 10 min at room temperature. Fixation was blocked by the addition of glycine to 125 mM for 5 min at room temperature. Cells were centrifuged at 4°C, and the pellet was resuspended in sonication buffer (10 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA plus protease inhibitors). Chromatin was sonicated on ice using a Branson cell disrupter. After centrifugation to remove debris, the lysate was then adjusted to 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, and protease inhibitors and incubated with anti-Flag M2 antibody overnight. The lysate was combined with μMACS protein G microbeads (Miltenyi Biotech) and incubated for 1 h. Lysate and beads were allowed to flow through a MACS column and washed four times with a solution containing 100 mM Tris (pH 8.0), 500 mM LiCl, 1% NP-40, and 1% deoxycholic acid. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) products were then eluted in 50 mM $NaHCO_3$–1% sodium dodecyl sulfate buffer. Ten micrograms of RNase A and 0.3 M NaCl were added for elution, and cross-linking was reverted by incubation for 4 h at 67°C. DNA was further purified using QiaQuick columns (Qiagen), digested by MboI, and cloned into BamHI-digested, calf intestinal alkaline phosphatase-dephosphorylated vector pUC19. The clones obtained were sequenced and localized on the human genome with the BLAT search function of the University of California, Santa Cruz, genome browser (http://genome.ucsc.edu).

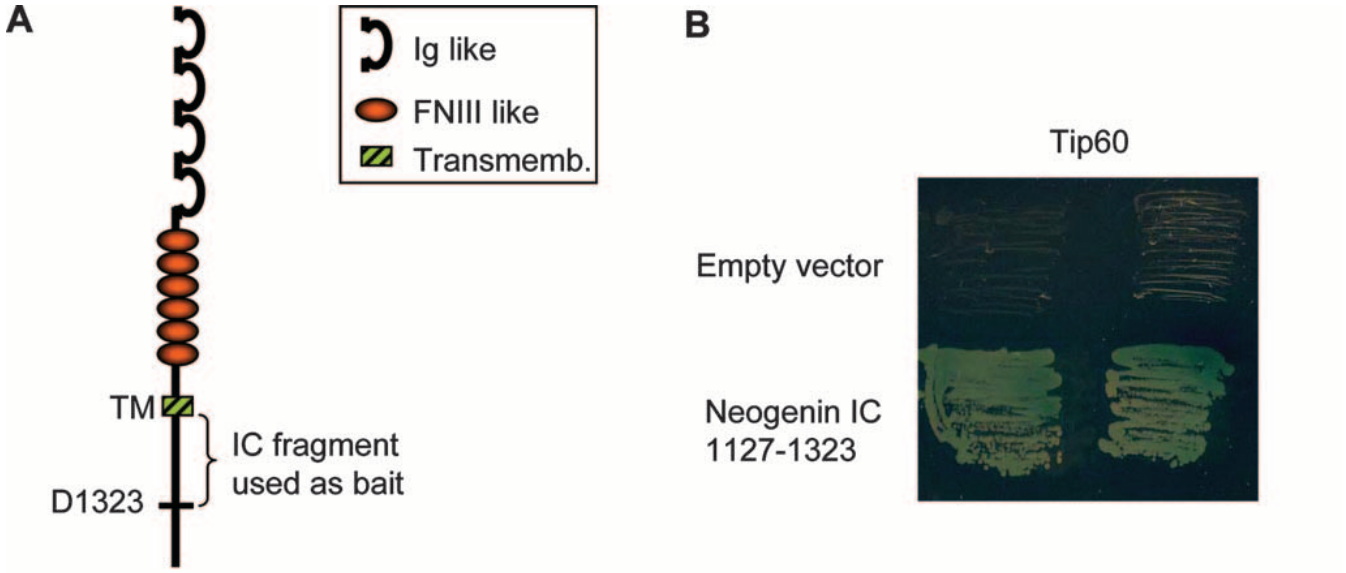
Quantitative reverse transcription-PCR (Q-RT-PCR). After RNA extraction using a NucleoSpin RNA II apparatus (Macherey Nagel) and following reverse transcription using an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions, quantitative PCR was performed using LightCycler technology according to the manufacturer's instructions. Primers used for GRHL1 amplification were 5′-GCAAAAGAAAAGGCAAGTGTC-3′ and 5′-AGGGAAGCAGTGGCACTTTA-3′, those used for CCM2 amplification were 5′-AGGAGACCTACGAGGTGGAAG-3′ and 5′-ACCACCCACATCCACAG ATT-3′, and those used for β_2-microglobulin were 5′-ACCCCCACTGAAAAA GATGA-3′ and 5′-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3′. Quantification was carried out using the $\Delta\Delta C_T$ method.

Quantitative ChIP assay. Real-time PCR-based quantitative ChIP analysis was conducted essentially as ChIP cloning but using either 1×10^7 HEK293T cells transfected for full-length neogenin or 2×10^7 MCF-7 cells. Before immunoprecipitation, an aliquot (10% input) of sonicated chromatin was removed from each sample, reverse cross-linked, treated with RNase A and proteinase K, and then purified. The rest of the samples were incubated overnight with 4 μg of control goat immunoglobulin G (IgG) or goat anti-NeICD (C-20). After purification using the μMACS system, ChIP products were reverse cross-linked, RNase A and proteinase K treated, purified using QiaQuick columns, and analyzed by real-time PCR (LightCycler). The enrichment of the GRHL1 or CCM2 promoter sequence in chromatin immunoprecipitated with control or anti-neogenin antibody was calculated with the $\Delta\Delta C_T$ method using a diluted 10% input sample as a reference and an untreated sample with control IgG as a calibrator. Primers used for the GRHL1 promoter were 5′-CCAGGCACCAGGAACATA AAAATG-3′ and 5′-TGTCTGTCTCCACCAAGTGTGAGC-3′, and those used for the CCM2 promoter were 5′-GCAACATAGTGTGACCTTGTCTCA AC-3′ and 5′-AAGCAATCCTCCCATCTCAGCC-3′.

RESULTS

Neogenin is cleaved by γ-secretase and interacts with proteins involved in gene transactivation. In a search for neogenin

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009



C

Name		GenBank accession number	Region
Tip60	TAT-Interacting Protein 60	NM_006388	aa 56-340
HDAC9	Histone Deacetylase 9	NM_058176	aa 146-365
LMO4	LIM Domain Only 4	DQ894626	aa 1-165

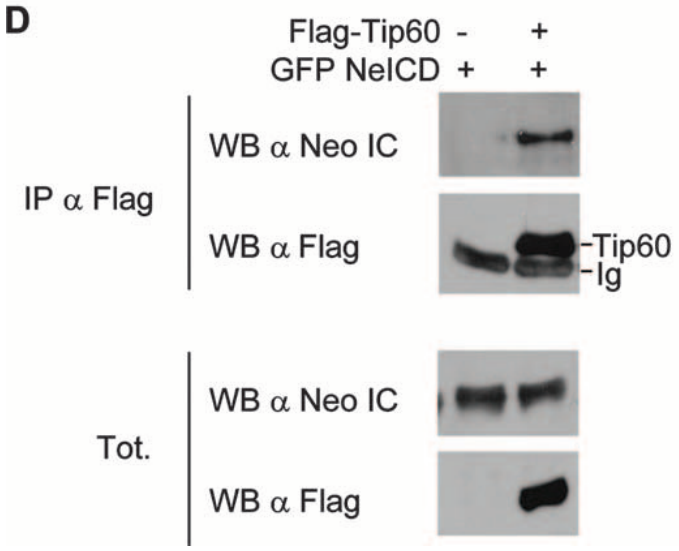


FIG. 1. The NeICD interacts with nuclear proteins including TIP60. (A) Scheme of neogenin showing the structure of the protein consisting of Ig-like and fibronectin III-like domains for the extracellular part, a transmembrane domain (TM and Transmemb.), and an intracellular domain (IC). The fragment used as bait for the two-hybrid screen is also shown. (B) Neogenin aa 1127 to 1323 interact with TIP60 in yeast. AH109 yeast cells cotransformed with TIP60 fused to the transactivating domain of Gal4 together with the Gal4 DNA binding domain alone (empty vector) or fused to neogenin aa 1127 to 1323 were grown in selective medium, as described in Materials and Methods. (C) Some of the putative interactors of neogenin aa 1127 to 1323 revealed by the two-hybrid screen and known to display a nuclear activity. (D) Coimmunoprecipitation (IP) performed in HEK293T cells cotransfected with a neogenin-expressing vector together with a Flag-tagged TIP60-expressing construct. Anti-Flag M2 antibody was used for the pull down, which was revealed using a neogenin immunoblot (WB).

interactors, we performed a two-hybrid screen on the N-terminal half of the NeICD (amino acids [aa] 1127 to 1323) (this domain was initially chosen because it was thought to be involved in cell death induction) (19) (Fig. 1A). We were puzzled when we identified putative partners known to be located in the nucleus and to play a role in gene transactivation (Fig. 1B and C). One of these candidates, the TIP60 histone acetyltransferase (5), was further analyzed, and its interaction

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

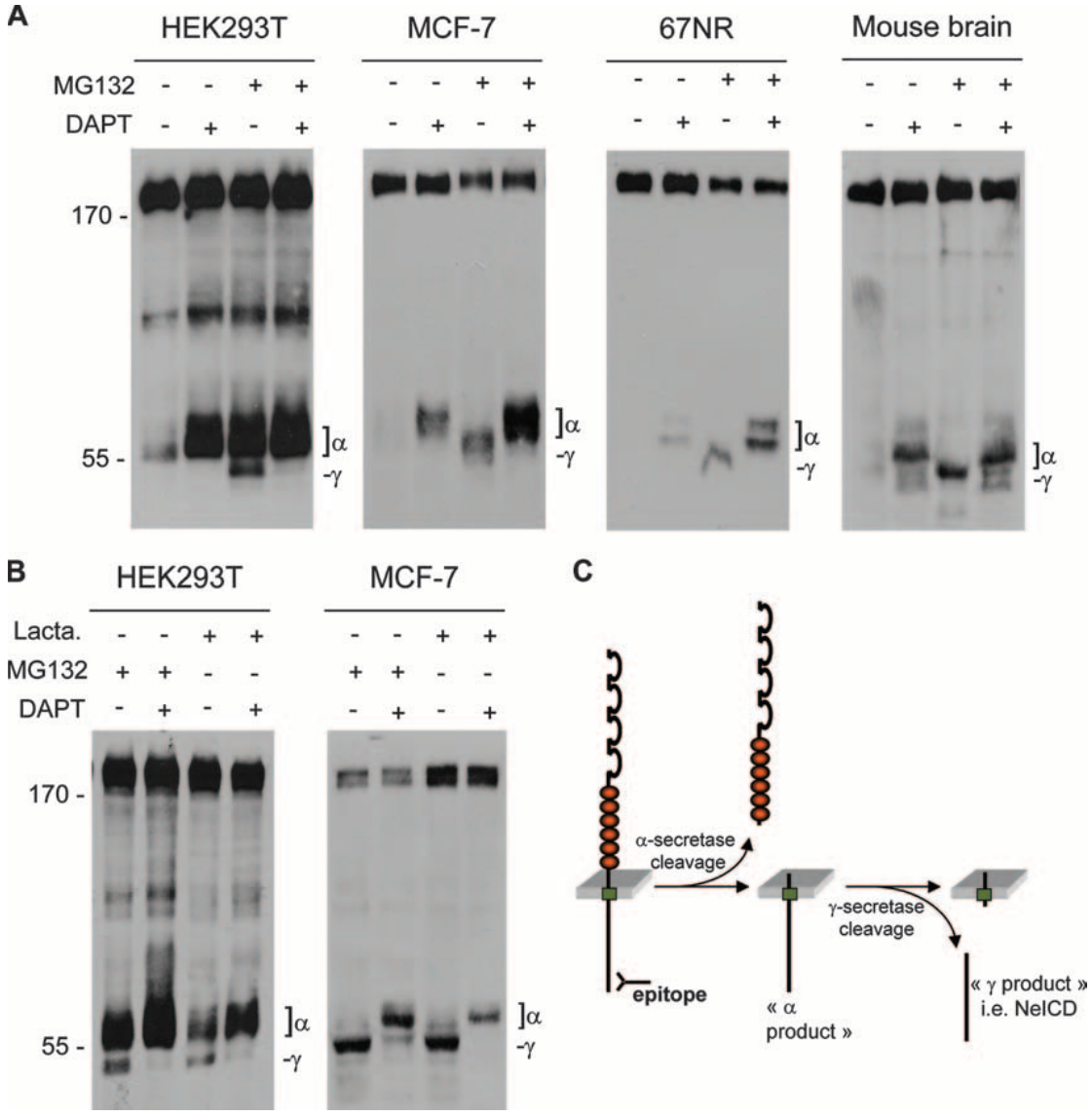


FIG. 2. Neogenin is cleaved by γ-secretase. (A) Neogenin immunoblot from lysates of neogenin-transfected HEK293T cells, from lysate of MCF-7 cells or 67NR cells, or from brains from mouse embryos at embryonic day 13.5 and treated for 6 h with 2 μM DAPT and/or the proteasome inhibitor MG132 (1 μM). Positions of the neogenin fragments cleaved by γ-secretase (γ) or α-secretase/ADAM metalloprotease (α), i.e., as this fragment is inhibited by treatment with TAPI-1 (see Fig. S1 in the supplemental material), are indicated. (B) Treatments of neogenin-transfected HEK293T or MCF-7 cells with two proteasome inhibitors show the same neogenin profiles (lactacystin [Lacta.] was used at 10 μM for 6 h). (C) Hypothetical model for the secretases cleavage of neogenin according to our results and the literature on other secretase-cleaved receptors.

with neogenin was confirmed by coimmunoprecipitation. Upon forced expression in HEK293T cells, Flag-tagged TIP60 immunoprecipitation pulled down the intracellular domain of neogenin (Fig. 1D).

TIP60 was shown to form a complex with the APP intracellular domain and to be required for the gene transactivation activity of APP, which makes it an interesting candidate. The overall view regarding transmembrane receptors that interact with nuclear proteins and/or proteins involved in transcription regulation is that the cleavage of these receptors, e.g., Notch and APP, by a secretase releases an intracellular domain that in turn can be imported into the nucleus. Because DCC was recently shown to be a substrate for γ-secretase (30, 36), we then investigated whether neogenin was also cleaved by secretase. As a first approach, neogenin was expressed in HEK293T cells incubated in the presence or absence of DAPT, a specific γ-secretase inhibitor, with or without the proteasome inhibitor MG132. The resulting neogenin fragments were analyzed by immunoblot using a neogenin C-terminal epitope. As shown in Fig. 2A, in the absence of DAPT, a "γ" fragment of about 45 kDa was detected and disappeared upon DAPT treatment to the benefit of a higher-molecular-mass fragment (55 kDa), which consequently acted as a substrate for γ-secretase. We called this fragment the α-fragment, as it is associated with the cleavage of neogenin by an α-secretase. Indeed, 24 h of treatment with 10 μM TAPI-1, a specific inhibitor of α-secretase/TACE/ADAM17, prevents the apparition of this fragment (see Fig. S1 in the supplemental material). To discard a potential

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

bias of overexpressed neogenin in HEK293T cells, we then assessed whether endogenously expressed neogenin undergoes dual cleavage by secretases. As shown in Fig. 2A, in the mammary tumor cell lines MCF-7 and 67NR, but also in mouse brain extract, neogenin is cleaved by γ-secretase, which leads to the appearance of a fragment encompassing the NeICD. The γ-fragment seems very unstable, as it was observed only in presence of the proteasome inhibitor MG132. To confirm that the γ-fragment is rapidly degraded by the proteasome, and to avoid a possible interference between MG132 and γ-secretase, as suggested previously by some authors (10), we compared the cleavage profiles of transfected or endogenous neogenin in presence of MG132 or lactacystin, another proteasome inhibitor (10 μM for 6 h). A similar profile was observed with both proteasome inhibitors (Fig. 2B) and also with a third one, epoxomicin (10 μM for 6 h) (data not shown). Therefore, based on the results described above and what is known for other secretase-cleaved receptors, such as Notch, neogenin appears to be cleaved by secretases, as depicted in the scenario shown in Fig. 2C.

The NeICD translocates to the nucleus. We then searched whether the fragment corresponding to the complete NeICD could translocate to the nucleus. As a first approach, we searched for the location of endogenously expressed neogenin in MCF-7 and 67NR cells following cytosolic/nuclear fractionation. As shown in Fig. 3A, while the majority of neogenin was recovered in the membrane/cytosolic fraction, a 45-kDa neogenin fragment was also detected in the nuclear fraction. Treatment with DAPT is associated with the absence of the neogenin γ-fragment detected in the nuclear extract, indicating that this fragment corresponds specifically to NeICD. Under these conditions, the α-product accumulates in the membrane/cytosolic fraction. Thus, upon γ-secretase cleavage, the NeICD was detected in the nucleus. To further elucidate the nuclear localization of the NeICD, we studied that of a GFP-tagged NeICD upon expression in HEK293T cells. As shown in Fig. 3B, under normal settings, the GFP-tagged NeICD was detected mainly in the cytosol. However, when LMB, an inhibitor of nuclear export, was added to the culture, GFP-NeICD accumulated in the nucleus (Fig. 3B). Thus, the NeICD naturally translocates to the nucleus but is also rapidly exported.

To map the domains responsible for the import and export of NeICD, we first analyzed the location of the N-terminal first half of the NeICD (aa 1127 to 1323) (Fig. 4A). As shown in Fig. 4A, this fragment is constitutively located within the nucleus, while the corresponding C-terminal other half (aa 1323 to 1462) is constitutively detected in the cytosol. Interestingly, in the first amino acids of the fragment at aa 1127 to 1323, a basic-rich domain was detected. As nuclear localization signals (NLSs) are often motifs enriched in basic amino acids (7), we deleted this region and observed that the remaining fragment (aa 1153 to 1323) was no longer specifically located in the nucleus. To further demonstrate that an NLS is present in the region at aa 1127 to 1153, we directly mutated the basic residues (RRTTSHKKKR mutated in AATTSHKKKR or RRTT SHKAA) and assessed the nuclear localization of the NeICD in the presence of LMB. As shown in Fig. 4B, the two mutants failed to adequately locate to the nucleus, demonstrating per se that neogenin displays an NLS located at aa 1127 to 1153. As we observed only nuclear localization of the NeICD in the presence of LMB or the absence of the C-terminal region, we surmised that a nuclear export signal (NES) was present in the C-terminal region of the NeICD. NESs are often characterized by sequences enriched in hydrophobic residues (38). We noted a sequence enriched in leucines in the C terminus of NeICD (L-$[X]_{1-3}$-L-$[X]_{2-3}$-L-X-X-I) and mutated one of the leucines (L→A). As shown in Fig. 4C, NeICD L1455A was then located to the nucleus, even in the absence of LMB. Thus, neogenin is cleaved by γ-secretase, which releases a fragment that translocates to the nucleus through an NLS located in its N-terminal end and is exported from the nucleus thanks to an NES located in its C-terminal end. Interestingly, both the NLS and NES appear to be conserved among species (Fig. 4D).

The NeICD triggers gene transcription. To monitor the role of this fragment, we investigated whether the NeICD was able to transactivate gene transcription. To assay this, the NeICD was fused to a Gal4 DNA binding domain, and HEK293T cells were forced to express Gal4-NeICD together with a construct encoding a luciferase reporter gene under the control of the Gal4 UAS. As shown in Fig. 5A, Gal4-NeICD is able to transactivate the Gal4 UAS (more than 12-fold over the Gal4 DNA binding domain alone), thereby demonstrating that this fragment displays a gene transactivation activity. To further demonstrate that this gene transactivation activity depends on the γ-secretase cleavage of the full-length neogenin, a Gal4 DNA binding domain was inserted within the intracellular domain of full-length neogenin (Fig. 5B). HEK293T cells were then forced to express Neo-Gal4ICD together with a construct encoding a reporter gene under the control of the Gal4 UAS and further treated (or not) with the γ-secretase inhibitor. As shown in Fig. 5B, in the absence of DAPT treatment, Neo-Gal4ICD transactivates the Gal4 UAS, whereas such transactivation is strongly inhibited by DAPT treatment. Thus, neogenin is cleaved by γ-secretase, which releases the NeICD that displays gene transactivation activity.

This activity is located in the C-terminal second half of NeICD (aa 1324 to 1462), as the deletion of this region was sufficient to fully abrogate this activity (Fig. 5C). In the same line, the expression of this C-terminal region only (fused to the Gal4 DNA binding domain) is sufficient to transactivate the Gal4 UAS (Fig. 5C). Intriguingly, the NeICD at aa 1324 to 1462 displays a stronger activity than does the NeICD, suggesting that the N-terminal region of NeICD also contains an inhibitory domain.

To formally prove that this cleaved fragment is associated with DNA complexes and triggers/enhances specific gene transcription, ChIPs were performed using NeICD L1455A for the pull down (the L1455A mutant was chosen for the immunoprecipitation to increase the level of the NeICD in the nucleus). DNA was extracted from the pull down and further vector cloned, demonstrating that the NeICD forms a complex with DNA. DNA sequencing of a small amount of cloned DNA (the goal here was not to describe new target genes but rather to demonstrate that the NeICD regulates the transcription of some of them) revealed a list of putative target genes that may potentially be regulated by neogenin signaling (Fig. 6A). We next assessed whether some of these genes were regulated by neogenin signaling. Two candidate genes, GRHL1 and CCM2, were selected on the basis of their relative known roles and expression statuses with regard to those of neogenin (CCM2

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

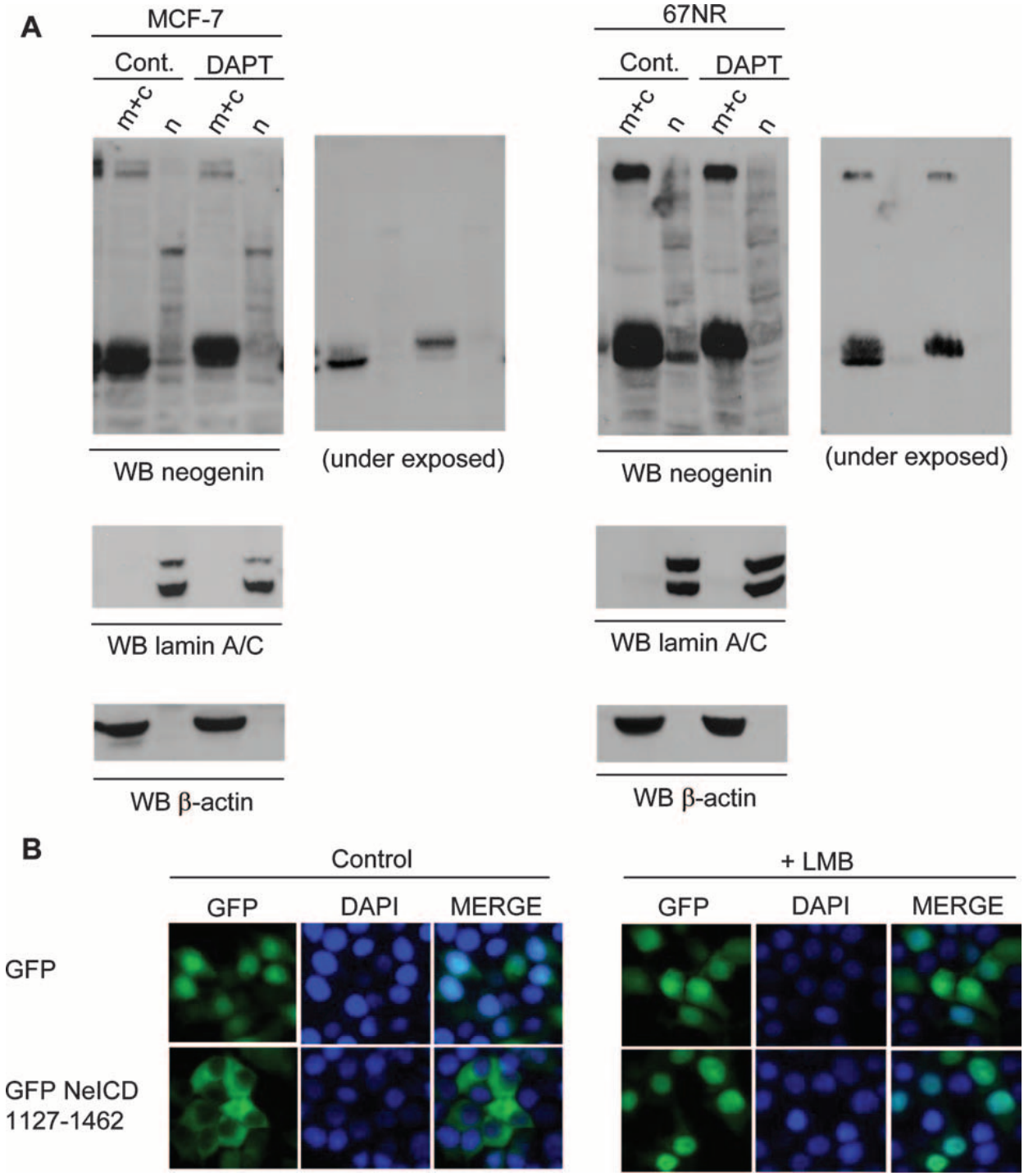


FIG. 3. The NeICD displays a nuclear localization. (A) Cellular fractionation of MCF-7 or 67NR cells treated or not treated with 2 μM DAPT and/or the proteasome inhibitor MG132 (1 μM) for 6 h. Neogenin immunoblotting (WB) was performed on cellular fractions, the nucleus (n) and the membrane and cytosol (m+c); two exposition times are shown. Please note that a shorter exposition of the blot allows a better visualization of the migration difference between γ and α products in cytosolic fractions. A lamin A/C immunoblot was used as a control for nuclear fraction, while a β-actin immunoblot was used to control the cytosolic fraction. (B) HEK293T cells transfected with GFP-NeICD, further incubated with the inhibitor LMB (1 μM for 1 h), and monitored for fluorescence localization. DAPI staining was used to label the nucleus.

encodes a scaffold for mitogen-activated protein kinase [MAPK] [37], a kinase involved in DCC/neogenin signaling [13], and GRHL1 is a transcription factor implicated during nervous system development). We then assessed the presence of GRHL1 and CCM2 mRNA by Q-RT-PCR in HEK293T cells forced to express full-length neogenin and further incubated or not with RGMa. As shown in Fig. 6B, while neogenin expression by itself failed to increase GRHL1 and CCM2 lev-

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

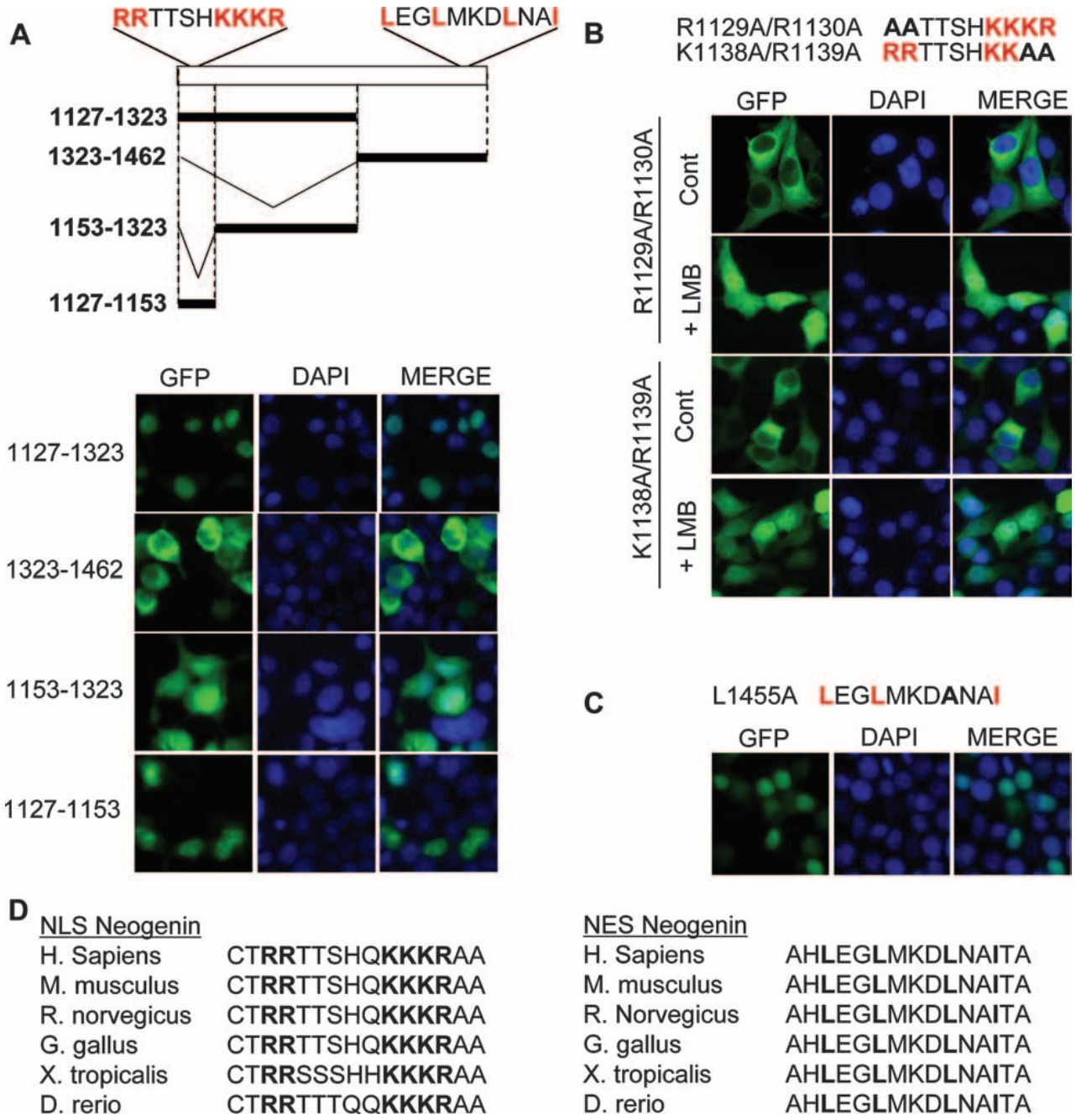


FIG. 4. The NeICD displays an NLS and an NES to regulate its nuclear localization. HEK23T cells were transfected with the indicated constructs, further incubated or not with the inhibitor LMB (1 μM for 1 h), and monitored for fluorescence localization. DAPI staining was used to label the nucleus. (A, top) Scheme representing the different mutants of neogenin IC used in the following panels. (Bottom) Same as in Fig. 3B but with the indicated deletion mutants. (B) The neogenin NLS is in the N-terminal region of NeICD. Data are the same as described above (A) but with the indicated point mutants. (C) The NES is the C-terminal region of NeICD. Data are the same as described above (A), with the neogenin IC L1455A mutant. (D) Sequence alignments showing conservation of NESs and NLSs in the different species indicated. *H. sapiens*, *Homo sapiens*; *M. musculus*, *Mus musculus*; *R. norvegicus*, *Rattus norvegicus*; *G. gallus*, *Gallus gallus*; *X. tropicalis*, *Xenopus tropicalis*; *D. rerio*, *Danio rerio*.

els, RGMa treatment triggers a time-dependent increased expression of GRHL1 and CCM2. Of interest, this increased expression is inhibited by DAPT treatment, thus suggesting that RGMa triggers gene transcription via γ-secretase cleavage of neogenin. To further analyze whether the same effect would be seen with endogenous neogenin, RGMa was added to MCF-7 cells, and as shown in Fig. 6C, RGMa does indeed trigger a GRHL1 mRNA increase, and this up-regulation is inhibited by DAPT.

To more formally demonstrate that RGMa regulates the nuclear signaling of the NeICD, which in turn directly enhances the transcription of GRHL1 and CCM2, as opposed to

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

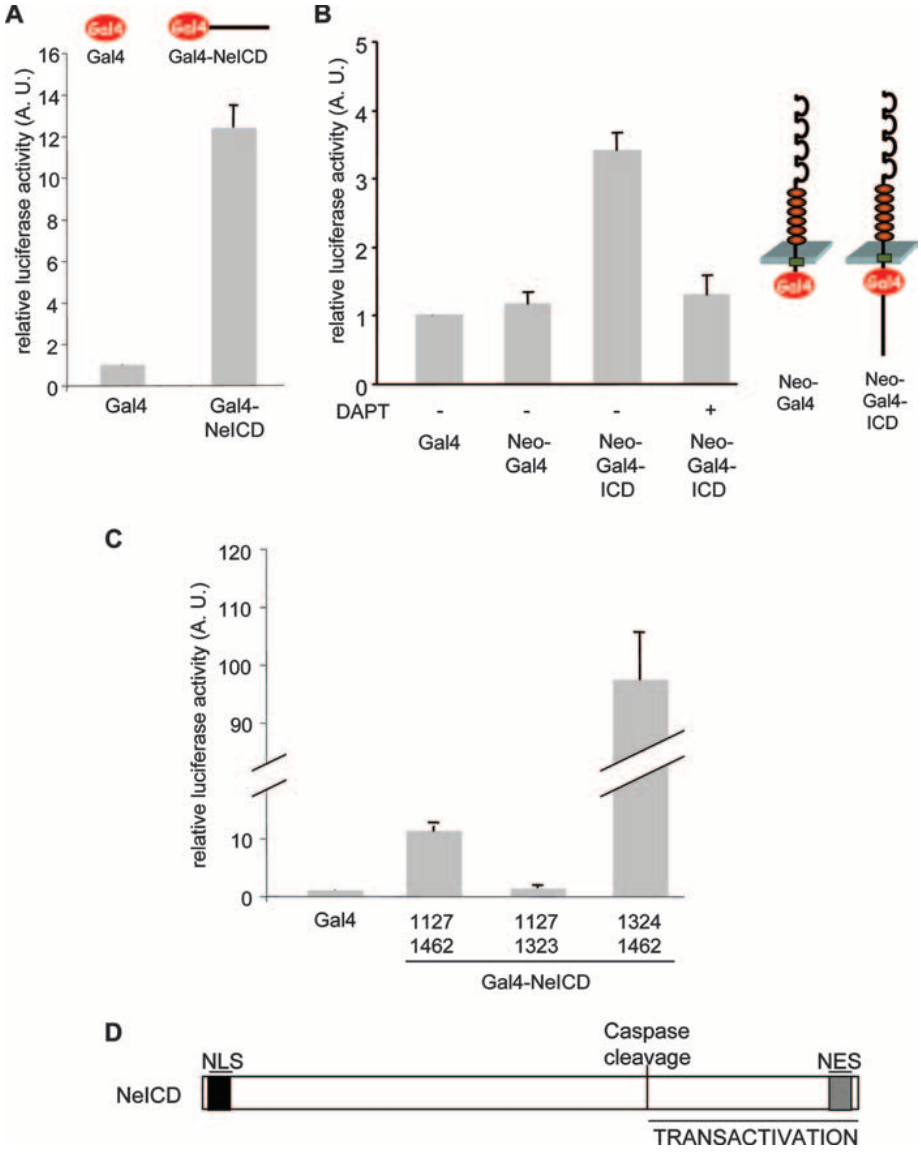


FIG. 5. The NeICD displays a gene-transactivating activity. (A) The NeICD promotes reporter gene transcription. The Gal4-expressing construct or Gal4 DNA binding domain fused to the NeICD as indicated (top) was cotransfected with a Gal4-lucerifase reporter plasmid into HEK293T cells, and luminescence signals were recorded. The relative luciferase activity index is shown as the ratio between the neogenin construct and the control Gal4 vector. Standard errors of the means are indicated. (B) γ-Secretase-dependent NeICD release from full-length neogenin promotes reporter gene transcription. The Gal4 DNA binding domain was inserted into full-length neogenin. The resulting construct, NeoGal4ICD, was cotransfected with a Gal4 luciferase reporter plasmid into HEK293T cells. The NeoGal4 construct lacking the intracellular domain was used as a control. DAPT treatment (2 μM) was performed for 24 h. (C) Same as described above (A), with the indicated deletion mutants of NeICD-Gal4. (D) Scheme representing different functional domains of the NeICD. A.U., arbitrary units.

an indirect effect on RGMa/neogenin alternative signaling, we investigated whether the NeICD could be detected within GRHL1 and CCM2 promoter sequences and whether this detection could be increased upon RGMa treatment. To do so, ChIPs were performed using an anti-NeICD antibody for the pull down in HEK293T cells forced to express neogenin or in MCF-7 cells (which express endogenous neogenin) treated or not treated with RGMa. NeICD binding to GRHL1 and CCM2 promoter sequences was then quantitated by quantitative PCR of GRHL1 and CCM2 promoter sequences. As shown in Fig. 7, while RGMa treatment failed to enhance NeICD binding when the ChIP assay was performed with a control antibody, when the anti-NeICD antibody was used for the ChIP, we detected an increase in NeICD binding to both promoter sequences in response to RGMa. Together, these data support the view that the nuclear translocation and transactivation activities of the NeICD are part of the RGM signaling that occurs through the regulation of the transcription of a specific set of genes.

DISCUSSION

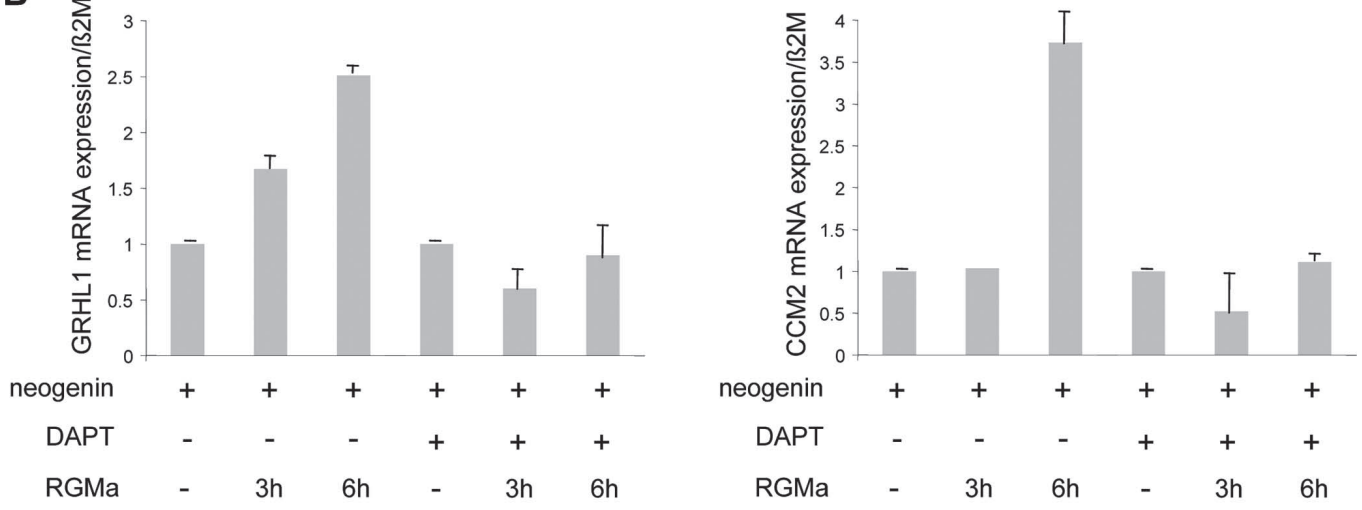
We propose here that neogenin is cleaved at the membrane by γ-secretase, an event that releases an intracellular domain,

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

A

Locus	closest gene	fragment
7p13	CCM2 (Cerebral cavernous malformation 2)	2.8 kb 5'
1p34.3	MACF1 (Microtubule-actin crosslinking factor 1)	intron 1
3p24.3	NR2C2 (Nuclear receptor subfamily 2)	intron 1
17q25.3	Raptor (Regulatory protein associated of mTOR)	8.8kb 3'
2p25.1	GRHL1 (Grainyhead like 1)	3.6kb 5'
3p24.3	SATB1 (Special AT-rich sequence binding protein 1)	1kb 5'
5q13.2	PTCD2 (pentatricopeptide repeat domain 2)	1.7kb 3'
5q31.1	Smad5	30kb 3'
2p16.1	c-REL	intron 3
17q12	SLFN5 (Schlafen family member 5)	0.9kb 3'
10q22.3	C10orf57	intron 3
21q22.3	C21orf25	intron 1

B



C

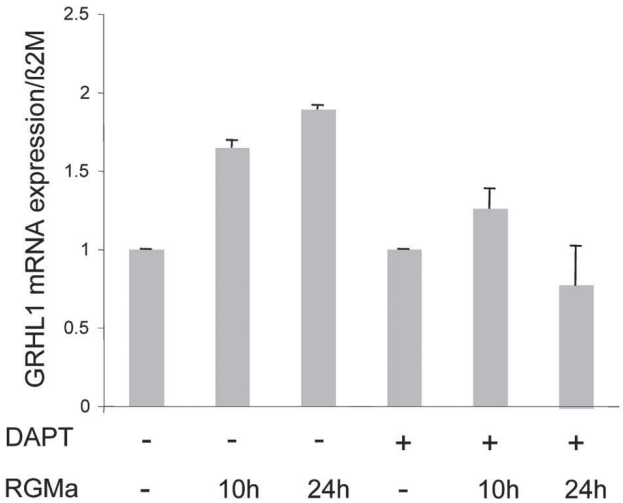


FIG. 6. The NeICD behaves as a transactivator of gene transcription. (A) Different genes in which the NeICD has been shown to interact within their proximities (12 of over 25 clones analyzed). ChIP was performed on the NeICD, and immunoprecipitated DNA was cloned and sequenced. (B) GRHL1 and CCM2 Q-RT-PCR performed on mock- versus neogenin-transfected HEK293T cells treated or not treated for 3 or 6 h with RGMa in the presence or absence of DAPT. CCM2 and GRHL1 mRNA levels are regulated by neogenin/RGM signaling in neogenin-transfected HEK293T cells. Normalization was done on β_2-microglobulin. The CCM2 or GRHL1 level is presented for each condition as a ratio between the normalized neogenin sample to the mock-transfected sample. (C) Same as described above (B), but the GRHL1 mRNA level was determined in RGMa/DAPT-treated MCF7 cells. Normalization was also done with β_2-microglobulin, and the GRHL1 level is presented as a ratio between GRHL1 and β_2-microglobulin.

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

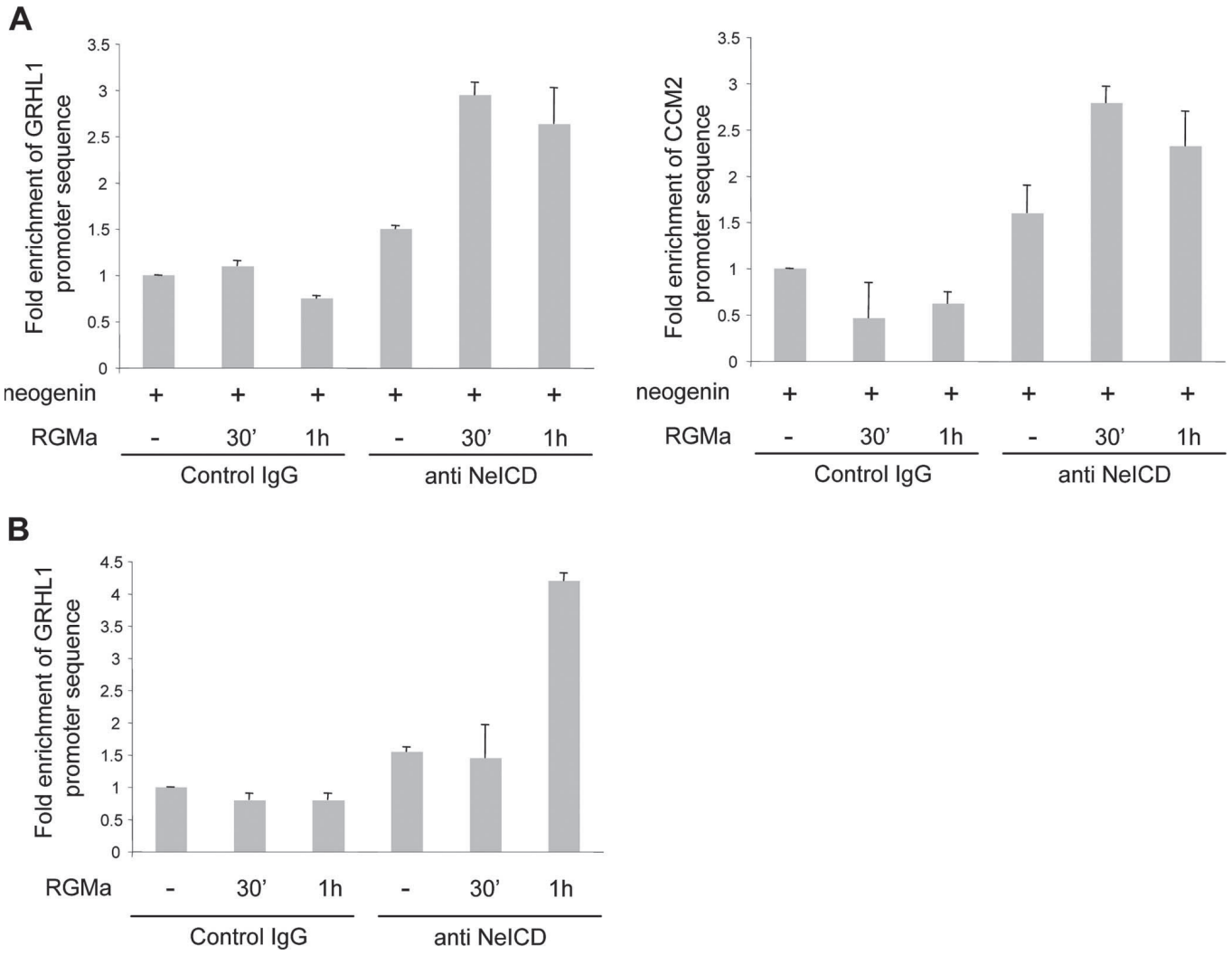


FIG. 7. The NeICD binds target promoters after RGMa stimulation. (A) The NeICD binds GRHL1 and CCM2 promoters upon RGMa stimulation in neogenin-transfected HEK293T cells. Cross-linked chromatin was isolated from untreated and RGMa-treated neogenin-transfected HEK293T cells and precipitated with an NeICD-specific antibody or a control antibody. The precipitated chromatin was used as a template for quantitative PCR. (B) The endogenous NeICD binds the GRHL1 promoter upon RGMa stimulation. Data are the same as described above (A), but the experiment was performed with MCF7 cells untreated or treated with RGMa.

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

which migrates to the nucleus to regulate the transcription of a specific set of genes. Thus, functionally, neogenin resembles the APP or Notch receptors. Interestingly, the Notch intracellular domain is known to recruit histone acetyltransferases but also a transcriptional regulator, RBP-J/CBF1, which is the factor that activates gene transcription per se (2). As shown here, the NeICD also interacts with a histone acetyltransferase, but the factor present in the NeICD/DNA complex that activates transcription remains to be determined.

Another puzzling question is the role of the ligand in this novel neogenin signaling cascade. It has been shown that presence of the ligand stimulates the γ-secretase cleavage of the Notch or Erbb-4 receptors (28, 29). This has not been shown for other receptors such as the growth hormone receptor (10) or APP, even though in the latter case, this is due to the fact that no functional ligand is known for APP. Here, the functional data strongly support the initiating role of the ligand (RGMa) in this signaling: (i) neogenin-mediated transcription of target genes is stimulated in the presence of RGMa, a mechanism dependent on γ-secretase activity, and (ii) in response to RGMa, the NeICD shows an increased binding to target gene promoters. Thus, it is tempting to speculate that RGM controls this signaling. However, at this stage, we have not detected a change in the γ-secretase cleavage of neogenin dependent on the presence of RGM (not shown). This could either suggest that the ligand affects a downstream effect (e.g., nuclear import) or highlight technical difficulties in detecting a subtle change in the amount of a fragment that appears to be tightly regulated (e.g., the proteasome inhibitors MG132 and lactacystin were used to detect the neogenin γ-fragment indicated in Fig. 2).

Even though the elucidation of molecular mechanisms will require further investigation, it is tempting to speculate that ligand-dependent nuclear signaling is important in the context of the different functions of neogenin. For example, it may be important for the guidance activity of RGM. However, one

could wonder how relevant the nuclear translocation of the intracellular domain of a membrane-associated receptor located in the growth cone of neurons would be in the context of RGM-mediated axon guidance. Indeed, neogenin would be cleaved by γ-secretase at the level of the growth cone and then transported to the soma, where the NeICD could enter the nucleus and trigger specific gene transcription and subsequent translation before being transported back to the growth cone, where axon navigation occurs. The requirement of neotranscription in axon guidance has already been supported: for example, transcription factors like NFaT are activated in response to netrin-1 and are required for the netrin-1 response (15). Here, it is interesting that several of the target genes pulled down with the NeICD could turn out to be important in RGM-mediated axon guidance. As an example, CCM2 appears to act as a scaffold for MAPK (37), and the importance of such a scaffold and MAPK activation has been demonstrated in various systems of axon guidance, including netrin-1-mediated axon guidance (4, 13, 27). Future studies should reveal whether direct target genes for the NeICD are important for RGM signaling.

Another putative role of the RGM/neogenin interaction is the inhibition of neogenin's proapoptotic activity. This RGM-dependent nuclear signaling could antagonize the prodeath signaling of neogenin. Even though we have not detected a target gene with a clear antiapoptotic effect at this stage, an interesting hypothesis is that RGM could inhibit neogenin-mediated cell death via a signaling loop that would take neogenin to the nucleus and possibly involve the neogenin-mediated transcription of antiapoptotic genes. In this respect, it is intriguing that neogenin undergoes two antagonistic cleavages in its intracellular domain. The γ-secretase cleavage appears to promote nuclear signaling speculated to be antiapoptotic, i.e., as being ligand mediated, while the caspase cleavage promotes the proapoptotic activity neogenin (19). Of interest, the caspase cleavage not only promotes apoptosis via the exposition of a proapoptotic domain (19) but also separates the NLS domain of neogenin from the neogenin transactivating domain (Fig. 5D). This should theoretically kill the gene transactivation activity of neogenin. Therefore, the engagement toward neogenin-mediated apoptosis should be associated not only with apoptosis promotion by the exposure of the neogenin proapoptotic domain but also with the inhibition of NeICD-mediated transcription.

Future studies will probably stress the importance of this nuclear signaling in neogenin functions. It is then intriguing that neogenin NLSs and NESs appear to be conserved in the different species in which neogenin exists. Similarly, an in silico analysis revealed that the NLS and NES of neogenin are also conserved in DCC (not shown), thus suggesting a conserved role of nuclear signaling in these receptors. We have preliminary results showing that DCC also interacts with TIP60 (not shown). Thus, even though the intracellular domains of DCC and neogenin are only modestly conserved (37%) (26), except in three specific domains called P1, P2, and P3 (23), and taking into account that Notch nuclear signaling is one of the few signaling pathways that has been conserved throughout evolution and is key to controlling cell fate (31), it is tempting to speculate that the neogenin/DCC nuclear signaling pathway is a conserved and important signaling pathway as well.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. N. Robson, T. Sudhof, and S. Douc-Rasy for materials; J. Fitamant and C. Guenebeaud for their advice on breast cancer cell lines; and H. Bilak for text correction.

This work was supported by an institutional grant for CNRS and Centre Léon Bérard, by the Ligue Contre le Cancer, by the NIH (NS45093), by the ARC, by the Region Rhone-Alpes, by the Agence Nationale de la Recherche, and by the Institut National du Cancer. D.G. was supported by fellowships from the Ligue Contre le Cancer and from the Schlumberger Foundation.

REFERENCES

1. **Bernet, A., L. Mazelin, M. M. Coissieux, N. Gadot, S. L. Ackerman, J. Y. Scoazec, and P. Mehlen.** 2007. Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. Gastroenterology **133:**1840–1848.
2. **Bray, S. J.** 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **7:**678–689.
3. **Bredesen, D. E., P. Mehlen, and S. Rabizadeh.** 2005. Receptors that mediate cellular dependence. Cell Death Differ. **12:**1031–1043.
4. **Campbell, D. S., and C. E. Holt.** 2003. Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. Neuron **37:**939–952.
5. **Cao, X., and T. C. Südhof.** 2001. A transcriptively [sic] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. Science **293:**115–120.
6. **Cirulli, V., and M. Yebra.** 2007. Netrins: beyond the brain. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **8:**296–306.
7. **Cokol, M., R. Nair, and B. Rost.** 2000. Finding nuclear localization signals. EMBO Rep. **1:**411–415.
8. **Cole, S. J., D. Bradford, and H. M. Cooper.** 2007. Neogenin: a multi-functional receptor regulating diverse developmental processes. Int. J. Biochem. Cell Biol. **39:**1569–1575.
9. **Conrad, S., H. Genth, F. Hofmann, I. Just, and T. Skutella.** 2007. Neogenin-RGMa signaling at the growth cone is bone morphogenetic protein-independent and involves RhoA, ROCK, and PKC. J. Biol. Chem. **282:**16423–16433.
10. **Cowan, J. W., X. Wang, R. Guan, K. He, J. Jiang, G. Baumann, R. A. Black, M. S. Wolfe, and S. J. Frank.** 2005. Growth hormone receptor is a target for presenilin-dependent gamma-secretase cleavage. J. Biol. Chem. **280:**19331–19342.
11. **Fazeli, A., S. L. Dickinson, M. L. Hermiston, R. V. Tighe, R. G. Steen, C. G. Small, E. T. Stoeckli, K. Keino-Masu, M. Masu, H. Rayburn, J. Simons, R. T. Bronson, J. I. Gordon, M. Tessier-Lavigne, and R. A. Weinberg.** 1997. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. Nature **386:**796–804.
12. **Fearon, E. R., K. R. Cho, J. M. Nigro, S. E. Kern, J. W. Simons, J. M. Ruppert, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, G. Thomas, K. W. Kinzler, et al.** 1990. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science **247:**49–56.
13. **Forcet, C., E. Stein, L. Pays, V. Corset, F. Llambi, M. Tessier-Lavigne, and P. Mehlen.** 2002. Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. Nature **417:**443–447.
14. **Forcet, C., X. Ye, L. Granger, V. Corset, H. Shin, D. E. Bredesen, and P. Mehlen.** 2001. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98:**3416–3421.
15. **Graef, I. A., F. Wang, F. Charron, L. Chen, J. Neilson, M. Tessier-Lavigne, and G. R. Crabtree.** 2003. Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. Cell **113:**657–670.
16. **Kang, J. S., M. J. Yi, W. Zhang, J. L. Feinleib, F. Cole, and R. S. Krauss.** 2004. Netrins and neogenin promote myotube formation. J. Cell Biol. **167:**493–504.
17. **Keino-Masu, K., M. Masu, L. Hinck, E. D. Leonardo, S. S. Chan, J. G. Culotti, and M. Tessier-Lavigne.** 1996. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. Cell **87:**175–185.
18. **Matsunaga, E., H. Nakamura, and A. Chedotal.** 2006. Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance. J. Neurosci. **26:**6082–6088.
19. **Matsunaga, E., S. Tauszig-Delamasure, P. P. Monnier, B. K. Mueller, S. M. Strittmatter, P. Mehlen, and A. Chedotal.** 2004. RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. Nat. Cell Biol. **6:**749–755.
20. **Mazelin, L., A. Bernet, C. Bonod-Bidaud, L. Pays, S. Arnaud, C. Gespach, D. E. Bredesen, J. Y. Scoazec, and P. Mehlen.** 2004. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. Nature **431:**80–84.
21. **Mehlen, P., and D. E. Bredesen.** 2004. The dependence receptor hypothesis. Apoptosis **9:**37–49.
22. **Mehlen, P., and E. R. Fearon.** 2004. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. J. Clin. Oncol. **22:**3420–3428.
23. **Mehlen, P., and C. Furne.** 2005. Netrin-1: when a neuronal guidance cue

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

turns out to be a regulator of tumorigenesis. Cell. Mol. Life Sci. **62:**2599–2616.

24. **Mehlen, P., S. Rabizadeh, S. J. Snipas, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, and D. E. Bredesen.** 1998. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. Nature **395:**801–804.
25. **Mehlen, P., and C. Thibert.** 2004. Dependence receptors: between life and death. Cell. Mol. Life Sci. **61:**1854–1866.
26. **Meyerhardt, J. A., A. T. Look, S. H. Bigner, and E. R. Fearon.** 1997. Identification and characterization of neogenin, a DCC-related gene. Oncogene **14:**1129–1136.
27. **Ming, G. L., S. T. Wong, J. Henley, X. B. Yuan, H. J. Song, N. C. Spitzer, and M. M. Poo.** 2002. Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. Nature **417:**411–418.
28. **Mumm, J. S., E. H. Schroeter, M. T. Saxena, A. Griesemer, X. Tian, D. J. Pan, W. J. Ray, and R. Kopan.** 2000. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. Mol. Cell **5:**197–206.
29. **Ni, C. Y., M. P. Murphy, T. E. Golde, and G. Carpenter.** 2001. γ-Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. Science **294:**2179–2181.
30. **Parent, A. T., N. Y. Barnes, Y. Taniguchi, G. Thinakaran, and S. S. Sisodia.** 2005. Presenilin attenuates receptor-mediated signaling and synaptic function. J. Neurosci. **25:**1540–1549.
31. **Pires-daSilva, A., and R. J. Sommer.** 2003. The evolution of signalling pathways in animal development. Nat. Rev. Genet. **4:**39–49.
32. **Rajagopalan, S., L. Deitinghoff, D. Davis, S. Conrad, T. Skutella, A. Chedotal, B. K. Mueller, and S. M. Strittmatter.** 2004. Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. Nat. Cell Biol. **6:**756–762.
33. **Serafini, T., S. A. Colamarino, E. D. Leonardo, H. Wang, R. Beddington, W. C. Skarnes, and M. Tessier-Lavigne.** 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. Cell **87:**1001–1014.
34. **Serafini, T., T. E. Kennedy, M. J. Galko, C. Mirzayan, T. M. Jessell, and M. Tessier-Lavigne.** 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6. Cell **78:**409–424.
35. **Srinivasan, K., P. Strickland, A. Valdes, G. C. Shin, and L. Hinck.** 2003. Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. Dev. Cell **4:**371–382.
36. **Taniguchi, Y., S. H. Kim, and S. S. Sisodia.** 2003. Presenilin-dependent "gamma-secretase" processing of deleted in colorectal cancer (DCC). J. Biol. Chem. **278:**30425–30428.
37. **Uhlik, M. T., A. N. Abell, N. L. Johnson, W. Sun, B. D. Cuevas, K. E. Lobel-Rice, E. A. Horne, M. L. Dell'Acqua, and G. L. Johnson.** 2003. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. Nat. Cell Biol. **5:**1104–1110.
38. **Wen, W., J. L. Meinkoth, R. Y. Tsien, and S. S. Taylor.** 1995. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. Cell **82:**463–473.

Downloaded from mcb.asm.org at INIST-CNRS DRD on March 11, 2009

Annexe N°3 : Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B.

LETTERS

nature cell biology

Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B

Xiaoling Tang[1,5], Sung-Wuk Jang[1,5], Masashi Okada[1], Chi-Bun Chan[1], Yue Feng[2], Yu Liu[3], Shi-Wen Luo[3], Yan Hong[3], Nicolas Rama[4], Wen-Cheng Xiong[3], Patrick Mehlen[4] and Keqiang Ye[1,6]

Netrins, a family of secreted molecules, have critical functions in axon guidance and cell migration during neuronal development[1,2]. In addition to its role as a chemotropic molecule, netrin-1 also acts as a survival factor[3–7]. Both UNC5 (that is, UNC5A, UNC5B, UNC5C or UNC5D) and DCC are transmembrane receptors for netrin-1 (refs 8, 9). In the absence of netrin-1, DCC and UNC5 act as dependence receptors and trigger apoptosis[3,6,10]. However, how netrin-1 suppresses the apoptotic activity of the receptors remains elusive. Here we show that netrin-1 induces interaction of UNC5B with the brain-specific GTPase PIKE-L. This interaction triggers the activation of PtdIns-3-OH kinase signalling, prevents UNC5B's pro-apoptotic activity and enhances neuronal survival. Moreover, this process relies strongly on Fyn because PIKE-L is tyrosine phosphorylated in response to netrin-1, and the netrin-1-mediated interaction of UNC5B with PIKE-L is inhibited in *Fyn*-null mice. Thus, PIKE-L acts as a downstream survival effector for netrin-1 through UNC5B in the nervous system.

PIKE-L is a brain-specific GTPase, which binds and stimulates PtdIns-3-OH kinase (PI(3)K) in a GTP-dependent manner[11,12]. PIKE-L binds Homer, an adaptor protein for metabotropic glutamate receptor (mGluRI). Activation of mGluRIs enhances the formation of an mGluRI–Homer–PIKE-L complex, leading to the activation of PI(3)K and the prevention of neuronal apoptosis[13]. PIKE is also a substrate for caspases. PIKE can be phosphorylated on tyrosine residues by Fyn, leading to its resistance to caspase cleavage[14]. To search for PIKE-L-binding proteins, we conducted yeast two-hybrid screening with the GTPase domain as bait. Four of 12 clones are both His-positive and β-Gal-positive and one of these four encodes the carboxyl terminus of UNC5B (Fig. 1a). In HEK293 cells, transfected green fluorescent protein (GFP)–PIKE-L selectively binds to the fragment containing amino-acid residues 569–946 of UNC5B but not other fragments. In comparison with the binding by the C-terminal motif (residues 569–946), truncation of death domain (residues 854–946) decreases the affinity of UNC5B for PIKE-L. Reciprocal immunoprecipitation reveals that the interaction occurs regardless of whether PIKE-L or UNC5B is precipitated by its antibody (Fig. 1b, middle panels). Full-length UNC5B and its C-terminal fragment released after cleavage with caspase[5,7] interact specifically with the GTPase domain but not with other regions of PIKE-L, which is consistent with our findings with yeast two-hybrid screening (Fig. 1b, right panels). We also observed the robust interaction between endogenous PIKE-L and UNC5B in both the cortex and hippocampus of rat brain (Fig. 1c). Immunostaining of hippocampal and cortical primary neurons reveals that PIKE-L and UNC5B colocalize in the cell body and throughout all neuronal processes (Fig. 1d, left panel). The staining is specific, because antigen against glutathione *S*-transferase (GST)–PIKE-L (residues 268–384) but not against control GST abolishes PIKE-L staining in neurons (Fig. 1d, right panels).

To examine whether netrin-1 modulates PIKE-L interaction with UNC5B, we co-transfected UNC5B into HEK293 cells with wild-type or dominant-negative PIKE-L-KS (K413AS414N). This mutant cripples the GTPase activity of PIKE-L, which binds PI(3)K but fails to activate it[11,12]. In comparison with the control, netrin-1 elicits PIKE-L interaction with UNC5B; by contrast, PIKE-L-KS fails to bind UNC5B regardless of stimulation with netrin-1 (Fig. 2a), indicating that GTPase activity is essential for the association. Coimmunoprecipitation demonstrates that PIKE-L does not bind to a death domain containing p75NTR or UNC5A, but it associates faintly with UNC5C irrespective of treatment with netrin-1 (data not shown), suggesting that PIKE-L interacts specifically with UNC5B in response to netrin-1.

PIKE can be phosphorylated on tyrosine residues by Fyn[14]. Netrin-1 has also been shown to trigger the tyrosine phosphorylation of its receptor, DCC[15–18]. To test whether phosphorylation on tyrosine modulates the interaction between PIKE-L and UNC5B, we pretreated the co-transfected HEK293 cells with several tyrosine kinase inhibitors, followed by netrin-1. Netrin-1-mediated interaction between PIKE-L and UNC5B is selectively disrupted by genistein, PP2 and compound 5. PP2 is a selective

[1]Department of Pathology and Laboratory Medicine, and [2]Department of Pharmacology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30322, USA. [3]Institute of Molecular Medicine & Genomics and Department of Neurology, Medical College of Georgia, Augusta, GA 30809, USA. [4]Apoptose, Cancer et Développement, CNRS UMR5238, University of Lyon, Centre Léon Bérard, Équipe 'La Ligue', 28 rue Laennec, 69008 Lyon, France.
[5]These authors contributed equally to this work.
[6]Correspondence should be addressed to K.Y. (e-mail: kye@emory.edu)

Received 23 January 2008; accepted 29 February 2008; published online 11 May 2008; DOI: 10.1038/ncb1732

© 2008 Nature Publishing Group

a

Library	No. of transformants	No. of His$^+$	No. of His$^+$ and β-Gal$^+$
Human fetal brain cDNA Library (Clontech)	1.7×10^9 ml^{-1}	12	4
AD fusion protein (pACT2)	BD fusion protein (PAS2-1)	Histidine prototrophy	-gal filter assay
UNC5B (569–946)	PIKE-GTPase	+	+
pACT2	PIKE-GTPase	–	–
UNC5B (569–946)	PAS2-1	–	–

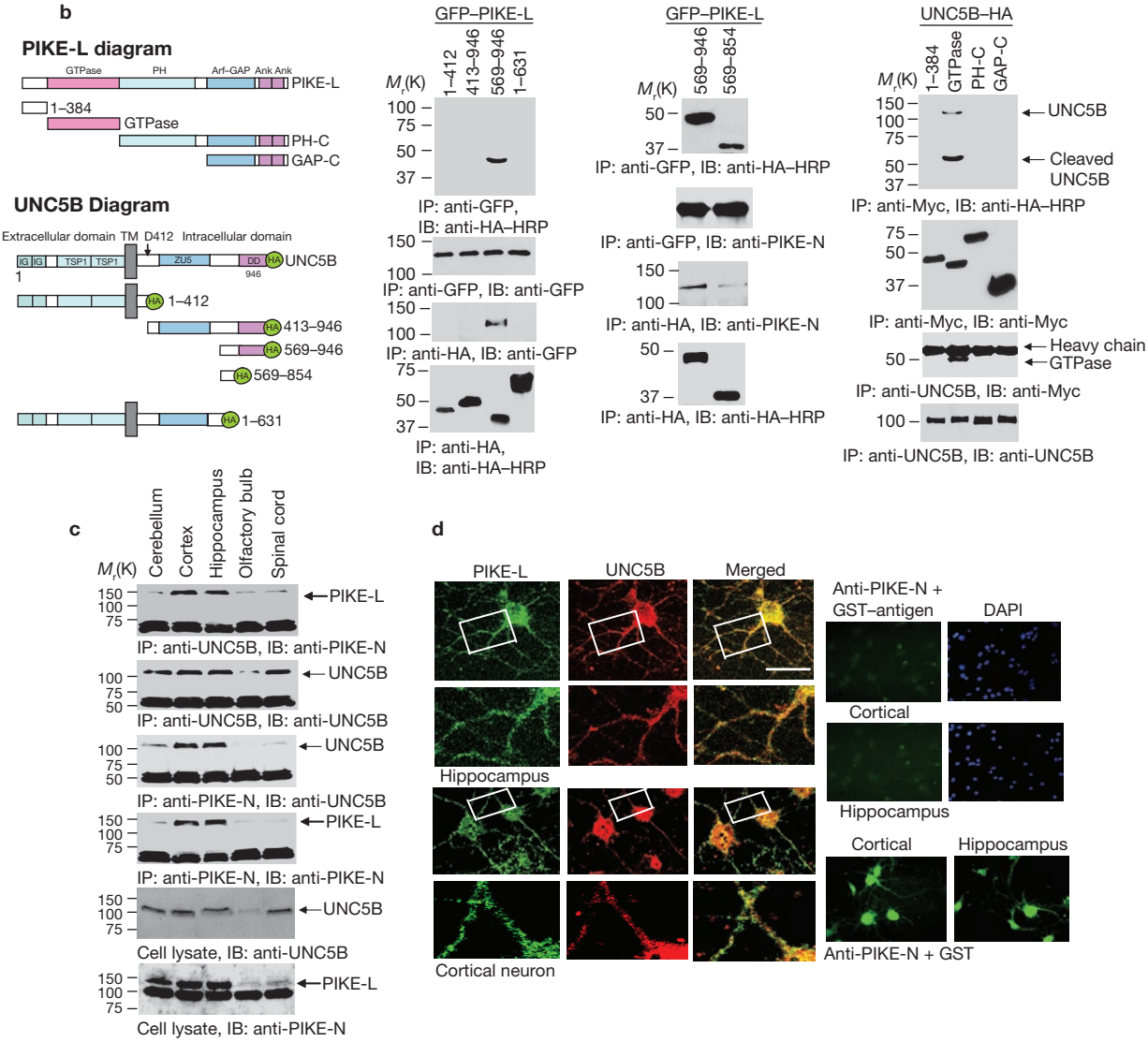


Figure 1 PIKE-L interacts with UNC5B. (**a**) PIKE-GTPase interacts with UNC5B (residues 569–946) in a yeast two-hybrid system. (**b**) Interaction of PIKE-GTPase and UNC5B in HEK293T cells. Left: diagram of PIKE-L and UNC5B. In one set of experiments, fragments of UNC5B were co-transfected with GFP–PIKE-L to HEK293T cells. In the other set, fragments of PIKE-L were co-transfected with UNC5B–HA. An immunoprecipitation assay showed that UNC5B residues 569–946 interacted with PIKE-L, and truncation of the death domain (residues 855–946) decreased the binding affinity (centre top panels); reciprocal immunoprecipitation of UNC5B confirmed this finding (centre third panels). The PIKE-GTPase domain bound to UNC5B (right top and third panels). (**c**) Interaction of PIKE-L and UNC5B in rat brain tissues. Brain homogenates from different sections were subjected to western blotting with UNC5B antibody and PIKE-N antibody, respectively (fifth and bottom panels). UNC5B antibody was incubated with brain homogenates and the immunocomplexes were probed with anti-PIKE-N antibody. PIKE-L strongly bound to UNC5B in cortex and hippocampus (top panel). Reciprocal immunoprecipitation (IP) with anti-PIKE-N showed similar results (third panel). IB, immunoblotting. Uncropped images of blots are shown in Supplementary Information, Fig. S6. The second and fourth panels show verification of PIKE-L and UNC5B in the immunocomplex. (**d**) PIKE-L and UNC5B colocalize in the cell body and neuronal processes of rat hippocampus and cortical neurons (left panels). Scale bar, 10 μm. Preincubation with anti-GST–PIKE-L (residues 268–384) antigen but not with control GST abolished PIKE-L neuronal staining (right panels).

inhibitor of Fyn, whereas genistein and compound 5 are tyrosine kinase inhibitors. By contrast, daidzein and PP3, inactive controls for genistein and PP2, respectively, fail to dissociate the complex (Fig. 2b, top panel). Thus, netrin-1 triggers tyrosine phosphorylation on both PIKE-L and UNC5B, which are selectively blocked by genistein, PP2 and compound 5 (Fig. 2b, second panel). In primary cortical cultures, netrin-1 elicits the

© 2008 Nature Publishing Group

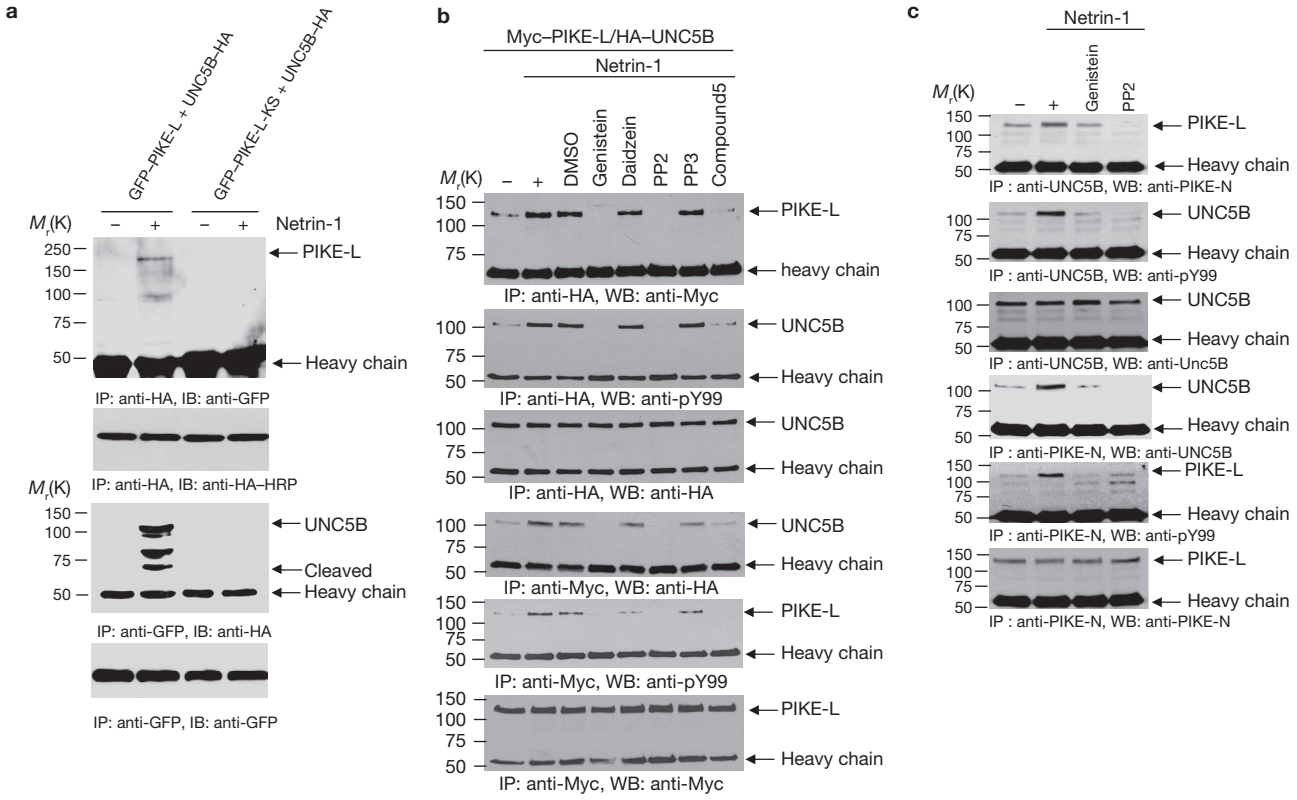


Figure 2 Netrin-1 mediates the interaction between PIKE-L and UNC5B through tyrosine phosphorylation. (**a**) Netrin-1 enhances binding of PIKE-L but not dominant-negative PIKE-L-KS to UNC5B. Both full-length UNC5B and its fragments strongly bound to PIKE-L (top and third panels). Equal amounts of HA–UNC5B and GFP–PIKE-L were immunoprecipitated (second and bottom panels). (**b**) PP2 and tyrosine kinase inhibitors disrupt the interaction between PIKE-L and UNC5B in HEK293T cells. GFP–PIKE-L and UNC5B–HA were co-transfected to HEK293T cells. After 24 h, cells were treated with different tyrosine inhibitors (10 nM PP2; 5.4 μM PP3, an inactive analogue of PP2; 1 μM genistein; 300 μM daidzein, an inactive analogue of genistein; and 0.4 μM compound 5 for 30 min, followed by treatment with 200 ng ml^{-1} netrin-1 for 24 h. UNC5B and PIKE-L were immunoprecipitated by anti-HA and anti-Myc antibodies, respectively. PIKE-L bound weakly to UNC5B under control conditions; netrin-1 enhanced the association. Geinistein, PP2 and compound 5, which substantially abolished PIKE-L and UNC5B phosphorylation, blocked the interaction between PIKE-L and UNC5B; in contrast, the inactive compounds did not (top, second, fourth and fifth panels). Uncropped images of blots are shown in Supplementary Information, Fig. S6. The third and bottom panels show verification of immunoprecipitated PIKE-L and UNC5B.
(**c**) Tyrosine kinase inhibitor PP2 disrupts the interaction between endogenous PIKE-L and UNC5B in neurons. Rat cortical neurons were treated with various tyrosine kinase inhibitors. Endogenous UNC5B and PIKE-L were immunoprecipitated. PP2 completely disrupted the interaction between PIKE-L and UNC5B in rat cortical neurons, and genistein partly decreased the association (top and fourth panels). Netrin-triggered UNC5B and PIKE-L tyrosine phopshorylation was inhibited by PP2 and decreased by genistein (second and fifth panels). Uncropped images of blots are shown in Supplementary Information, Fig. S6. The third and bottom panels show verification of immunoprecipitated UNC5B and PIKE-L.

binding of endogenous PIKE-L to UNC5B; this binding is blocked by pretreatment with PP2, and genistein also decreases the interaction (Fig. 2c, top panel). PIKE-L tyrosine phosphorylation is substantially abolished by pretreatment with PP2 or genistein. UNC5B tyrosine phosphorylation is clearly blocked by PP2 and is partly prevented by genistein (Fig. 2c, second and fifth panels).

To explore whether Fyn contributes to the phosphorylation of UNC5B or PIKE-L, we co-transfected UNC5B into HEK293 cells with various tyrosine kinases. Coimmunoprecipitation showed that constitutively active FynA, but not kinase-dead FynD or other tyrosine kinases including Src and Pyk2, interacts with UNC5B (Supplementary Information, Fig. S1a, left panels). Moreover, FynA also elicits robust tyrosine phosphorylation on UNC5B. The 100-kDa band below UNC5B might be an unknown tyrosine-phosphorylated protein associated with UNC5B (Supplementary Information, Fig. S1a, top centre panel). We conducted similar experiments with PIKE-L and found that FynA, but not FynD or other tyrosine kinases, selectively bound and phosphorylated PIKE-L (Supplementary Information, Fig. S1b). Coimmunoprecipitation demonstrates that PIKE-L binds UNC5B tightly in FynA-co-transfected, but not FynD-co-transfected, cells even in the absence of netrin-1, regardless of whether PIKE-L or UNC5B is immunoprecipitated (Supplementary Information, Fig. S1c, top left panels). Both UNC5B and PIKE-L are potently phosphorylated in FynA-transfected, but not FynD-transfected, cells (Supplementary Information, Fig. S1c, middle panels). In particular, in comparison with FynD cells, apoptotic cleavage of PIKE-L is partly decreased in FynA cells (Supplementary Information, Fig. S1c, right lower panel), an effect similar to that in netrin-1-treated cells. PIKE-A is mainly phosphorylated by Fyn on residues Y681 and Y774 (ref. 14), which correspond to Y1032 and Y1124 in PIKE-L. Immunoprecipitation assay reveals that wild-type PIKE-L interacts strongly with UNC5B, whereas Y1032F, Y1124F and Y1032, 1124F mutants fail to interact with UNC5B. As expected, wild-type PIKE-L is clearly tyrosine phosphorylated, which is abolished in PIKE-L mutants (Fig. 3a, top and second panels). Reciprocal immunoprecipitation reveals similar results (Fig. 3a,

© 2008 Nature Publishing Group

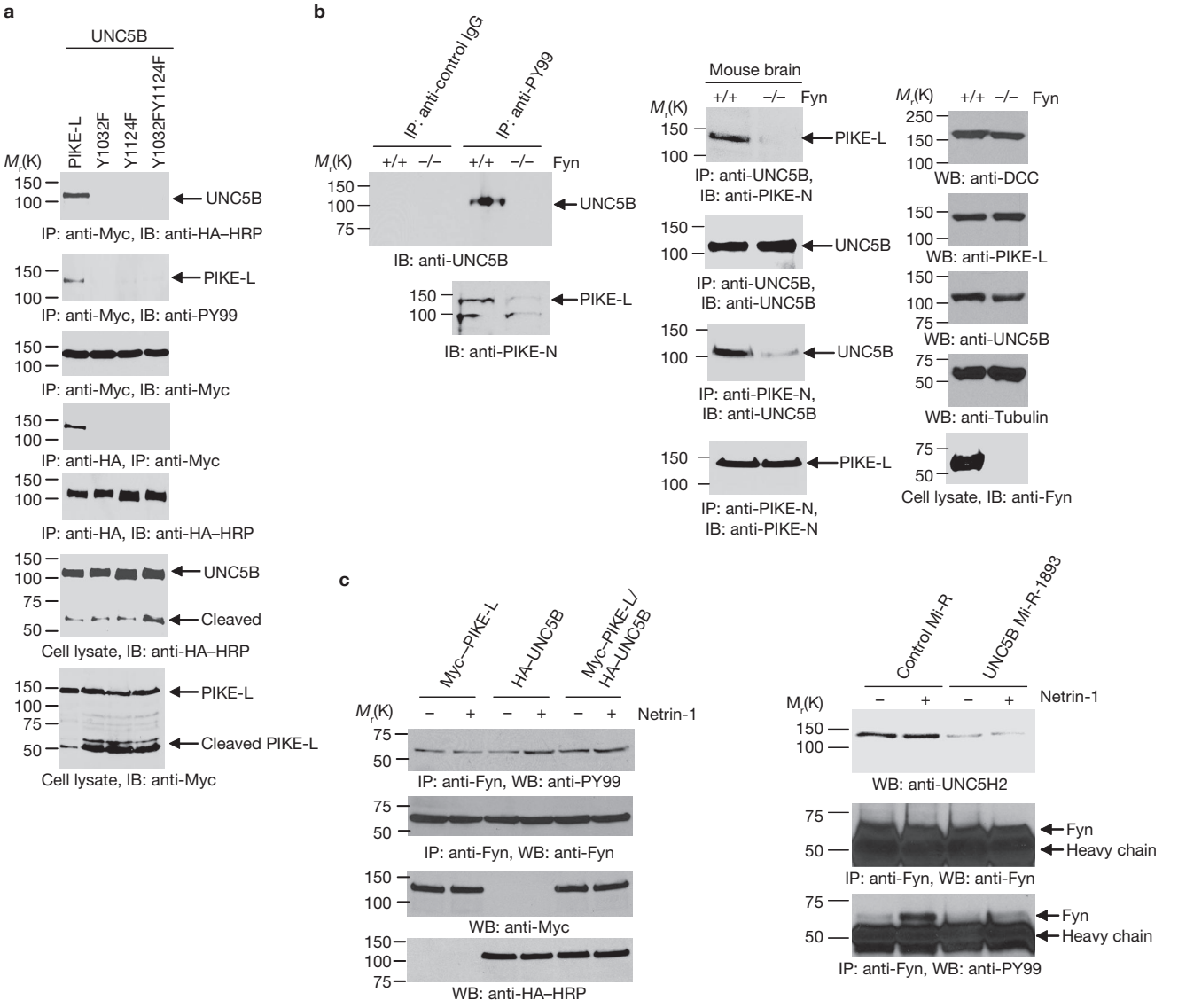


Figure 3 Interaction of PIKE-L and UNC5B is regulated by Fyn tyrosine kinase. (**a**) Tyrosine phosphorylation of PIKE-L is required for the interaction between PIKE-L and UNC5B. HEK293T cells were co-transfected with UNC5B and PIKE-L wild-type, Y1032F, Y1124F and Y1032FY1124F, respectively, followed by treatment with netrin-1. PIKE-L, but not tyrosine phosphorylation-deficient mutants, selectively associated with UNC5B (top and fourth panels). Netrin-1 provoked tyrosine phosphorylation of PIKE-L (second panel). The third, fifth and sixth panels show verification of immunoprecipitated and transfected constructs. Netrin treatment decreased wild-type PIKE-L but not mutant cleavage (bottom panel). (**b**) Tyrosine phosphorylation of PIKE-L and UNC5B is required for interaction in the mouse brain. Brain homogenates from wild-type and *Fyn*$^{-/-}$ mice were immunoprecipitated with control IgG and anti-PY99, respectively, followed by immunoblotting with anti-UNC5B or anti-PIKE-N. Tyrosine phosphorylated UNC5B can be detected only in wild-type but not *Fyn*-null brain lysates (left upper panel). PIKE-L tyrosine phosphorylation was diminished in the *Fyn*-null sample (left lower panel). The interaction between PIKE-L and UNC5B can be detected in wild-type but not in *Fyn*$^{-/-}$ brain (middle panels). Expression levels of PIKE-L, DCC and UNC5B remained similar in both wild-type and *Fyn*$^{-/-}$ brain (right panels). (**c**) Netrin-1-triggered Fyn activation is UNC5B dependent. HEK293 cells were transfected with Myc–PIKE-L and HA–UNC5B alone or in combination. The transfected cells were treated with netrin-1 for 24 h. Endogenous Fyn was immunoprecipitated and its activation was verified by immunoblotting with anti-PY99 antibody. Netrin-1 provoked Fyn activation only in cells expressing UNC5B. Co-transfection of PIKE-L and UNC5B elicited Fyn activation in the absence of netrin (left top panel, lane 5). Treatment with netrin-1 further enhanced Fyn phosphorylation. An equal amount of Fyn was pulled down (second panel). The left third and bottom panels show verification of transfected UNC5B and PIKE-L. Right: depletion of UNC5B diminished the stimulatory effect of netrin-1 on Fyn. Cortical neurons were electroporated with microRNA (Mi-R) of UNC5B, followed by netrin-1 stimulation. In control neurons, netrin-1 triggered Fyn activation, which was diminished in UNC5B-depleted neurons (right bottom panel). Uncropped images of blots are shown in Supplementary Information, Fig. S6. The right top and second panels show verification of UNC5B expression and immunoprecipitated Fyn.

fourth and fifth panels), suggesting that tyrosine phosphorylation of PIKE-L is necessary for its association with UNC5B. To explore further whether Fyn regulates the association between PIKE-L and UNC5B, we conducted immunoprecipitation with wild-type and *Fyn*$^{-/-}$ mice. UNC5B robustly interacts with PIKE-L in wild-type but not *Fyn*$^{-/-}$ mouse brain (Fig. 3b), indicating that Fyn is required for the association. Anti-PY99 antibody, but not control IgG, selectively pulls down UNC5B and PIKE-L from wild-type, but not *Fyn*$^{-/-}$, brain lysates, suggesting

© 2008 Nature Publishing Group

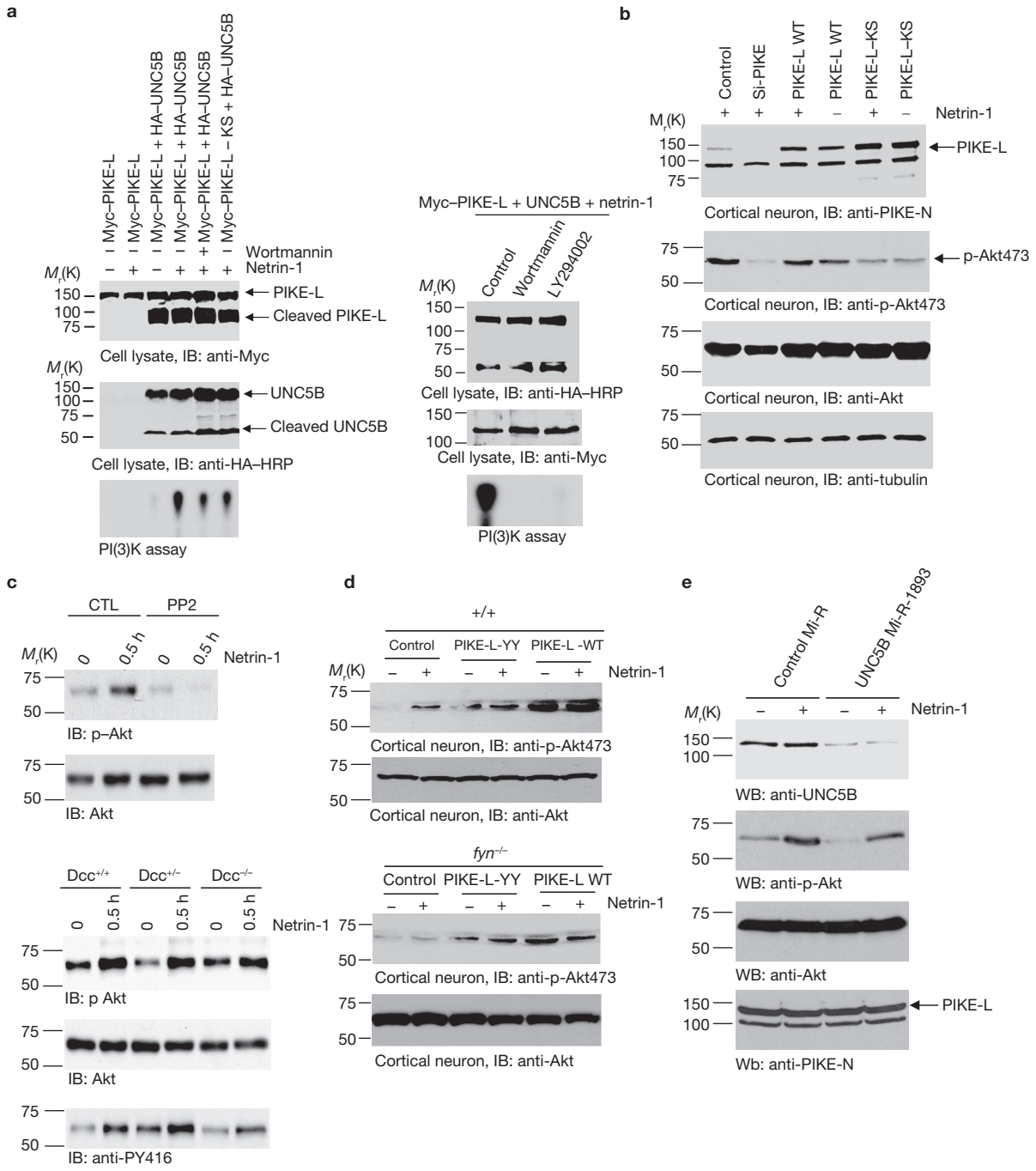


Figure 4 PIKE-L and Fyn are necessary for netrin-1-triggered PI(3)K activation. (**a**) Netrin-1 enhances PIKE-L-induced PI(3)K activity in HEK293T cells. HEK293T cells were transfected with Myc–PIKE-L in the presence or absence of UNC5B and treated as indicated. P110α was immunoprecipitated and PI(3)K assay was conducted with the immunocomplex. In the absence of UNC5B, no PI(3)K activity was detected regardless of treatment with netrin-1. Netrin-1 increased PI(3)K activity when PIKE-L and UNC5B were co-transfected. PI(3)K activity was decreased by wortmannin (10 nM) or dominant-negative PIKE-L-KS (left bottom panel). The left top and second panels show verification of transfected constructs. Right bottom panel: wortmannin (50 nM) and LY294002 (10 μM) completely blocked netrin-1 triggered PI(3)K activity. (**b**) PIKE-L is necessary for netrin-1-induced PI(3)K activation in neurons. Cortical neurons were infected with control adenovirus, Si-PIKE, PIKE-L wild-type (WT) or PIKE-L-KS adenovirus followed by treatment with netrin-1 as indicated. In comparison with control, depletion of PIKE-L abolished netrin-triggered Akt phosphorylation, which was enhanced in PIKE-L-infected but not PIKE-L-KS-infected neurons (second panel). The expression of PIKE-L was verified (top panel). Akt and loading control tubulin were verified (third and bottom panels). (**c**) PP2 blocks Akt activation. Cortical neurons were pretreated with PP2, followed by stimulation with netrin. Netrin-provoked Akt phosphorylation was abolished by PP2 (top panel). Netrin-provoked Akt phosphorylation was slightly decreased in *Dcc*$^{-/-}$ neurons (third panel). Activation of Src family tyrosine kinases were attenuated in DCC-knockout mice, as manifested by anti-PY416, an antibody specific for active Src tyrosine kinases (fifth panel). (**d**) Netrin-triggered PI(3)K/Akt activation is crippled in *Fyn*$^{-/-}$ neurons. Wild-type and *Fyn*$^{-/-}$ cortical neurons were infected with adenovirus expressing wild-type PIKE-L or PIKE-L(Y1032, 1124F) mutant, and treated with netrin-1 for 30 min. (**e**) UNC5B is critical for netrin-1-triggered activation of Akt. Depletion of UNC5B diminished Akt activation by netrin-1 in cortical neurons (second panel). PIKE-L remained intact regardless of UNC5B expression levels (top and bottom panels).

© 2008 Nature Publishing Group

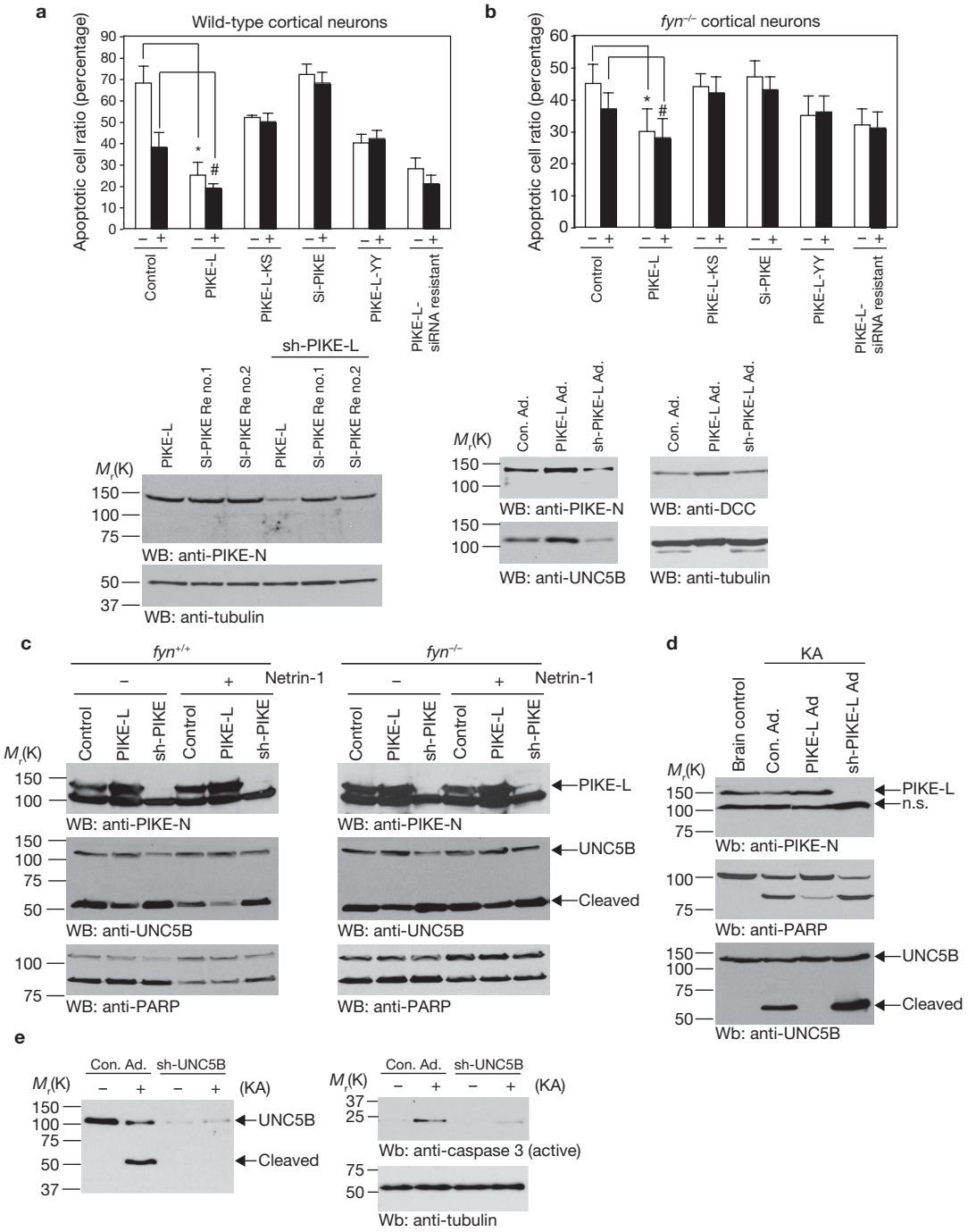


Figure 5 PIKE-L and Fyn are essential for the neuronal survival effect induced by netrin-1. (**a**) Netrin-1 facilitates the anti-apoptotic effect of PIKE-L. Cortical neurons were infected with adenovirus at 7 days *in vitro* (DIV7) as indicated and treated with 80 μM glutamate for 16–18 h in the presence or absence of netrin-1. Upper panel: quantification of apoptotic assay. Lower panels: verification of siRNA resistant PIKE-L clones. Error bars represent s.d. Asterisk, $P < 0.005$; hash sign, $P < 0.01$; P values were calculated with Student's t-test. (**b**) Apoptotic assay with *Fyn*$^{-/-}$ neurons. Wild-type and *Fyn*$^{-/-}$ neurons were treated with or without netrin-1, followed by 80 μM glutamate for 12–14 h. The anti-apoptotic effect of netrin-1 was impaired in *Fyn*$^{-/-}$ neurons (upper panels). Error bars represent s.d. Asterisk, $P < 0.01$; hash sign, $P < 0.005$; P values were calculated with Student's t-test. Lower panels: verification of DCC and UNC5B expression levels when PIKE-L was overexpressed or depleted in cortical neurons. (**c**) PIKE-L and Fyn are required for the anti-apoptotic activity of netrin-1. Cortical neurons were infected and treated as described above. (**d**) PIKE-L prevents the proteolytic cleavage of UNC5B, suppressing apoptosis. Mouse brain was injected with adenovirus expressing PIKE-L or its shRNA. After 5 days the mice were injected intraperitoneally with 25 mg kg^{-1} KA. After a further 4 days, the samples were analysed by immunoblotting. Overexpression of PIKE-L inhibited kainic acid-triggered UNC5B cleavage, whereas depletion of PIKE-L escalated UNC5B degradation and PARP cleavage. Uncropped images of blots are shown in Supplementary Information, Fig. S6. (**e**) Elimination of UNC5B attenuates apoptosis. Mouse brain was injected with control adenovirus or adenovirus expressing shRNA of UNC5B. After 5 days, KA was injected to trigger neuronal cell death in the mice. Five mice were used in each group for both control and shRNA of UNC5B. Adenoviral vector expressed GFP independently. Brain sections were examined under a fluorescent microscope. Cells labelled with GFP in brain also expressed UNC5B or PIKE-L-specific siRNA.

© 2008 Nature Publishing Group

that UNC5B and PIKE-L are strongly tyrosine phosphorylated in wild-type, but not *Fyn*-null, mice (Fig. 3b, left panels). To explore whether netrin-1 triggers Fyn activation through UNC5B, we tested this notion in HEK293 cells, which were transfected with PIKE-L or UNC5B alone or in combination. Netrin-1 elicits a UNC5B-dependent Fyn activation. Co-transfection of both PIKE-L and UNC5B enhances Fyn activation on treatment with netrin-1 (Fig. 3c, top left panel). Depletion of UNC5B in cortical neurons abolishes netrin-1-provoked Fyn activation (Fig. 3c, bottom right panel), underscoring that UNC5B is crucial for Fyn activation. Thus, Fyn has a critical function in regulating UNC5B–PIKE-L complex formation in mouse brain.

Netrin-1 activates PI(3)K, which is essential to the role of netrin-1 in axon guidance[19–21]. To assess whether UNC5B–PIKE-L complex has any role in mediating netrin-1-provoked PI(3)K activation, we transfected HEK293 cells with PIKE-L and UNC5B. In the absence of UNC5B, netrin-1 fails to provoke PI(3)K activity in PIKE-L-transfected cells, whereas netrin-1 elicits robust PI(3)K activity in cells co-transfected with wild-type PIKE-L and UNC5B. This netrin-1-dependent PI(3)K activation is decreased in cells pretreated with wortmannin or LY294002, or when a dominant-negative PIKE-L mutant is transfected (Fig. 4a, bottom panel). These data suggest that netrin-1-triggered PI(3)K activation is mediated by PIKE-L. To explore whether PIKE-L is necessary for this action, we infected cortical neurons with various adenoviruses expressing short hairpin (sh) RNA of PIKE, wild-type PIKE-L or PIKE-L-KS, and monitored Akt phosphorylation. Netrin-1-provoked PI(3)K activity is substantially decreased when PIKE-L is depleted. Infection of PIKE-L increases the stimulatory effect of netrin-1 on PI(3)K, which is massively attenuated in PIKE-L-KS-infected cells (Fig. 4b, second panel).

To evaluate whether Fyn mediates netrin-induced PI(3)K activity, we pretreated primary neurons with PP2, and stimulated cells with netrin-1 for 30 min. Netrin-1 induces potent Akt activation, which is completely blocked by PP2 (Fig. 4c, top panel), suggesting that Fyn is essential for netrin-1 to elevate PI(3)K activity. In comparison with wild-type neurons, netrin-1-triggered activation of Akt is decreased only slightly in *Dcc*$^{-/-}$ neurons, indicating that DCC is not the major receptor for this effect (Fig. 4c, third panel). Moreover, activation of Src family tyrosine kinases is partly diminished in *Dcc*-null neurons (Fig. 4c, bottom panel), suggesting that DCC contributes to the activation of Src-family tyrosine kinases by netrin-1. To explore the physiological role of Fyn in regulating PI(3)K activation by netrin-1, we monitored the activation of Akt in wild-type and Fyn knockout neurons. Netrin-1 strongly elicits PI(3)K activation in wild-type neurons, and PIKE-L further enhances its effect. Strikingly, PIKE-L(Y1032, 1124F) fails to increase the activation of Akt by netrin-1 (Fig. 4d, top panel), indicating that binding of PIKE-L to UNC5B is essential for PI(3)K activation by netrin-1. As expected, netrin-1 fails to activate Akt in *Fyn*$^{-/-}$ neurons, regardless of PIKE-L expression (Fig. 4d, third panel). PI(3)K activation status tightly couples to Akt phosphorylation (data not shown). Depletion of UNC5B in cortical neurons clearly attenuates Akt activation. Nonetheless, the expression level of PIKE-L remains constant irrespective of UNC5B alteration (Fig. 4e). Taken together, these findings support the notion that UNC5B, but not DCC, is essential for mediating the netrin-1-provoked activation of PIKE-L-dependent PI(3)K/Akt signalling.

To determine whether PIKE-L modulates the anti-apoptotic action of netrin-1, we infected primary neuronal cultures with various adenoviruses and provoked apoptosis with glutamate, a broadly used excitatory amino acid neurotransmitter for neuronal cell death. In control neurons, netrin-1 clearly blocks glutamate-triggered apoptosis. Infection of wild-type PIKE-L with adenoviruses strongly suppresses apoptosis, and netrin-1 further enhances the protective effect. By contrast, the anti-apoptotic effect of netrin-1 is reduced in PIKE-L-KS-infected neurons. Moreover, knocking down PIKE-L almost completely abolishes the survival activity of netrin-1. The shRNA-resistant PIKE-L mutant infection restores the survival effect, which is suggestive of the specificity of the short interfering RNA (siRNA) effect. The Fyn-phosphorylation-deficient mutant PIKE-L(Y1032, 1124F) also attenuates apoptosis, but it is non-responsive to netrin-1 (Fig. 5a). Thus, binding of PIKE-L to UNC5B is necessary for the anti-apoptotic effect of netrin-1. The anti-apoptotic activity of PIKE-L couples to its stimulatory effects on PI(3)K in netrin-1-treated cells. In *Fyn*$^{-/-}$ neurons, the anti-apoptotic effect of netrin-1 is substantially impaired. PIKE-L(Y1032, 1124F) modestly represses apoptosis in a netrin-independent manner. Wild-type PIKE-L decreases apoptosis, but netrin-1 fails to enhance its survival activity (Fig. 5b, upper panel), supporting the notion that Fyn is required for PIKE-L to mediate the anti-apoptotic effect of netrin-1. Depletion of PIKE-L slightly decreases the expression level of UNC5B but not that of DCC. Overexpression of PIKE-L enhances the expression of UNC5B and DCC, indicating that PIKE-L stabilizes netrin-1 receptors in neurons (Fig. 5b, lower panels). In the absence of netrin-1, depletion of PIKE-L enhances UNC5B cleavage and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) fragmentation in wild-type neurons elicited by glutamate; these effects are attenuated by PIKE-L overexpression. Netrin-1 further elevates the anti-apoptotic effect of PIKE-L. In the absence of PIKE-L, netrin-1 fails to block apoptotic cleavage of PARP and UNC5B (Fig. 5c, left panel). In contrast, in *Fyn*$^{-/-}$ neurons, netrin-1 loses its anti-apoptotic effect, because PARP and UNC5B are robustly cleaved whether netrin-1 is present or not. Nevertheless, overexpression of PIKE-L slightly decreases UNC5B cleavage (Fig. 5c, right panels).

Excitotoxic neuronal cell death in the brain is often induced experimentally by the administration of kainic acid (KA), a potent agonist of the α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/kainate class of glutamate receptors[22]. Depletion of PIKE-L in the hippocampus by injecting adenovirus expressing its shRNA into mouse brain enhances UNC5B cleavage triggered by KA, whereas overexpression of PIKE-L completely suppresses UNC5B degradation. Accordingly, PARP cleavage, a marker for apoptosis, is tightly correlated with PIKE-L expression levels (Fig. 5d). Because UNC5B-knockout mice are embryonic lethal[23], we cannot use the UNC5B-deficient mice to explore its role in neuronal apoptosis. Alternatively, we deplete UNC5B in mouse brain by using adenovirus expressing its shRNA. In comparison with control, elimination of UNC5B from the hippocampus clearly blocks KA-provoked apoptosis in mouse brain (Fig. 5e), underscoring the possibility that UNC5B is implicated in neuronal cell death *in vivo*. Taken together, our data show that netrin-1 triggers the formation of a PIKE-L–UNC5B complex, which is regulated by Fyn tyrosine kinase and represses neuronal apoptosis.

Our finding that PI(3)K is coupled to UNC5B through PIKE-L in response to netrin-1, suppressing neuronal apoptosis, provides a molecular mechanism that explains the stimulatory effect of netrin-1 on PI(3)K. Conceivably, this active effect of netrin-1 activity on PI(3)K is associated with the activation of PI(3)K by PIKE-L. PIKE activates PI(3)K in a GTP-dependent manner[11]. Phospholipase C (PLC)-γ1

© 2008 Nature Publishing Group

acts as a physiological guanine nucleotide-exchange factor (GEF) for PIKE[12]. It has recently been shown that netrin-1 induces the activation of PLC-γ1, which is mediated by DCC but not by UNC5B or neogenin[24]. Presumably, PLC-γ1 is activated by netrin-1 and functions as a GEF for PIKE-L. The *in vitro* binding study reveals that the cytoplasmic domain of DCC associates with PIKE-L, and coimmunoprecipitation also indicates that DCC interacts with PIKE-L in brain lysates, for which Fyn might not be essential (Supplementary Information, Fig. S2a–c). These data provide a molecular mechanism explaining the activation of PIKE-L in response to extracellular stimuli such as netrin-1. Netrin-1 provokes the association between DCC and UNC5B (ref. 25). We found that PIKE-L or Fyn triggers DCC–UNC5B complex formation even in the absence of netrin-1. Netrin-1 further elevates the binding between DCC and UNC5B in the presence of PIKE-L or Fyn (Supplementary Information, Fig. S2d). Conceivably, Fyn and PIKE-L have critical functions in mediating the netrin-1-triggered formation of a DCC–UNC5B heterodimer in neurons. UNC5B mediates apoptosis through death-associated protein kinase (DAPK)[7]. However, neither PIKE-L nor Fyn affects the association between UNC5B and DAPK (data not shown). In addition, PIKE-L does not regulate UNC5B-dependent DAPK activation (Supplementary Information, Fig. S2e).

At embryonic day (E)12 in mutant mice deficient for netrin-1 expression, apoptosis is strongly enhanced in the whole brainstem and the ventricular zone[5]. However, it has been reported[26] that *Ntn1* is not a necessary survival factor for UNC5A-expressing neurons *in vivo*, because the hypomorphic netrin-1 mutant mice failed to show increased apoptosis in neural-tube ventral neurons. To investigate the role of netrin-1 in neuronal survival *in vivo*, we conducted TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) staining on E18 brain sections. Evident TUNEL-positive cells in $Ntn1^{-/-}$ mice are found in the ventrolateral periaqueductal area, where both UNC5B and DCC are expressed (Supplementary Information, Fig. S3). Our findings therefore suggest that netrin-1 contributes to suppressing neuronal cell death in a region close to the cerebral aqueduct in mouse brain.

Previous studies have revealed that a PKC–PICK1 complex mediates the removal of UNC5A from the membrane surface on activation of PKC, which inhibits the netrin-1-dependent collapse of hippocampal growth cones[27]. Because PIKE-L does not bind UNC5A, we conducted immunofluorescent staining on hippocampal neurons to explore whether PIKE-L has any function in the surface expression of UNC5B. UNC5B surface expression is not altered by treatment with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA); nevertheless, depletion of PIKE-L enhances its surface distribution, and TPA further escalates it. By contrast, overexpression of PIKE-L decreases the surface expression of UNC5B, and combined treatment with TPA and netrin-1 further attenuates its surface residency (Supplementary Information, Fig. S4a), supporting the possibility that PIKE-L might promote the internalization of UNC5B. Netrin-1 provokes UNC5B internalization, but PI(3)K inhibitors have negligible effect on the surface expression of UNC5B, indicating that PI(3)K signalling is not implicated in this event (Supplementary Information, Fig. S4b). Knockout of Fyn elicits the surface insertion of UNC5B, suggesting that netrin-1-triggered Fyn signalling, but not PI(3)K signalling, mediates UNC5B trafficking. In contrast, depletion of PIKE-L abolishes netrin-1-triggered actin filaments in cortical neurons (Supplementary Information, Fig. S5). Taken together, these results support the idea that PIKE-L might be involved not only in the survival activity of netrin-1 but also in its putative role in the adhesion and migration of neuronal cells.

In this report we have shown that Fyn is sufficient and necessary for triggering the tyrosine phosphorylation and association of PIKE-L and UNC5B on treatment with netrin-1. Our finding that PIKE-L selectively associates with UNC5B but not with other family members of UNC5 or p75NTR provides strong evidence indicating that the PIKE-L–UNC5B complex is responsible for activating the PI(3)K cascade and suppressing apoptosis on stimulation with netrin-1. □

METHODS

Cells and reagents. HEK293T cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mg ml^{-1} glutamine and 100 units of penicillin-streptomycin at 37 °C with a 5% CO_2 atmosphere in a humidified incubator. Stable HEK293 cells expressing Myc-tagged chicken netrin-1 were provided by Yi Rao (Northwestern University). The purified anti-PIKE-N antibody is against the amino terminus of residues 1 to 384 in PIKE-L. Anti-haemagglutinin (HA)-tagged horseradish peroxidase and anti-DAPK antibody was from Sigma. Anti-PY99, anti-p110, anti-DCC, anti-GFP and anti-Akt antibodies were from Santa Cruz Biotech. Anti-phospho-Akt473 antibody was from Cell Signaling. Recombinant chicken netrin-1 protein and anti-UNC5B antibody were from R&D Systems. Anti-UNC5B (clone 1A9, antigen 27, 127 residues) was from Novus Bio. Glutathione–Sepharose 4B was supplied by Pharmacia Biotech. All the tyrosine kinase inhibitors and anti-Myc antibody were from Calbiochem. The primer sequence for preparing siRNA-resistant PIKE-L was 5′-GCACTTAT(C)TTG(C)TATCGAATG-3′. The C nucleotides in parentheses were changed into T. The siRNA sequence for UNC5B (sense) was 5′-AGACTGGATTCCAGCTCAA-3′. Protein A/G-conjugated agarose beads were from Sigma.

Yeast two-hybrid screen. The yeast two-hybrid screen was performed with the MATCH-MAKER Two-hybrid System 2 (Clontech) in accordance with the manufacturer's protocol. The GTPase domain of PIKE was subcloned downstream of the Gal4 DNA-binding domain in pAS2-1 and was used as bait to screen a human fetal brain cDNA Library in pACT2. Clones that grew on plates lacking leucine, tryptophan and histidine with 50 mM 3-aminotriazole were selected and assayed for β-galactosidase activity[28].

Protein–protein interaction assays. Dishes (10 cm) of HEK293T cells were transfected with 10 μg of DNA by the calcium phosphate precipitation method. After 48 h the transfected cells were treated as indicated, collected and washed once in PBS, lysed in 1 ml of lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 40 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1.5 mM Na_3VO_4, 50 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM sodium β-glycerophosphate, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 5 mg ml^{-1} aprotinin, 1 mg ml^{-1} leupeptin, 1 mg ml^{-1} pepstatin A) and centrifuged for 10 min at 14,000*g* and 4 °C. Experimental procedures for co-immunoprecipitation were performed as described[29]. Immune complexes were resolved by SDS–PAGE and were subjected to immunoblotting. The GST pull-down assay was performed as described previously[14].

PI(3)K assay. The cell lysate was prepared as described above. PI(3)K was immunoprecipitated with rabbit anti-p110 antibody from the cell extract, and washed with the following buffers: three times with buffer A (PBS, 1% Nonidet P40, 1 mM dithiothreitol (DTT)); twice with buffer B (PBS, 0.5 M LiCl, 1 mM DTT); and twice with buffer C (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 1 mM DTT). Subsequent steps were performed as described[12].

Primary rat cortical neuron culture and apoptotic assay. Primary cultured mouse cortical neurons were prepared as follows. P1 mouse pups were decapitated and cortex was extirpated, cross chopped and suspended by pipetting for separation in DMEM containing 5% fetal calf serum (FCS), 5% horse serum (HS) gently. The cell suspension was then centrifuged at 250 x g for 5 min. This operation was repeated again. Cells were seeded into polyethyleneimine-coated 10 cm dishes and 12-well plates including coated coverslips and incubated at 37 °C in 5% CO_2/95% air. After 3 h, culture medium was changed to Neurobasal containing B-27 supplement (Invitrogen) and incubated for

© 2008 Nature Publishing Group

4 days. For maintenance, a half medium was changed to fresh Neurobasal/B27 every 4 days. After 1 week, the dished cultured neurons were used in various experiments. After infection with various adenoviruses expressing PIKE-L, PIKE-L-KS and PIKE-L(Y1032, 1124F) and with control virus, wild-type cortical neurons were treated with 200 ng ml^{-1} netrin for 30 min before 80 μM glutamate was introduced. After 16–18 h, propidium iodide and Hoechst 33342 were added. The stained neurons were fixed and studied under a fluorescent microscope. Neuronal apoptosis was also verified with an independent approach, namely the caspase-3-activated fluorescent dye $MR(DEVD)_2$. Because of its sensitivity, 80 μM glutamate was added to $Fyn^{-/-}$ cortical neurons to trigger apoptosis for 12–14 h.

Injection of adenovirus into mouse hippocampus. We determined the viral titre by measuring the number of infected HEK293 cells expressing GFP, and adjusted all viral stocks to 10^8 plaque-forming units μl^{-1} before use. For injection of adenoviral vectors into the hypothalamus, we anaesthetized male C57BL/6J mice aged 8–12 weeks ($n = 6$ per group) with 2.5% avertin. We performed standard surgical procedures to inject adenoviral vectors expressing either PIKE-L-specific or UNC5B-specific siRNA with GFP or expressing GFP alone with the use of a stereotaxic table (David Kopf Instruments). The experiment was conducted as described previously[30]. After 4 days, we administrated 25 mg kg^{-1} kainic acid intraperitoneally. After a further 5 days, the hippocampal regions were dissected and homogenated, and analysed by immunoblotting.

Statistical analysis. Results are expressed as means ± S.D. calculated from the specified numbers of determinations. Student's *t*-test was used to compare individual data with the control value.

Note: Supplementary Information is available on the Nature Cell Biology website.

ACKNOWLEDGEMENTS
This work is supported by a grant from the National Institutes of Health (RO1, NS045627) to K.Y. and by grants from ANR and Ligue Contre le Cancer to P.M.

AUTHOR CONTRIBUTIONS
X.T., S.-W.J., M.O., C.-B.C., Y.L., S.-W. L., Y.H. and N.R. performed the experimental work and data analysis; Y.F. provided reagents; W.-C.X., P.M. and K.Y. planned the project and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS
The authors declare no competing financial interests.

Published online at http://www.nature.com/naturecellbiology/
Reprints and permissions information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

1. Keino-Masu, K. *et al*. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* **87,** 175–185 (1996).
2. Serafini, T. *et al*. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* **87,** 1001–1014 (1996).
3. Mehlen, P. *et al*. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395,** 801–804 (1998).
4. Thiebault, K. *et al*. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100,** 4173–4178 (2003).
5. Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E. & Mehlen, P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.* **20,** 2715–2722 (2001).
6. Tanikawa, C., Matsuda, K., Fukuda, S., Nakamura, Y. & Arakawa, H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nature Cell Biol.* **5,** 216–223 (2003).
7. Llambi, F. *et al*. The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J.* **24,** 1192–1201 (2005).
8. Ackerman, S. L. *et al*. The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* **386,** 838–842 (1997).
9. Leonardo, E. D. *et al*. Vertebrate homologues of C. elegans UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* **386,** 833–838 (1997).
10. Williams, M. E., Strickland, P., Watanabe, K. & Hinck, L. UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE. *J. Biol. Chem.* **278,** 17483–17490 (2003).
11. Ye, K. *et al*. Pike. A nuclear GTPase that enhances PI3kinase activity and is regulated by protein 4.1N. *Cell* **103,** 919–930 (2000).
12. Ye, K. *et al*. Phospholipase C gamma 1 is a physiological guanine nucleotide exchange factor for the nuclear GTPase PIKE. *Nature* **415,** 541–544 (2002).
13. Rong, R. *et al*. PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. *Nature Neurosci.* **6,** 1153–1161 (2003).
14. Tang, X., Feng, Y. & Ye, K. Src-family tyrosine kinase fyn phosphorylates phosphatidylinositol 3-kinase enhancer-activating Akt, preventing its apoptotic cleavage and promoting cell survival. *Cell Death Differ.* **14,** 368–377 (2007).
15. Li, W. *et al*. Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nature Neurosci.* **7,** 1213–1221 (2004).
16. Liu, G. *et al*. Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. *Nature Neurosci.* **7,** 1222–1232 (2004).
17. Ren, X. R. *et al*. Focal adhesion kinase in netrin-1 signaling. *Nature Neurosci.* **7,** 1204–1212 (2004).
18. Meriane, M. *et al*. Phosphorylation of DCC by Fyn mediates Netrin-1 signaling in growth cone guidance. *J. Cell Biol.* **167,** 687–698 (2004).
19. Chang, C. *et al*. MIG-10/lamellipodin and AGE-1/PI3K promote axon guidance and outgrowth in response to slit and netrin. *Curr. Biol.* **16,** 854–862 (2006).
20. Campbell, D. S. & Holt, C. E. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* **32,** 1013–1026 (2001).
21. Ming, G. *et al*. Phospholipase C-γ and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance. *Neuron* **23,** 139–148 (1999).
22. Schauwecker, P. E. & Steward, O. Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94,** 4103–4108 (1997).
23. Lu, X. *et al*. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* **432,** 179–186 (2004).
24. Xie, Y. *et al*. DCC-dependent phospholipase C signaling in netrin-1-induced neurite elongation. *J. Biol. Chem.* **281,** 2605–2611 (2006).
25. Hong, K. *et al*. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* **97,** 927–941 (1999).
26. Williams, M. E. *et al*. UNC5A promotes neuronal apoptosis during spinal cord development independent of netrin-1. *Nature Neurosci.* **9,** 996–998 (2006).
27. Williams, M. E., Wu, S. C., McKenna, W. L. & Hinck, L. Surface expression of the netrin receptor UNC5H1 is regulated through a protein kinase C-interacting protein/protein kinase-dependent mechanism. *J. Neurosci.* **23,** 11279–11288 (2003).
28. Tang, X. *et al*. Sperm membrane protein (hSMP-1) and RanBPM complex in the microtubule-organizing centre. *J. Mol. Med.* **82,** 383–388 (2004).
29. Tang, X. & Ye, K. Pike tyrosine phosphorylation regulates its apoptotic cleavage during programmed cell death. *Adv. Enzyme Regul.* **46,** 289–300 (2006).
30. Sheng, G. *et al*. Hypothalamic huntingtin-associated protein 1 as a mediator of feeding behavior. *Nature Med.* **12,** 526–533 (2006).

© 2008 Nature Publishing Group

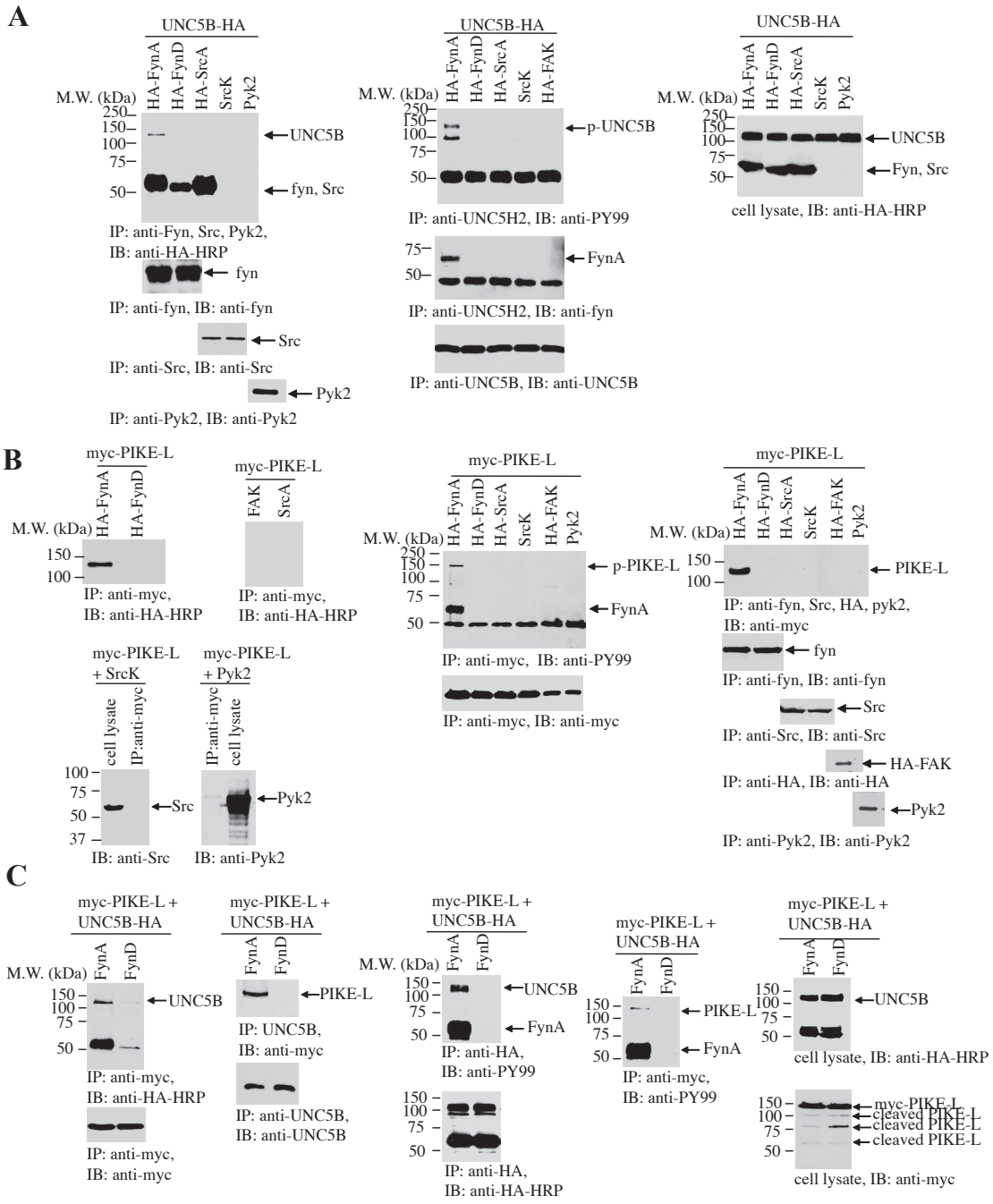


Figure 1 Fyn phosphorylates both PIKE-L and UNC5B and regulates the interaction. Active Fyn tyrosine kinase binds UNC5B and phosphorylates UNC5B. UNC5B was cotransfected with various tyrosine kinases into HEK293T cells. The transfected tyrosine kinases were immunoprecipitated and analyzed with anti-HA-HRP and PY99 antibodies, respectively. Only active fyn selectively bound UNC5B and phosphorylated it (top left and middle panels). Verification of transfected constructs (left lower panels). The associated active FynA was also tyrosine phosphorylated (middle 2nd panel). Confirmation of transfected UNC5B, fyn and Src A (right panel). (B) Active fyn tyrosine kinase binds and phosphorylates PIKE-L. PIKE-L was cotransfected with various tyrosine kinases into HEK293T cells. Only active fyn specifically bound PIKE-L and phosphorylated it (left and middle panels). Reciprocal immunoprecipitation verified the similar results (right panels). (C) Active Fyn triggers the interaction between PIKE-L and UNC5B. HEK293T cells were co-transfected with myc-PIKE-L, UNC5B-HA in the presence of fynA or fynD. The expression of PIKE-L, UNC5B and fyn were determined by western blotting. PIKE-L strongly bound to UNC5B in the presence of fynA but not fynD (left top panels). FynA but not FynD provoked tyrosine phosphorylation in PIKE-L and UNC5B (middle top panels). Compared to fynD sample, PIKE-L apoptotic cleavage was decreased when cotransfected with fynA (right lower panel).

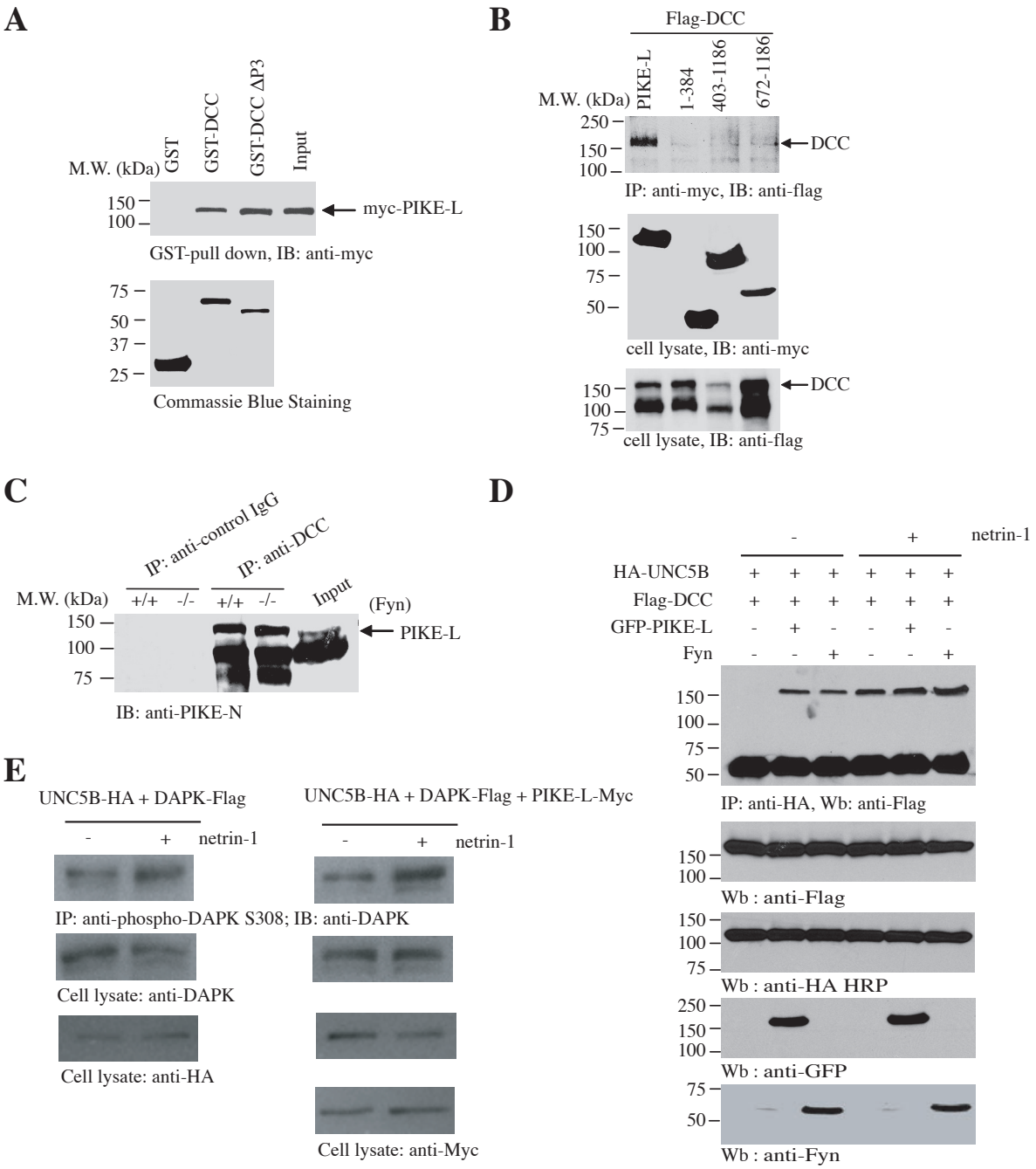


Figure 2 PIKE-L interacts with DCC and mediates its association with UNC5B (A) In vitro binding between PIKE-L and DCC. Purified GST control, GST-DCC-CTD, GST-DCC-CTD-ΔP3 recombinant proteins were respectively incubated with cell lysates of HEK293, transfected with myc-PIKE-L. PIKE-L selectively bound to both DCC-CTD and ΔP3 but not GST control. (B) PIKE-L binds DCC in HEK293T cells. Flag-DCC was co-transfected with PIKE-L and its fragments into HEK293T cells. PIKE-L full-length showed the strongest binding with DCC (top panel). Verification of transfected constructs (middle and bottom panels). (C) Interaction of PIKE-L and DCC is not regulated by fyn. Brain homogenates from wild-type and fyn-/- mice were immunoprecipitated by anti-DCC and control IgG, respectively, followed by immunoblotting with anti-PIKE antibody. PIKE-L bound to DCC regardless of Fyn expression. (D) PIKE-L and Fyn mediate UNC5B and DCC association. UNC5B and DCC were cotransfected with either PIKE-L or Fyn into HEK293 cells, followed by netrin-1 treatment. UNC5B was immunoprecipitated with anti-HA antibody, its associated proteins were analyzed with anti-myc antibody. In the absence of netrin-1, DCC did not bind to UNC5B; however, in the presence of PIKE-L or Fyn, DCC tightly associated with UNC5B even in the absence of netrin-1. Netrin-1 treatment further enhanced the interaction between DCC and UNC5B (top panel). Confirmation of transfected constructs (2nd to bottom panels). (E) PIKE-L does not regulate DAP-kinase autophosphorylation. HEK293T cells were transiently transfected with a control vector or Myc-tagged PIKE-L vector together with HA- tagged-UNC5B and Flag-tagged DAP-kinase expressing constructs. Recombinant netrin-1 was added 48 h after transfection. Pull-down with a phospho-serine308-DAPK antibody followed by western blot using anti-Flag was performed. Overexpression of PIKE-L did not mediate DAPK autophosphorylation, whereas netrin-1 treatment slightly increased DAPK phosphorylation irrespective of PIKE-L expression (top panels). Verification of transfected DAPK, UNC5B and PIKE-L constructs (2nd, 3rd and bottom panels).

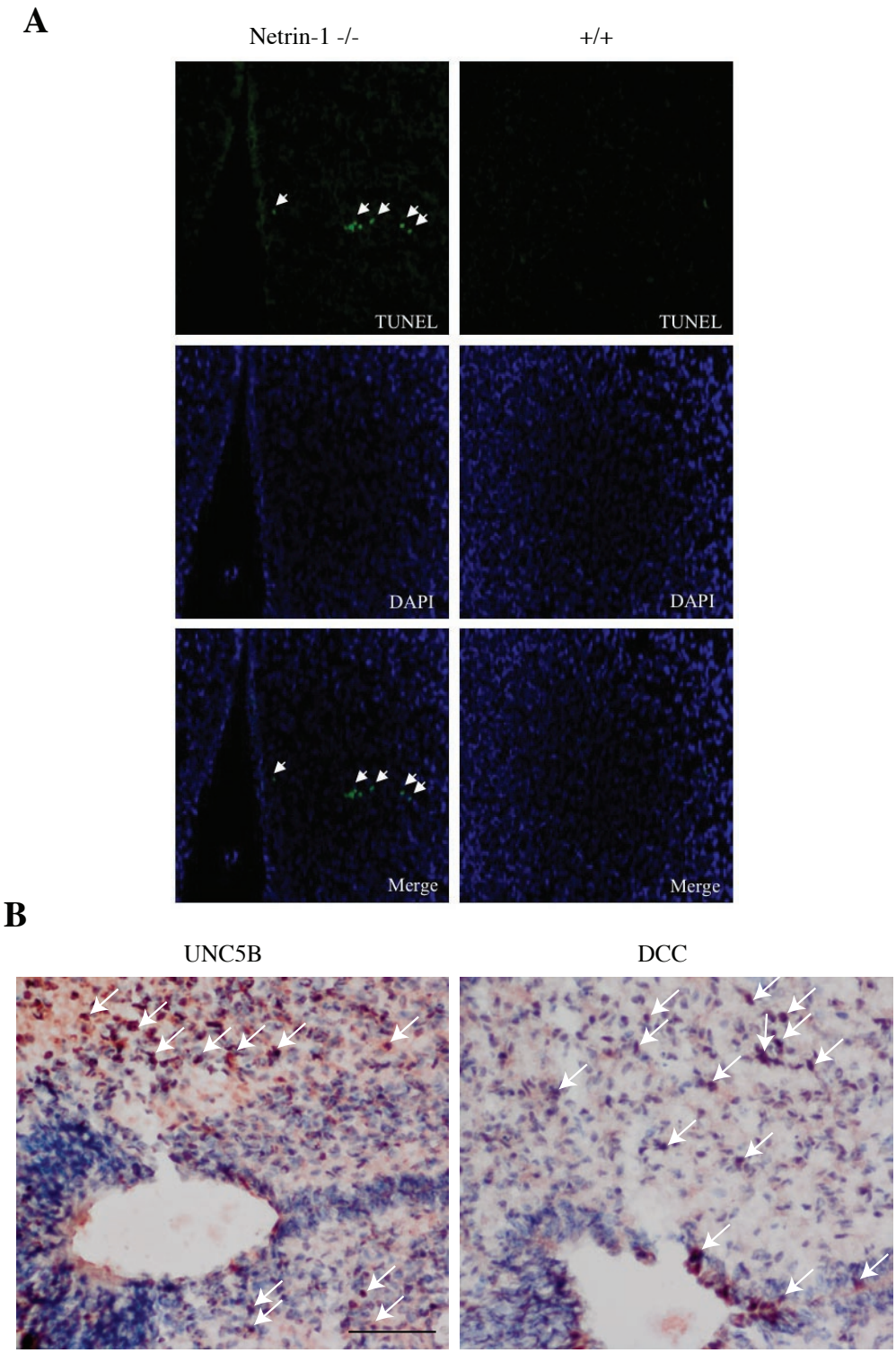


Figure 3 Netrin-1 deficiency triggers apoptosis in cerebral aqueduct around ventricular zone (A) TUNEL staining on wild-type and netrin-1 knockout embryonic brain sections (E18). Evident TUNEL staining was found around the cerebral aqueduct region with most concentrated in the ventrolacteral periaqueductal gray area. No apoptosis was detected in other regions. Eighteen embryos were analyzed in this experiment. (B) Immunohistochemistry staining of UNC5B and DCC. DCC and UNC5B were expressed in the region close to the Aqueduct (white arrows) in both wild-type and Netrin -/- mouse brain. Bar = 50 μm

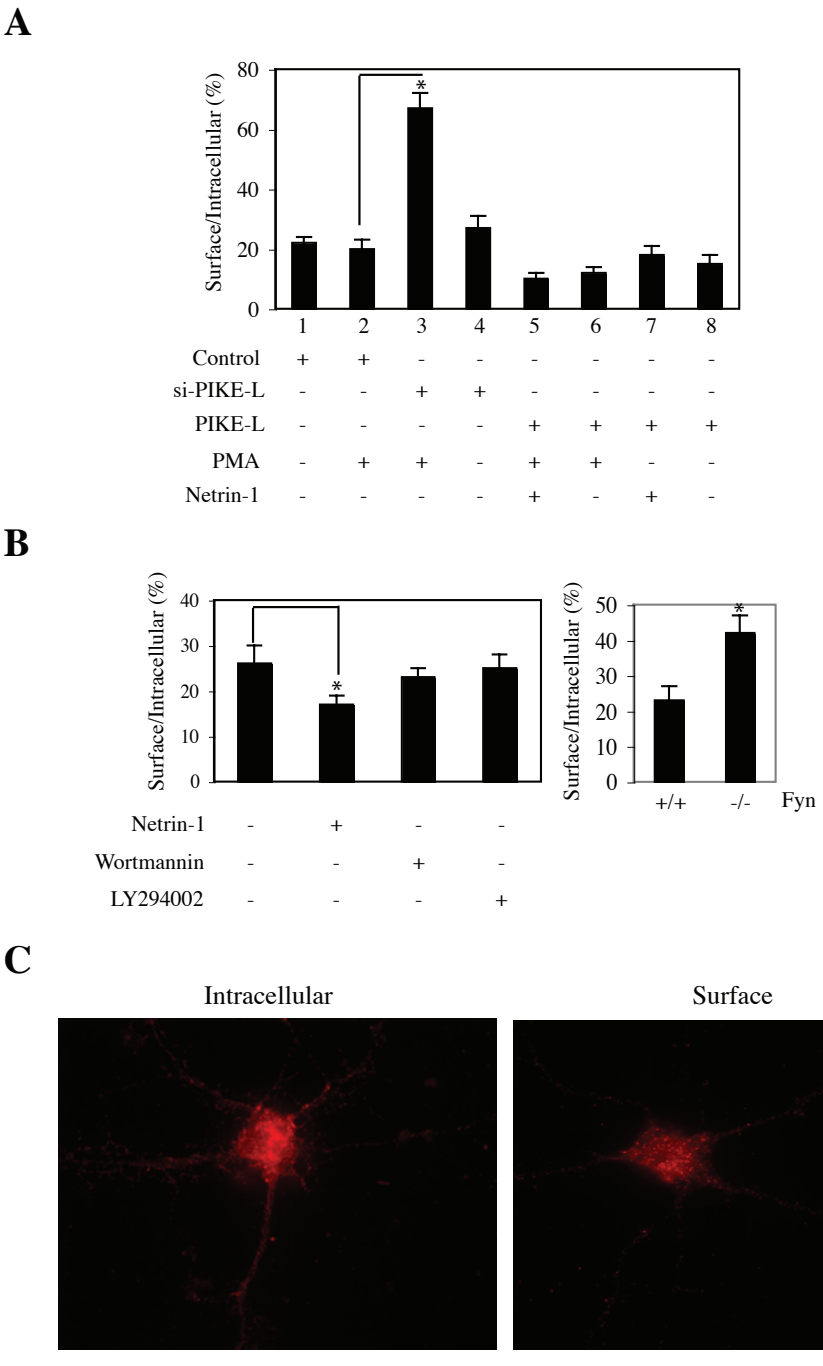


Figure 4 Depletion of PIKE-L and Fyn enhances UNC5B surface expression in hippocampal neurons (A) Depletion of PIKE-L upregulates UNC5B surface expression. 14 DIV hippocampal neurons were infected with control adenovirus or adenovirus expressing wild-type PIKE-L or its shRNA. The infected neurons were treated with netrin-1 or PMA. Cell were live-labeled to immunostain surface UNC5B or fixed and permeabilized to stain the internalized UNC5B. The ratios between surface and internalized were calculated. Removal of PIKE-L increased UNC5B surface expression, which was enhanced by PMA treatment. Nevertheless, overexpression of PIKE-L diminished UNC5B surface expression. (*P<0.05; student t-test). (B) Knockout Fyn enhances UNC5B surface expression. Hippocampal neurons were cultured from wild-type and Fyn -/- mice. The wild-type neurons were pretreated with 100 nM wortmannin or 10 μM LY294002 for 30 min, respectively. The drug-treated neurons were stained as described. The ratios between surface and internalized were calculated. Depletion of Fyn increased UNC5B surface expression. Netrin-1 treatment decreased surface expression. However, PI 3-kinase inhibitors have no effect on UNC5B surface expression. (*P<0.05; student t-test). (C) Immnofluorescent staining of UNC5B. Surface or intracellular UNC5B was stained in hippocampal neurons from Fyn knockout hippocampal neurons. Neurons were live-labeled to immunostain surface UNC5B (right), then fixed and permeabilized to immunostain intracellular UNC5B (left).

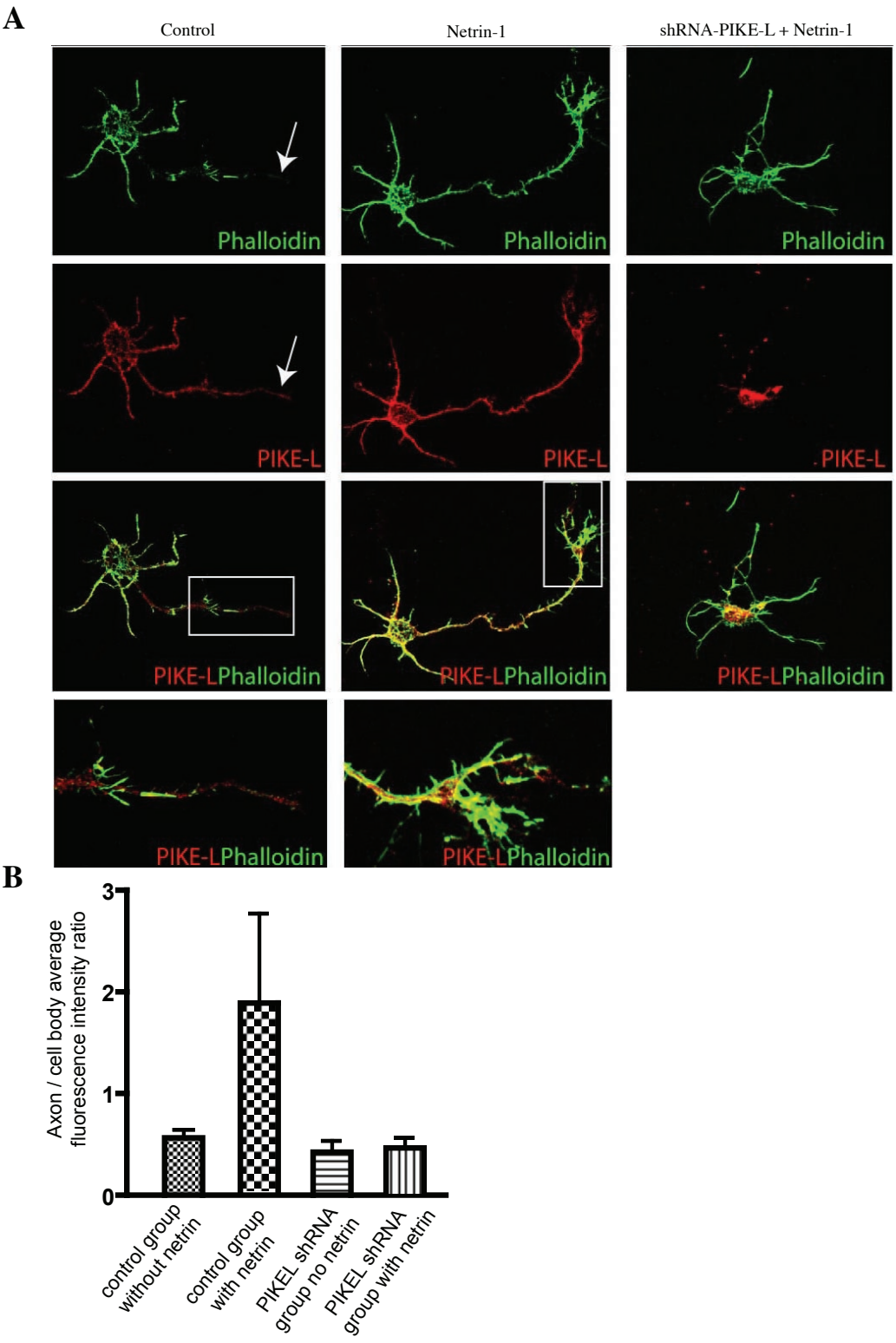


Figure S5 PIKE-L contributes to netrin-1-induced axonal F-actin polymerization (A) Immunofluorescent staining of F-actin and PIKE-L on cortical neurons. Rat E17 cortical neurons were infected with control or sh-RNA-PIKE-L virus for 6 hours, then changed medium and cultured for additional 48 hours. Prior to fixation and staining, netrin-1/control medium was treated for 1 hour. The fixed neurons were stained with anti-PIKE-L (red) + FITC-conjugated phalloidin (green). Netrin-1-induced filamentous actin (F-actin polymerization), particularly at neurite growth cones, was abolished by shRNA-PIKE-L. The circled regions were amplified at the bottom of the figure. (B) Quantification of actin polymerization on control and sh-RNA PIKE-L-infected neurons.

Figure 1

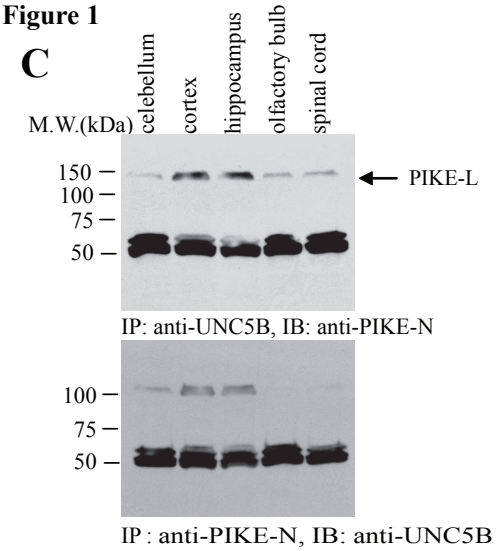


Figure 3

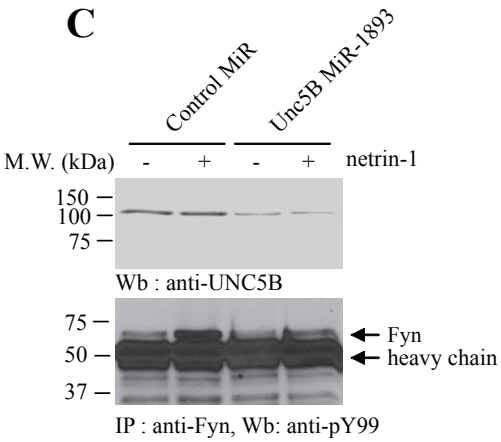


Figure 2

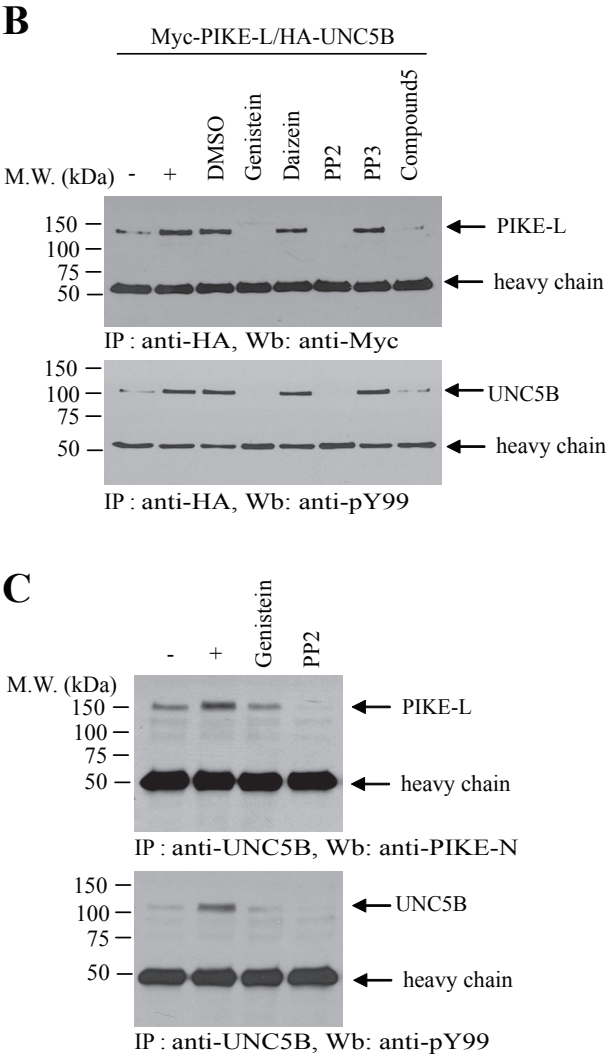


Figure 5

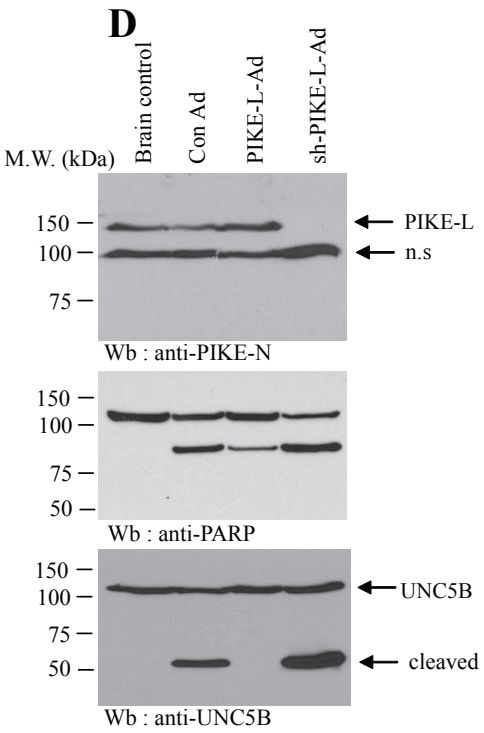


Figure S6 Full scans

Annexe N°4 : The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex.

nature cell biology

The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL–caspase-9 complex

Frédéric Mille[1,3], Chantal Thibert[1,3], Joanna Fombonne[1], Nicolas Rama[1], Catherine Guix[1], Hideki Hayashi[2], Véronique Corset[1], John C. Reed[2] and Patrick Mehlen[1,4]

Sonic hedgehog (Shh) and its main receptor, Patched (Ptc), are implicated in both neural development and tumorigenesis[1,2]. Besides its classic morphogenic activity, Shh is also a survival factor[3,4]. Along this line, Ptc has been shown to function as a dependence receptor; it induces apoptosis in the absence of Shh, whereas its pro-apoptotic activity is blocked in the presence of Shh[5]. Here we show that, in the absence of its ligand, Ptc interacts with the adaptor protein DRAL (downregulated in rhabdomyosarcoma LIM-domain protein; also known as FHL2). DRAL is required for the pro-apoptotic activity of Ptc both in immortalized cells and during neural tube development in chick embryos. We demonstrate that, in the absence of Shh, Ptc recruits a protein complex that includes DRAL, one of the caspase recruitment (CARD)-domain containing proteins TUCAN (family member, 8) or NALP1 (NLR family, pyrin domain containing 1) and apical caspase-9. Ptc triggers caspase-9 activation and enhances cell death through a caspase-9-dependent mechanism. Thus, we propose that in the absence of its ligand Shh the dependence receptor Ptc serves as the anchor for a caspase-activating complex that includes DRAL, and caspase-9.

There are now more than a dozen identified dependence receptors, which include DCC[6] (deleted in colorectal cancer), UNC5H (uncoordinated 5 homologue), some integrins, neogenin, p75NTR (p75 neurotrophin receptor), RET (rearranged during transfection), ALK (anaplastic lymphoma kinase), EphA4 (ephrin type A receptor 4) and TrkC (tyrosine kinase receptor C)[7–10]. They share several features in common (see reviews)[7,8]: (i) these receptors create cellular states of dependence on their respective ligands as they induce programmed cell death in the absence of their ligands and this pro-apoptotic activity is inhibited in the presence of their ligands; (ii) these receptors are typically involved in both neural development and neoplasia; (iii) apoptosis induction requires a caspase-cleavage site in the intracytoplasmic domain.

Ptc fulfills all of these criteria as a candidate dependence receptor. The expression of Ptc induces apoptosis, which is suppressed by its ligand, Shh. Besides its key role during development, Ptc is a tumour suppressor and mutations of Ptc are associated with neoplasia, especially basal cell carcinomas[11] and medulloblastomas[12]. Moreover, apoptosis induction by Ptc requires the caspase-cleavage site at Asp 1392 (ref. 5).

However, the mechanism by which the withdrawal of trophic ligands from their respective dependence receptors leads to apoptosis is largely unknown. Previous studies on DCC have suggested that some of these dependence receptors may recruit a caspase-activating complex[13]. This complex, comprising the initiator apical caspase-9, is independent of the two main apoptosis-related caspase-activating complexes, the DISC (death-induced signalling complex) and the apoptosome[14]. Yet, the precise identification of such an apoptosis-inducing dependence receptor complex has been unsuccessful so far.

In an attempt to identify pro-apoptotic signalling components downstream of Ptc, a two-hybrid screen was performed using the pro-apoptotic domain of Ptc (residues 1165–1392; ref. 5) as bait and a human embryonic brain cDNA library as prey (Fig 1a). Of the seven putative Ptc interactors (Supplementary Information, Fig S1a), we focused our attention on DRAL. Indeed, DRAL is a multifunctional protein that consists of four and a half LIM protein–protein interaction domains[15]. DRAL participates in cellular processes that include regulation of gene expression, cytoarchitecture, cell adhesion, cell mobility, signal transduction and cell survival[15]. Interestingly, DRAL overexpression seems to be pro-apoptotic in a variety of cells, however, the mechanism for DRAL-induced apoptosis is unknown[16]. DRAL has also been shown to interact with TUCAN[17], which was proposed to function as an adaptor protein for caspase-1 (ref. 18) or caspase-9 (ref. 19).

To further confirm the interaction between the Ptc pro-apoptotic domain and DRAL, a targeted two-hybrid screen was performed. As shown in Fig. 1b, residues 1165–1392 of Ptc and DRAL interact in yeast. To monitor whether this interaction could be observed in mammalian cells, co-immunoprecipitation studies were performed on

[1]Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', CNRS UMR5238, Université de Lyon. Centre Leon Bérard, 69008 Lyon, France.
[2]Burnham Institute for Medical Research, 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA.
[3]These authors contributed equally to this work.
[4]Correspondence should be addressed to P.M. (e-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr)

Received 12 December 2008; accepted 2 March 2009; published online 24 May 2009; DOI: 10.1038/ncb1880

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

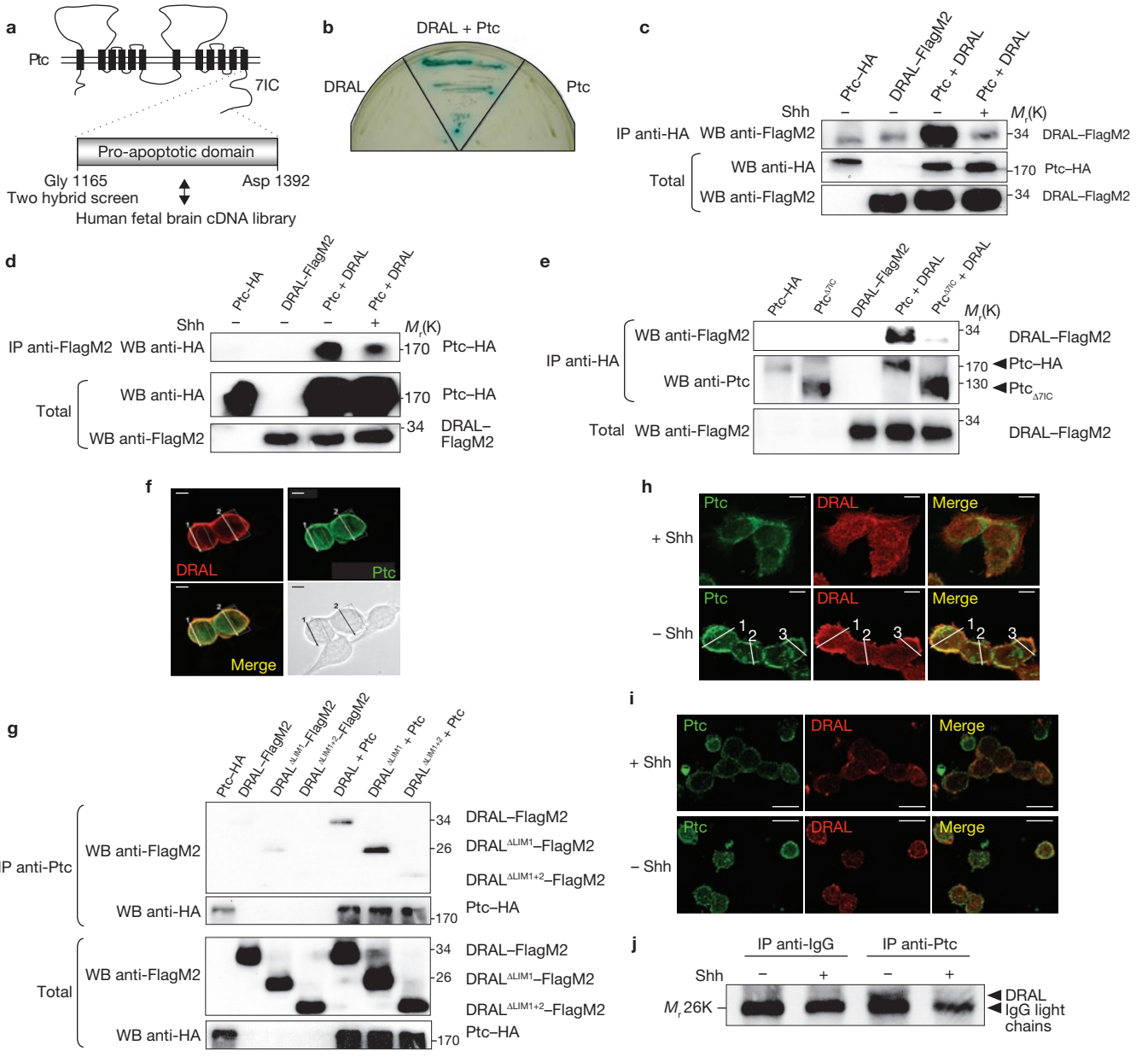


Figure 1 The pro-apoptotic domain of Ptc interacts with DRAL. (**a**) A two-hybrid screen with the pro-apoptotic domain of Ptc-1. 7IC refers to the seventh intracellular domain. (**b**) The Ptc–DRAL interaction was confirmed by a direct two-hybrid screen. AH109 yeasts were transformed with a mock Gal4BD plasmid and a Gal4AD plasmid fused with DRAL (DRAL), a mock Gal4AD plasmid and a Gal4BD plasmid fused with the Ptc pro-apoptotic domain (Ptc) or a Gal4AD plasmid fused with DRAL and a Gal4BD plasmid fused with Ptc (DRAL + Ptc). (**c**) Co-immunoprecipitations were performed on HEK293T cells transiently expressing Ptc–HA (Ptc) or DRAL–FlagM2 (DRAL) or Ptc–HA and DRAL–FlagM2 (Ptc + DRAL) in the absence (–) or presence (+) of Shh (300 ng ml^{-1}). Pulldown with an anti-HA antibody was used to immunoprecipitate (IP) Ptc and DRAL was revealed by western blotting (WB) using an anti-FlagM2 antibody. Western blotting on lysates before pulldown are shown (Total). (**d**) The same experiment as in **c** was performed, except DRAL pulldown was performed with an anti-FlagM2 antibody and specific Ptc binding was revealed using an anti-HA antibody. See Supplementary Information, Fig. S7a for full blots. (**e**) DRAL co-immunoprecipitates with Ptc, but not with Ptc lacking its seventh intracellular domain (Ptc$^{\Delta 7IC}$). Pulldown results of Ptc in lysates from cells expressing DRAL–FlagM2 (DRAL) and Ptc–HA (Ptc) or Ptc$^{\Delta 7IC}$ are shown. DRAL was revealed by western blotting using an anti-FlagM2 antibody. (**f**) Co-localization of Ptc and DRAL in transiently transfected HEK293T cells. Cells were stained with anti-Ptc (Ptc, green) and anti-DRAL (DRAL, red) antibodies. A representative field from three independent experiments is shown. See Supplementary Information, Fig. S1c for merge fluorescence analysis at the plasma membrane at positions 1 and 2. Phase contrast of transfected cells is shown (bottom right). (**g**) Co-immunoprecipitation of Ptc with DRAL deletion mutants was performed as described in **c** on cells expressing Ptc–HA and DRAL–FlagM2, DRAL$^{\Delta Lim1}$–FlagM2 or DRAL$^{\Delta LIM1+2}$–FlagM2. The presence of DRAL was revealed using an anti-FlagM2 antibody. (**h**, **i**) Co-localization of endogenous Ptc and DRAL in Daoy medulloblastoma cells (**h**) or in primary cultured cerebellar granule neurons (**i**), in the presence or absence of Shh. Cells were stained as described in **f**. See Supplementary Information, Fig. S1e for merge fluorescence analysis at positions 1, 2 and 3 in **h**. (**j**) Immunoprecipitation on mice cortex of E16.5 embryos incubated in absence (–) or presence (+) of Shh was performed using an anti-Ptc antibody (or IgG as a control) and DRAL was detected by immunoblotting using an anti-DRAL antibody. Scale bars, 5 μm in **f**, **h** and **i**.

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

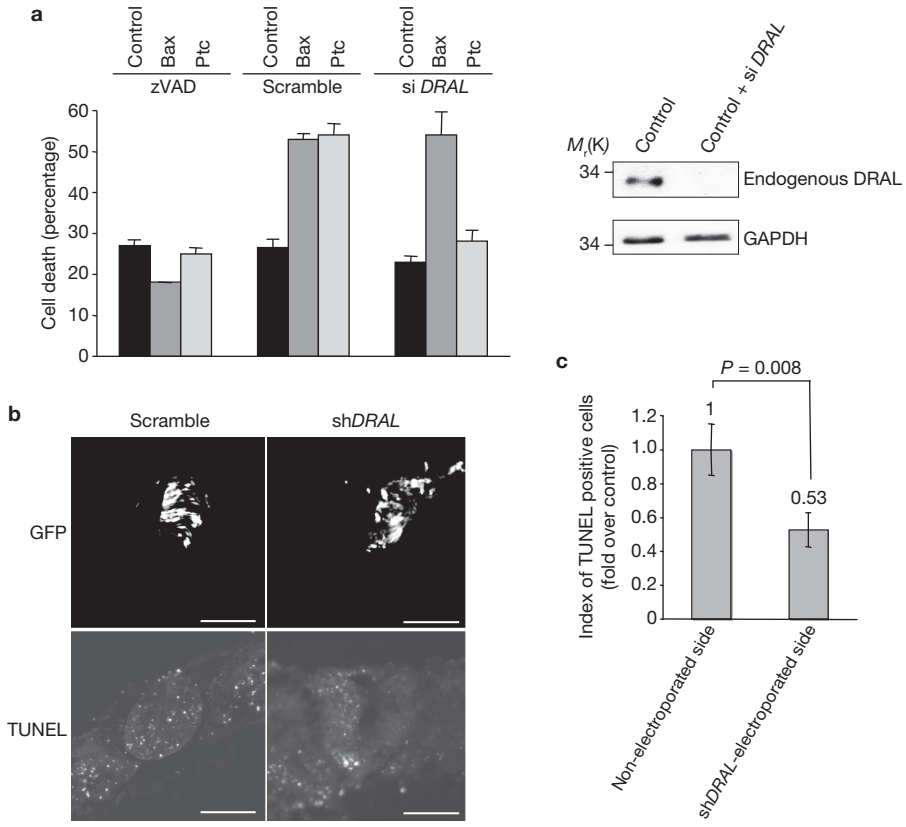


Figure 2. DRAL is required for Ptc pro-apoptotic activity. (**a**) HEK293T cells were transiently transfected with an empty vector, scrambled siRNA (scramble) or *DRAL* siRNA (si *DRAL*). At 48 h after siRNA transfection, cells were transfected a second time with an empty vector (control), a Bax encoding vector (Bax) or a Ptc encoding vector (Ptc) in the absence or presence of caspase inhibitor zVAD-fmk (zVAD). Cell death was analysed 24 h after the second transfection using trypan blue exclusion as described peviously[5] (data are mean ± s.d.). *DRAL* siRNA efficiency in reducing endogenous DRAL expression was shown by western blotting using an anti-DRAL antibody. An anti-GAPDH immunoblot is shown as a control of specificity and loading. (**b**) DRAL function in Ptc-induced apoptosis was also addressed *in vivo* in the absence of Shh, as achieved in chick embryos *in ovo* at E1.5 by removal of the caudal part of the Hensen node by microsurgery. Before the microsurgery, the left side of the neural tube was electroporated with GFP and *DRAL* shRNA or scrambled shRNA. Electroporation efficiency is shown (top; GFP) as is TUNEL staining of the same section (bottom; TUNEL). Scale bar, 100 μm. (**c**) The index of TUNEL-positive cells is represented as the ratio between the number of cells stained under the *DRAL* shRNA condition (sh*DRAL*-electroporated side) to the number of cells stained under the control condition (Non-electroporated side) counted over 15 sections. Data are mean ± s.e.m., $P = 0.008$ as determined by U test. Note that *DRAL* shRNA electroporation alone or forced expression of DRAL had no significant effect on cell death (Supplementary Information,. Fig. 2e, f).

HEK293T cells co-transfected with tagged Ptc and DRAL. As shown in Fig. 1c, full-length DRAL was pulled down by full-length Ptc. When Shh was added to the culture medium, the Ptc–DRAL interaction was strongly decreased (Fig. 1c). Similar interaction data were observed when the reverse immunoprecipitation was performed (Fig. 1d). Moreover, as expected from the two-hybrid screen, the seventh intracellular region of Ptc, which includes the pro-apoptotic domain, was sufficient to interact with DRAL (Supplementary Information, Fig. S1b), whereas deletion of this region prevented the Ptc– DRAL interaction (Fig. 1e).

Confocal analysis of the two co-expressed full-length proteins showed co-localization of Ptc and DRAL in HEK293T cells (Fig. 1f; Supplementary Information, Fig. S1c). In an attempt to define the region of DRAL important for the Ptc–DRAL interaction, we tested whether DRAL lacking LIM domains 1 and 2 could be pulled down by Ptc. While deletion of the LIM1 domain had no effect on the Ptc–DRAL interaction, deletion of both LIM1 and LIM2 domains, or deletion of the LIM2 domain only, strongly decreased the ability of DRAL to interact with Ptc (Fig. 1g; Supplementary Information, Fig. S1d). Thus, both in yeast and in mammalian cells, Ptc interacts through its seventh intracellular domain with a region of DRAL that includes the LIM2 domain.

To address whether this interaction may be observed not only with ectopically expressed proteins but also with endogenous proteins, Ptc–DRAL co-localization was analysed in the Daoy medulloblastoma cell line in the absence or presence of Shh. In the presence of Shh, DRAL was mainly cytoplasmic and failed to co-localize with Ptc, in the absence of Shh, DRAL and Ptc clearly co-localized at the membrane of these cells (Fig. 1h; Supplementary Information, Fig. S1e). Similar results were obtained with primary cultured cerebellar granule cells (CGN; Fig. 1i; Supplementary Information, Fig. S1f). We then addressed the *in vivo* interaction of Ptc and DRAL using co-immunoprecipitation in mouse developing brain extract. Semi-dissociated embryonic day (E) 16.5 brains were either left untreated or exposed to Shh, and then further processed for Ptc immunoprecipitation. In the absence of Shh treatment, an anti-Ptc antibody pulled down DRAL, whereas Ptc–DRAL association was not observed with an unrelated isotypic antibody, confirming the specificity of the interaction. Addition of Shh inhibited

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

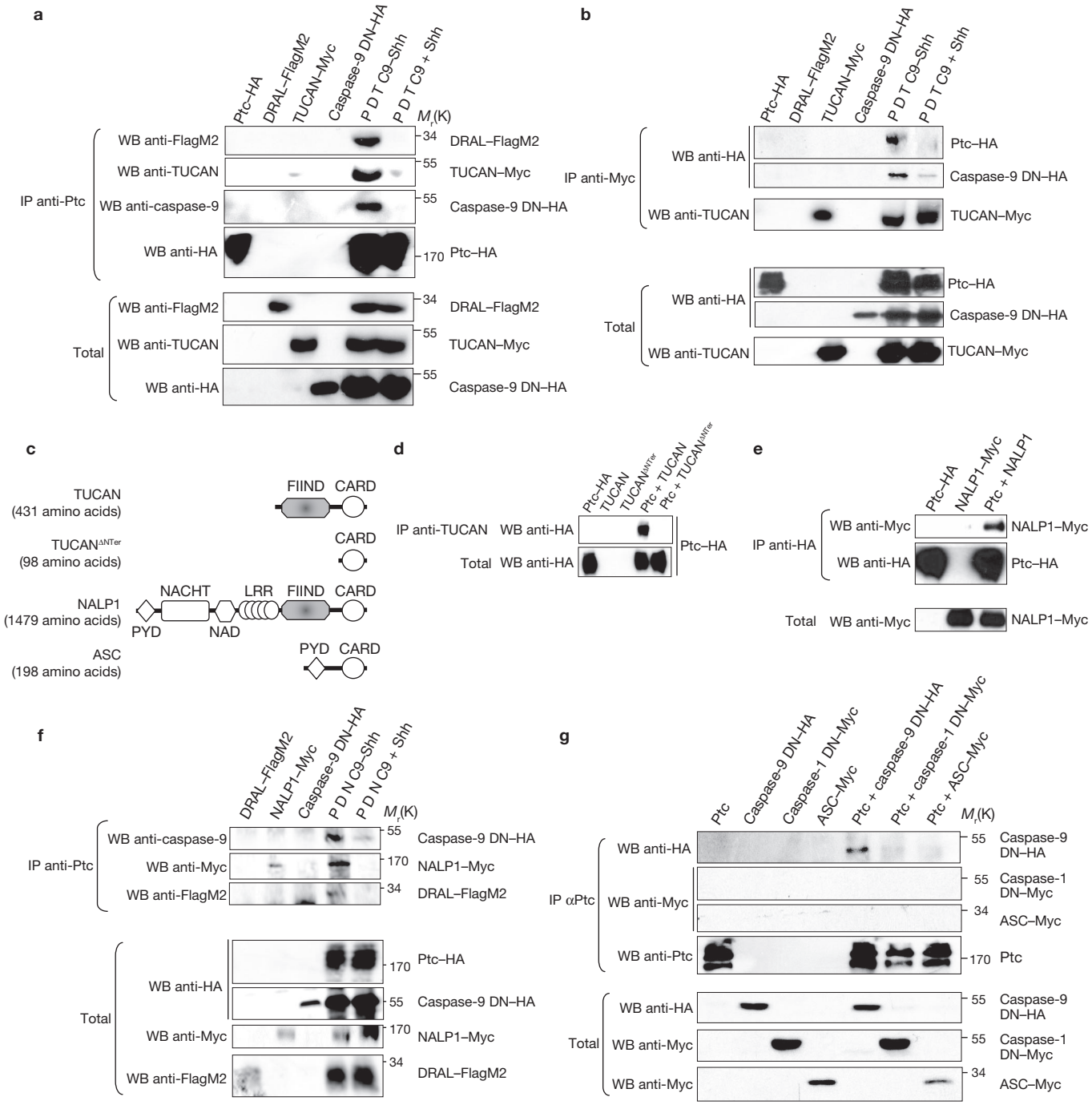


Figure 3 Ptc–DRAL serves as a platform to recruit TUCAN or NALP1 and caspase-9. (**a**) Ptc pulldown in HEK293-EcrShh cells transfected with either Ptc (Ptc–HA), DRAL (DRAL–FlagM2), TUCAN (TUCAN–Myc) or caspase-9 dominant negative (caspase-9 DN–HA) alone or the four constructs together in the absence (P D T C9 – Shh) or presence (P D T C9 + Shh) of Shh. DRAL, TUCAN and caspase-9 interaction with Ptc were revealed by anti-FlagM2, anti-Myc or anti-caspase-9 immunoblots, respectively (IP, immunoprecipitation; WB, western blotting). See Supplementary Information, Fig. S7b for full blots. (**b**) TUCAN immunoprecipitation from HEK293T cells transfected with Ptc–HA, DRAL–FlagM2, TUCAN–Myc or caspase-9 DN–HA alone or the four constructs together in the absence (P D T C9 – Shh) or presence (P D T C9 + Shh) of Shh. Ptc and caspase-9 were revealed after pulldown with an anti-HA immunoblot and TUCAN was revealed with an anti-TUCAN antibody (Total: immunoblots on lysate before pull-down). (**c**) Schematic representations of TUCAN, the TUCAN mutant deleted of its N-terminal domain (TUCAN$^{\Delta NTer}$), NALP1 and ASC. Note the FIIND domain homology between TUCAN and NALP1 in their N-terminal region. (**d**) TUCAN immunoprecipitation (using an anti-TUCAN antibody with an epitope in the CARD domain) in HEK293T cells transfected with an empty vector and Ptc (Ptc–HA), TUCAN (TUCAN), N-terminal-deleted TUCAN (TUCAN$^{\Delta NTer}$) or Ptc with either TUCAN (Ptc + TUCAN) or N-terminal-deleted TUCAN (Ptc + TUCAN$^{\Delta NTer}$). Ptc was revealed in pulldown experiments by anti-HA immunoblotting. (**e**) Ptc pulldown experiments in HEK293T cells transfected with an empty vector and Ptc (Ptc–HA) or NALP1 (NALP1–Myc) or Ptc and NALP1 (Ptc + NALP1). NALP1 pull-down with Ptc was revealed by immunoblotting using anti-Myc. (**f**) Co-immunoprecipitations were performed as in **a** except that TUCAN was replaced by NALP1 (NALP1–Myc). (**g**) Ptc pulldown experiments were performed on HEK293T cells transfected with Ptc (Ptc), caspase-9 DN (caspase-9 DN–HA), caspase-1 DN (caspase-1 DN–Myc) or ASC (ASC–Myc) alone or in combination with Ptc (Ptc + caspase-9 DN–HA; Ptc + caspase-1 DN–Myc; Ptc + ASC–Myc). Caspase-9, caspase-1 or ASC pulled down by Ptc were detected using anti-HA or anti-Myc antibodies. See Supplementary Information, Fig. S7c for full blots.

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

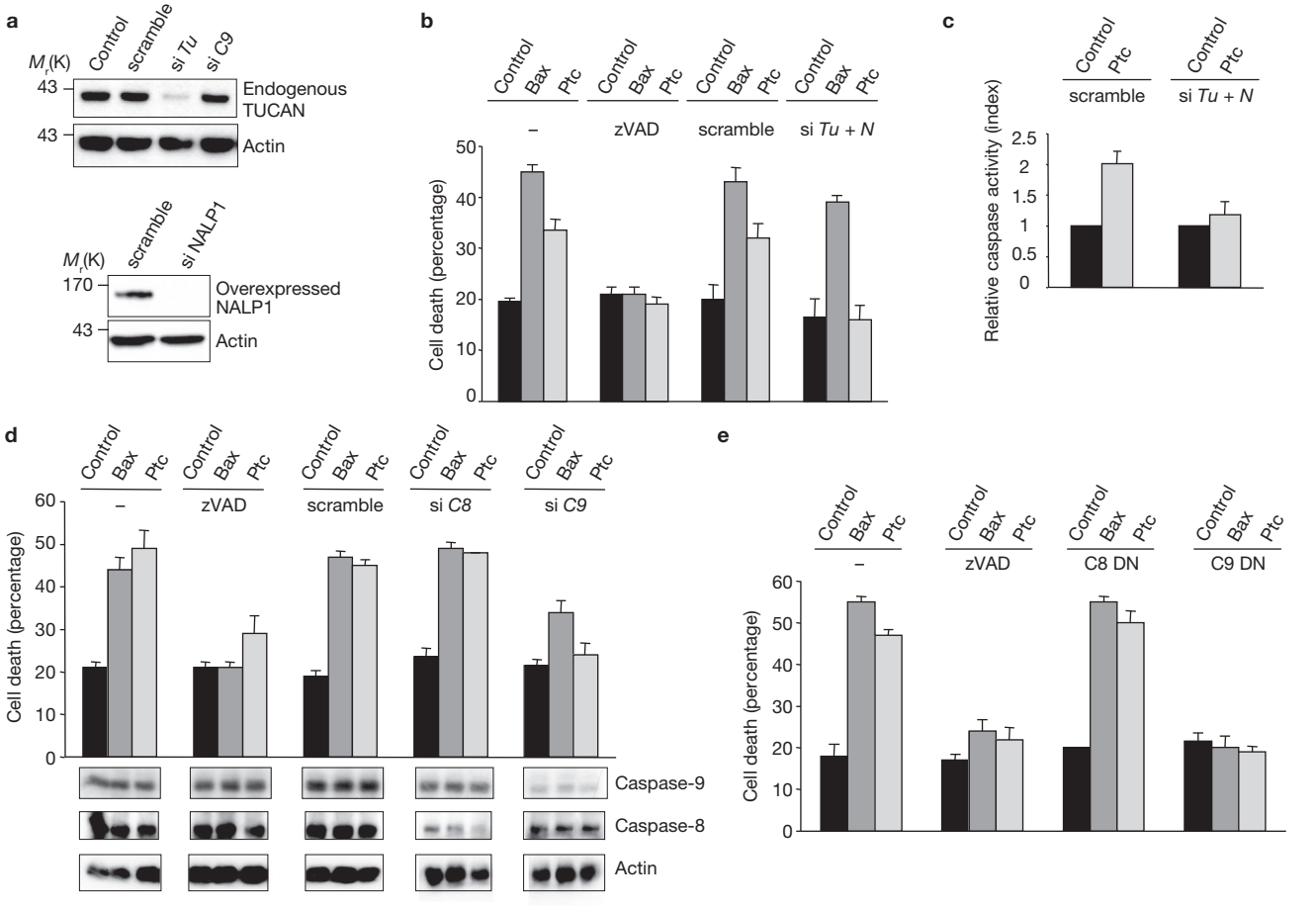


Figure 4 TUCAN/NALP1 and caspase-9 are required for Ptc-induced apoptosis. (**a**) *TUCAN* siRNA efficiency and specificity is shown by western blotting of endogenous TUCAN protein in HEK293T cells expressing scrambled siRNA (scramble), *TUCAN* siRNA (si *Tu*) or *caspase-9* siRNA (si *C9*). The same was done with NALP1, but *NALP1* siRNA efficiency was assessed in HEK293T cells overexpressing NALP1. An anti-actin immunoblot is shown as a control of specificity and loading. See Supplementary Information, Fig. S7d for full blots. (**b**) HEK293T cells were transfected with an empty vector (control), Bax or Ptc either without treatment (–) or in the presence of caspase inhibitor zVAD-fmk (zVAD), scrambled siRNA (scramble) or *TUCAN* siRNA plus *NALP1* siRNA (si *Tu* + *N*) and cell death was analysed using a trypan blue exclusion assay. (**c**) Ptc-induced caspase activation is inhibited by a combination of *TUCAN* siRNA plus *NALP1* siRNA as measured by relative caspase-3 activity. HEK293T cells were transfected with mock vector pcDNA3 (control) or with Ptc in the presence of scrambled siRNA (scramble) or *TUCAN* siRNA plus *NALP1* siRNA (si *Tu* + *N*). The index of relative caspase activity is presented as the ratio of the caspase activity of the sample to that measured in the control. Cell death was also compared in primary cultured cerebellar granule neurons from either a CBA/J or a C57Bl/6/J genetic background when deprived of Shh. Whereas death of primary neurons was detected in the CBA/J culture, no cell death was detected in the C57Bl/6/J culture (Supplementary Information, Fig. S3). (**d**) HEK293T cells were transfected with an empty vector (control), Bax or Ptc either without treatment (–) or in the presence of zVAD-fmk (zVAD), scrambled siRNA (scramble), *caspase-8* siRNA (si C8) or *caspase-9* siRNA (si C9) and cell death was analysed using a trypan blue exclusion assay. *Caspase-8* and *9* siRNA efficiencies are shown by western blotting using anti-caspase-8 and 9 antibodies. An anti-actin western blot is shown as a control of specificity and loading. (**e**) HEK293T cells were co-transfected with an empty vector (control), Bax or Ptc plus either an empty vector (–), caspase-8 dominant-negative (C8 DN) or caspase-9 dominant-negative (C9 DN). Cell death was analysed as in **d**. In **b**–**e**, data are mean ± s.d., $n = 3$.

the association of DRAL with Ptc (Fig. 1j). Thus, Ptc directly interacts with DRAL both in cell culture and in the developing brain, and this interaction is prevented by Shh.

As a first assay to monitor the functional role of the Ptc–DRAL interaction, Ptc-induced cell death was assessed by Ptc transient expression in HEK293T cells[5] after DRAL gene silencing by short interfering RNA (siRNA). *DRAL* siRNA dramatically reduced endogenous DRAL expression in HEK293T cells, whereas the control siRNA did not (inset, Fig. 2a). Ptc-induced cell death was reduced when DRAL was downregulated by siRNA (Fig. 2a). In contrast to Ptc, overexpression of the classic cell-death inducer Bax triggered HEK293T cell death to a similar extent irrespective of *DRAL* siRNA expression. Thus, in immortalized cells, Ptc requires DRAL to trigger cell death.

We next analysed whether Ptc-induced cell death requires DRAL *in vivo*. Whereas it has been extensively demonstrated that Shh acts as a morphogen during nervous system development[1], several studies have shown that Shh may also act as a survival factor[4,20]. Consistently, it has been shown that the experimental withdrawal of Shh in chick embryos leads to massive death of neuroepithelial cells in the developing neural tube[3,20]. We have demonstrated that this survival activity is due to Shh-induced inhibition of Ptc pro-apoptotic activity[5]. In initial studies, we and others used surgical procedures to prevent Shh production by the notochord and floor plate. We investigated whether a similar effect could be observed by the ectopic expression of HHIP1 (hedgehog-interacting protein 1), a protein known to inhibit Shh signalling through direct interaction[21]. The left side of the developing

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

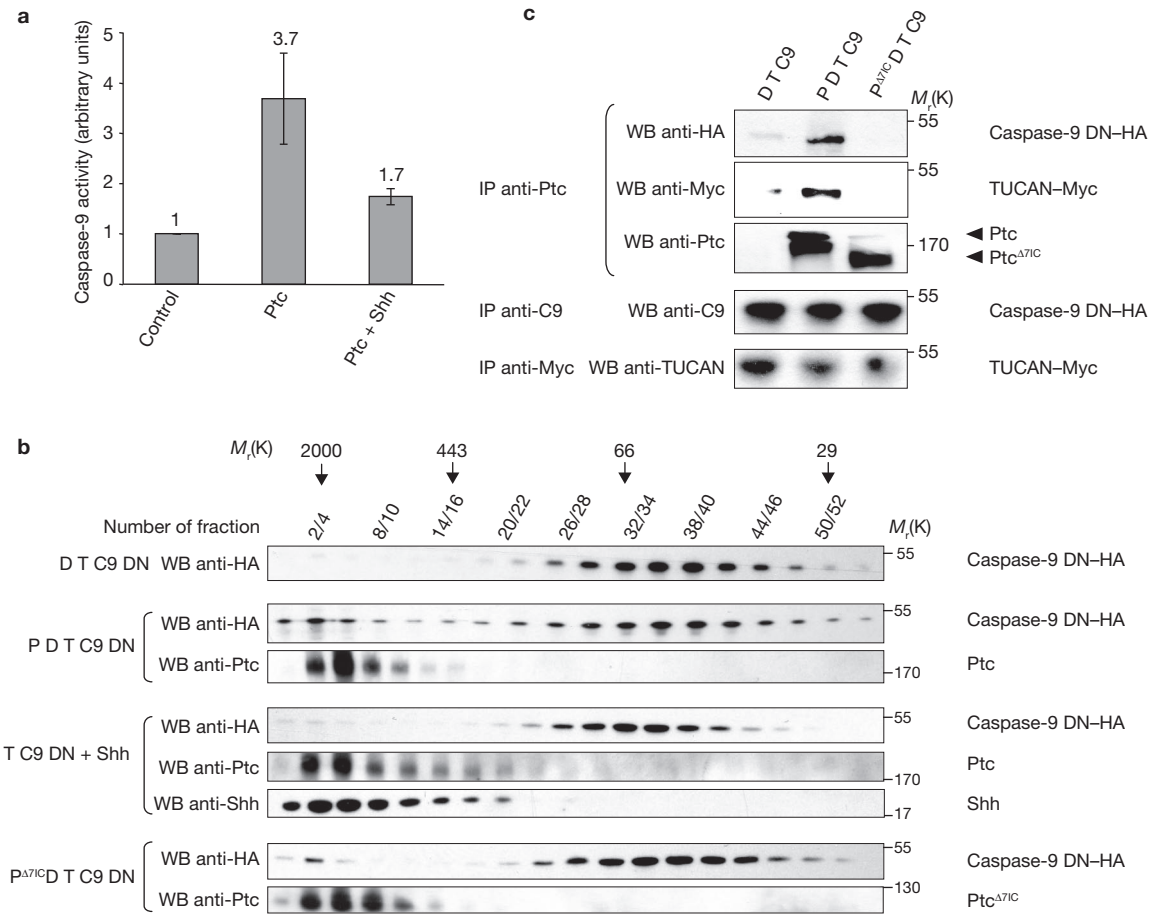


Figure 5 Ptc pro-apoptotic complex recruits and activates caspase-9. (**a**) HEK293-EcRShh cells were transfected with either an empty vector (control) or Ptc encoding vector in the absence (Ptc) or in the presence (Ptc + Shh) of Shh (induction with Muristerone A plus addition of 300 ng ml^{-1} of recombinant Shh). The cell lysates were subjected to a caspase-9 activity assay over time using the LEHD-AFC substrate of caspase-9. Data are mean ± s.d., $n = 4$. (**b**) HEK293-EcRShh cells were transfected with DRAL–FlagM2, TUCAN–Myc and caspase-9 dominant negative (DN)–HA vectors plus an empty vector (D T C9), Ptc vector in the absence of Shh (P D T C9) or in the presence of Shh (P D T C9 + Shh; induction by Muristerone A plus recombinant Shh), or Ptc deleted of its seventh intracellular domain (P$^{\Delta 7IC}$ D T C9). Cell lysates were separated by gel filtration chromatography. Fractions were then analysed by western blotting for caspase-9, Ptc and Shh. The numbers of the fractions and the fractions in which the molecular mass markers were eluted are shown. (**c**) The 20 first fractions were pooled and Ptc pulldown experiments were performed. Anti-HA and anti-Myc immunoblots showed that caspase-9 and TUCAN interact with Ptc in these high molecular weight fractions. The relative quantity of proteins of interest (caspase-9 and TUCAN) in cell lysates of each condition was checked by immunoprecipitation and western blotting with anti-caspase-9 and anti-TUCAN antibodies, respectively.

neural tube of HH11-13 chick embryos was co-electroporated *in ovo* with green fluorescent protein (GFP) and either a control or HHIP1 expression construct. Whereas GFP was detected after electroporation, a significant increase in apoptosis, measured by TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling) staining, was observed in HHIP1 electroporated neural tubes compared with mock electroporated embryos (as shown in Supplementary Information, Fig. S2a, b). To further confirm that this HHIP1-dependent cell death was related to the loss of Shh inhibition of Ptc-induced apoptosis, a dominant-negative mutant of Ptc[5] was co-electroporated with HHIP1. Consistent with our previous data[5], the Ptc dominant-negative mutant inhibited HHIP1-induced apoptosis (Supplementary Information, Fig. S2a, b). Thus, HHIP1 electroporation triggers Ptc-induced apoptosis *in vivo*. We then assessed the importance of DRAL in Ptc-induced cell death by co-electroporating HHIP1 with a DRAL short hairpin RNA (shRNA)-expressing construct that is effective at inhibiting chick DRAL expression (Supplementary Information, Fig. S2c). Whereas scrambled shRNA failed to suppress HHIP1-induced apoptosis, *DRAL* shRNA significantly inhibited HHIP1-induced apoptosis (Supplementary Information, Fig. S2a, b). Moreover, similar inhibition by *DRAL* shRNA was observed when electroporation of HHIP1 was performed more ventrally through the use of an electrode located below the neural tube (Supplementary Information, Fig. S2d). It is, however, intriguing to note that HHIP1-electroporations were associated with cell death occurring mainly in the middle third and the dorsal third of the neural tube, but only modestly in the third ventral neural tube. The discrepancy between this apparent dorsal cell death and the higher Shh level detected ventrally, raised the possible limitation of Shh titration by HHIP1. However, similar cell-death inhibition after *DRAL* shRNA electroporation was observed when Shh production was reduced using a surgical procedure[3,5] (Fig. 2bc). Thus, together these data support the view that cell death induced after inhibition of Shh in the developing neural tube requires DRAL.

DRAL has been shown to interact with TUCAN, a protein initially thought to bind to caspase-9 (ref. 19). Because caspase-9 has been

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

implicated in the pro-apoptotic activity of many dependence receptors[9,13], we explored whether TUCAN might be part of a Ptc–DRAL complex that could allow the recruitment of caspase-9, using co-immunoprecipitation experiments with HEK293 cells. As shown in Fig. 3a, Ptc immunoprecipitation resulted in the pulldown of DRAL, TUCAN and caspase-9. Similarly, TUCAN immunoprecipitation pulled down Ptc and caspase-9 (Fig.3b). Interestingly, the presence of Shh strongly inhibited the interaction between TUCAN and Ptc, while also decreasing the interaction between TUCAN and caspase-9 (Fig. 3ab). Thus, in the absence of the dependence ligand Shh, Ptc allows the recruitment of a complex that includes DRAL, TUCAN and caspase-9.

TUCAN is composed of two main domains: a FIIND domain located in the amino-terminal region and a CARD domain at the carboxyl terminus which is known to interact with caspases (see scheme, Fig. 3c). Interestingly, deletion of the N-terminal region of TUCAN is sufficient to abrogate the interaction of Ptc–DRAL with TUCAN (Fig. 3d). This N-terminal domain is closely related to a domain found in NALP1 (NLR family, pyrin domain containing 1; 66% homology in human), another CARD domain-containing protein known to recruit caspases that has been implicated in both cell death regulation and inflammation[22,23] (Fig. 3c). Using a similar co-immunoprecipitation approach, NALP1 was also pulled down with Ptc, but this interaction was strongly reduced in the presence of Shh (Fig. 3e, f). A control for specificity, ASC (apoptosis speck protein) a protein related to NALP1, failed to interact with Ptc (Fig. 3c, g). Interestingly, whereas TUCAN-knockdown by *TUCAN* siRNA expression (Fig. 4a), was not sufficient to fully and reproducibly inhibit Ptc-induced cell death (data not shown), *TUCAN* and *NALP1* siRNA co-expression completely inhibited the cell death observed after Ptc transfection in HEK293T cells (Fig. 4bc). Thus, NALP1 or TUCAN behave as adaptor proteins of the Ptc–DRAL complex, which includes caspase-9 and seems to be required for Ptc-induced cell death. Even though TUCAN and NALPs have been implicated in the classic survival pathway NF–κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) regulation[22,24] we were able to exclude a putative link between the NF-κB pathway and the regulation of Ptc pro-apoptotic activity (Supplementary Information, Fig. S4a–c). Moreover, because TUCAN and NALP1 have been shown to also interact with caspase-1 (refs 18, 22, 25), we next investigated the specificity of caspase-9 recruitment to Ptc. Although Ptc interacted with caspase-9 after expression in HEK293T cells, Ptc failed to pulldown caspase-1 (Fig. 3g). Thus, the Ptc–DRAL interaction represents an anchor for a specific TUCAN/NALP1-caspase-9-containing complex.

To assess the importance of this DRAL–TUCAN/NALP1–caspase-9 complex in Ptc-mediated cell apoptosis, we next assessed whether Ptc-induced apoptosis requires caspase-9. As shown in Fig. 4d, whereas Ptc-induced cell death in HEK293T cells (and Bax-induced cell death as a control) was not modulated by siRNA-induced caspase-8 knockdown, it was strongly inhibited by siRNA-induced caspase-9 knockdown (Fig.4d inset). Similar results were obtained when dominant-negative mutants for caspase-8 and caspase-9 were used instead of siRNAs (Fig. 4e) or when using chemical caspase inhibitors (data not shown). To further address the requirement of caspase-9 in a biological system where endogenous Ptc induces apoptosis after Shh deprivation, developing neural tubes of HH11-13 chick embryos were co-electroporated *in ovo* by GFP and a HHIP1 expression construct together with a dominant-negative mutant for caspase-9. While HHIP1 electroporation triggered apoptosis, co-electroporation with the mutant strongly inhibited Ptc-mediated apoptosis (Supplementary Information, Fig. S5a, b).

Given that Ptc interacts with caspase-9 (through a DRAL–TUCAN/NALP1 complex) and that Ptc requires caspase-9 to trigger apoptosis both in immortalized cells in culture and in the developing neural tube *in vivo*, we hypothesized that ligand-free Ptc activates caspase-9. To investigate this possibility, we analysed the activity of caspase-9 by measurement of LEHD–AFC substrate cleavage in HEK293 cells transfected with Ptc. As shown in Fig. 5a, Ptc triggered caspase-9 activity whereas the presence of Shh strongly decreased this Ptc-induced effect. We next analysed whether this activation is associated with the formation of large caspase-9-containing complexes, by analogy to other initiator caspase-activating complexes[26]. To this end, gel-exclusion chromatography analysis of caspase-9 was performed using lysates from control and Ptc-expressing HEK293 cells. Although in the absence of Ptc, caspase-9 was detected at a small exclusion size (relative molecular mass, M_r, 50,000–100,000, 50K–100K), the presence of Ptc triggered a shift of caspase-9 toward the higher molecular weight fractions, such that caspase-9 was also detected to have M_r in the 1000K-2000K size fraction (Fig. 5b). As a negative control, Ptc deleted of its pro-apoptotic domain (seventh intracellular domain) failed to trigger this shift toward larger fractions (Fig. 5b). Moreover, the presence of caspase-9 in higher fractions observed on Ptc expression was inhibited in the presence of Shh (Fig.5b). Interestingly, in the absence of Shh, when caspase-9 was detected in the high molecular weight fractions, caspase-9 was present in a complex containing Ptc and TUCAN, as shown by co-immunoprecipitation experiments (Fig. 5c). When endogenous caspase-9 was pulled down by Ptc, the caspase-9 recruited in the Ptc complex was proteolytically processed (Supplementary Information, Fig. S6), further confirming that, in the absence of Shh, Ptc induces a complex of high molecular mass that includes DRAL and TUCAN (and/or NALP1), which results in caspase-9 activation.

Our data support the view that cell-death initiation by the Ptc dependence receptor occurs through the recruitment of a protein complex that results in the activation of caspase-9. In this regard, caspase-9 is an initiator or apical protease involved in the control of a downstream cascade of caspase activation that leads to apoptosis. Initiator caspases are typically activated through formation of large multi-protein complexes (see review)[27]. Among the known caspase-activating complexes of mammals are the apoptosome (comprising Apaf-1, cytochrome c and caspase-9), the DISC (comprising Fas, FADD and caspase-8; ref. 14), the PIDDosome (comprising PIDD, RAIDD and caspase-2; ref. 28) and the inflammasome (comprising NALPs, ASC, caspase-1 and caspase-5; ref. 22). Here we report the existence of a fifth caspase-activating complex that signals downstream of the dependence receptor Ptc. Future work will aim to define whether this 'dependosome' is a common platform for dependence-receptor death signalling, as suggested by the interaction of DCC with caspase-9 and the requirement of caspase-9 for DCC to trigger cell death[13].

In addition to the adaptor protein DRAL, the Ptc-based activating complex also requires either TUCAN or NALP1. Whereas TUCAN directly binds to pro-caspase-9 through their CARD-domains, NALP1 has been reported to indirectly bind through association with the pro-caspase-9-binding protein Apaf-1 (ref. 29). Whether Apaf-1 can also be recruited to the Ptc-dependence receptor complex remains to be investigated. Similarly, it will be interesting to determine the stoichiometry of the Ptc complex that activates caspase-9, as the observation that caspase-9

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

is detected in a complex of M_r 1000K–2000K in Ptc-expressing cells suggests the formation of a multimeric complex, similar to other caspase-activating platforms.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at http://www.nature.com/naturecellbiology

Note: Supplementary Information is available on the Nature Cell Biology website.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank J. Briscoe and N. Le Douarin for advice and reagents, B. W. Schafer, C. Sardet and R. Sadoul for reagents, K. Cywinska for technical work on immunoprecipitation experiments and L. Kremer for the 5e1 hybridoma cell line (protein tools service at the Centro Nacional de Biotecnologia of Madrid). This work was supported by the Ligue Contre le Cancer, the Agence Nationale de la Recherche, the Institut National du Cancer, the Rhône-Alpes Region, the Centre National de la Recherche Scientifique, the EU grants Hermione and APO-SYS, NIH grants to P.M. (NS45093) and J.C.R. (AI56324), and a Rhône-Alpes Region fellowship and an Association pour la Recherche sur le Cancer fellowship to F.M.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.M., C.T., J.F., N.R., H.H. and V.C. performed experiments and analysed data; C.G. performed experiments; J.C.R. provided materials; C.T planned the project and P.M. planned the project, analysed data and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at http://www.nature.com/naturecellbiology/
Reprints and permissions information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

1. Jessell, T. M. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nature Rev. Genet.* **1,** 20–29 (2000).
2. Murone, M., Rosenthal, A. & de Sauvage, F. J. Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothened receptor complex. *Curr. Biol.* **9,** 76–84 (1999).
3. Charrier, J. B., Lapointe, F., Le Douarin, N. M. & Teillet, M. A. Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development* **128,** 4011–4020 (2001).
4. Litingtung, Y. & Chiang, C. Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nature Neurosci.* **3,** 979–985 (2000).
5. Thibert, C. *et al.* Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* **301,** 843–846 (2003).
6. Mehlen, P. *et al.* The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395,** 801–804 (1998).
7. Bredesen, D. E., Mehlen, P. & Rabizadeh, S. Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol. Rev.* **84,** 411–430 (2004).
8. Mehlen, P. & Bredesen, D. E. The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* **9,** 37–49 (2004).
9. Tauszig-Delamasure, S. *et al.* The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104,** 13361–13366 (2007).
10. Furne, C. *et al.* EphrinB3 is an Anti-apoptotic Ligand that Inhibits the Dependence Receptor Functions of EphA4 Receptors during adult neurogenesis *Biochem. Biophys. Acta* **1793 (2),** 231–238 (2009).
11. Hahn, H. *et al.* Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* **85,** 841–851 (1996).
12. Goodrich, L. V., Milenkovic, L., Higgins, K. M. & Scott, M. P. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277,** 1109–1113 (1997).
13. Forcet, C. *et al.* The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98,** 3416–3421 (2001).
14. Zimmermann, K. C. & Green, D. R. How cells die: apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108,** S99–103 (2001).
15. Johannessen, M., Moller, S., Hansen, T., Moens, U. & Van Ghelue, M. The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell. Mol. Life Sci.* **63,** 268–284 (2006).
16. Scholl, F. A., McLoughlin, P., Ehler, E., de Giovanni, C. & Schafer, B. W. *DRAL* is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **151,** 495–506 (2000).
17. Stilo, R. *et al.* TUCAN/CARDINAL and DRAL participate in a common pathway for modulation of NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* **521,** 165–169 (2002).
18. Razmara, M. *et al.* CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277,** 13952–13958 (2002).
19. Pathan, N. *et al.* TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *J. Biol. Chem.* **276,** 32220–32229 (2001).
20. Charrier, J. B., Teillet, M. A., Lapointe, F. & Le Douarin, N. M. Defining subregions of Hensen's node essential for caudalward movement, midline development and cell survival. *Development* **126,** 4771–4783 (1999).
21. Stamataki, D., Ulloa, F., Tsoni, S. V., Mynett, A. & Briscoe, J. A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev.* **19,** 626–641 (2005).
22. Tschopp, J., Martinon, F. & Burns, K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4,** 95–104 (2003).
23. Liu, F. *et al.* Expression of NALP1 in cerebellar granule neurons stimulates apoptosis. *Cell Signal* **16,** 1013–1021 (2004).
24. Kinoshita, T., Wang, Y., Hasegawa, M., Imamura, R. & Suda, T. PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1-dependent interleukin-1 β secretion. *J. Biol. Chem.* **280,** 21720–21725 (2005).
25. Faustin, B. *et al.* Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol. Cell* **25,** 713–724 (2007).
26. Boatright, K. M. *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* **11,** 529–541 (2003).
27. Riedl, S. J. & Salvesen, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **8,** 405–413 (2007).
28. Tinel, A. & Tschopp, J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* **304,** 843–846 (2004).
29. Chu, Z. L. et al. A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276,** 9239–9245 (2001).

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

METHODS

Site directed mutagenesis and plasmid constructs. The different constructs used in this study are detailed in Supplementary Information, Methods. The pcDNA3-Ptc-7ICmyr construct was obtained by polymerase chain reaction (PCR) on the pcDNA3-Ptc-7IC plasmid with the primers Ptc-myr7IC-F and Ptc-7IC-HA-R. The Ptc mutant with the deletion of its seventh intracellular domain (7IC; pRK5–PtcΔ7IC) was obtained by directed mutagenesis through Quikchange strategy (Stratagene) on pRK5-Ptc with mPtc1-Δ7IC-F and mPtc1-Δ7IC-R. For two-hybrid screening, the coding sequence of Ptc-7IC from pcDNA3-Ptc-7IC was amplified by PCR using the primers mPtc1-Eco-7IC-F and mPtc1-Pst-7IC-R and then inserted into pGBKT7 plasmid by digestion through EcoRI-PstI. By directed mutagenesis using Quikchange strategy on the resulting plasmid, a stop amino acid was generated in position 1393, to obtain the pGBKT7-GAL4 DNA-binding domain–Ptc 1165–1392 fusion plasmid (for primers sequence mPtc1-1393StopQC-F and mPtc1-1393StopQC-R, see Supplementary Information, Table S1). The construct pcDNA3-DRAL-3×FlagM2ΔLIM2 deleted only of its LIM2 domain was obtained by directed mutagenesis with Quikchange strategy using the primers DralΔLim2-F and DralΔLim2-R on the plasmid pcDNA3-DRAL-3×FlagM2 as matrix. A pcDNA3 plasmid encoding haemagglutinin (HA)-tagged DRAL from chicken was generated by PCR on cDNAs of one-day-old chick embryos by using the primers Chick-DRAL-F and Chick-DRAL-R. This plasmid was used as matrix to be amplified by PCR DRAL-encoding sequence using the primers pCAGGS-Chick-DRAL-XhoI-F and pCAGGS-Chick-DRAL-BglII-R. The PCR product was inserted into a pCAGGS vector. The pcDNA3-TUCANΔNTer plasmid was obtained by PCR using the primers TUCANΔNTerm-F and TUCANΔNTerm-Myc-R on the pcDNA3-TUCAN-Myc plasmid. For the *in ovo* chick electroporation, most constructs were based in pCAGGS which was also used as empty vector. pCAGGS-caspase-9 dominant negative was constructed by subcloning from pcDNA3-caspase-9 dominant negative[13] into a pCAGGS vector. Primers to construct pSilencer1.0-U6 containing small interfering hairpins of *DRAL* mRNA were designed with siRNA Target Designer program (Promega). See Supplementary Information, Table S1 for primers.

Cell cultures, transfection procedures, reagents and immunoblotting. Transient transfection of HEK293T cells and HEK293 cells expressing Muristerone A-inducible Shh (HEK293-EcRShh) was performed as described previously[5]. Daoy cells (ATCC, #HTB-186) were grown in 10% DMEM media on poly-L-lysine (Sigma)-coated round coverslips. Primary cultured cerebellar granule neurons (CGNs) were prepared from P6-aged mice (NMRI). 5e1 hybridoma cells producing a Shh-blocking antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank), were maintained in 20% DMEM. Immunoblotting was performed as described previously[6], except antibodies were obtained from different sources and different dilutions were used (Supplementary Information, Methods). Recombinant Shh-N was from R&D systems. To induce Shh production in HEK293-EcRShh cells, Muristerone A (A.G. Scientific Inc.) was used (1 μM).

Yeast two-hybrid screen and co-immunoprecipitation. Matchmaker two-hybrid system III (Clontech) was used according to the manufacturer's instructions, using the DNA-binding domain GAL4 fused to Ptc residues 1165–1392 as a bait and the GAL4 transcriptional activation domain AD fused to a human fetal brain cDNA library (Clontech) as prey. *In vitro* co-immunoprecipitation were carried out on HEK293T or HEK293-EcRShh cells transfected with various tagged constructs as described previously[13]. For experiments requiring Shh, after plating and at the time of transfection cells were untreated or treated with Muristerone A, and recombinant Shh was added (to a final concentration of 300 ng ml^{-1}) 24 h before collecting the cells. *In vivo* immunoprecipitations were performed in OF-1 mice cortex embryos. Two cortices were dissected from embryonic day (E) 16.5 embryos, cut in small species and triturated. Shh-treated cortices were incubated for 40 min at 37 °C in conditioned supernatant of HEK293-EcRShh-induced cells in which recombinant Shh-N (R&D systems) was added (900 ng per cortex). Non-treated cortices were incubated in the same condition in supernatant of non-induced HEK293-EcRShh cells and without addition of recombinant Shh-N. Dissociated cortices were further processed for immunoprecipitation using μMACS Protein G MicroBeads system (Miltenyi Biotec).

Co-localization studies. After transfection or treatment as described in Supplementary Information, Materials, HEK293T, Daoy or CGNs cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min, washed and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 30 min. The coverslips were mounted in crystal/mount (Biomeda) and photographed with a Zeiss Axioplan2 LSM510 confocal microscope. Profiles were created using Axiovision 4.0V4.6.1.0 program.

Gel filtration. Gel filtrations were performed as described in Supplementary Information, Materials, using size-exclusion chromatography on High Prep Sephacryl S300 (HR 16/60) columns using an FPLC protein purification system (Biologic HR, Biorad). Proteins were separated with the lysis buffer. Columns were calibrated with protein standards (29K–2000K) according to the manufacturer's instructions (Sigma). Aliquots of the fractions were analysed on Criterion XT Precast gels (Bis-Tris 4–12%; Biorad) and western blotting. Aliquots of the twentieth first fractions were also pooled and used for co-immunoprecipitation experiments as described for *in vitro* co-immunoprecipitation.

Cell death analysis and caspase assays. Cell death was analysed 24 h after transfection using trypan blue staining procedures as described previously[5]. Cell death was also analysed using Toxilight assay (Lonza) according to the manufacturer's instructions. For caspase-9 activity fluorometric assay, HEK293-EcRShh cells were treated twice (when seeded and when transfected) with Muristerone A for the condition with Shh, and recombinant Shh-N (300 ng ml^{-1}) was added 1 h before collecting the cells. Caspase-9 activity was then measured by using the caspase-9 fluorometric assay kit (BioVision). Caspase-3 activity was measured by using the caspase-3 fluorometric assay kit (BioVision) as described previously[5].

Chick *in ovo* experiments and TUNEL staining on chick embryos. Cell-death analysis in the developing chick neural tube was performed using fertilized chicken eggs obtained from a local farm and incubated at 38 °C. Embryos were staged according to Hamburger and Hamilton (HH). Chick embryos were electroporated with purified plasmid DNA (4.5 μg μl^{-1}; Sigma). For floor plate electroporation, chick embryos of stage HH10-11 were injected with plasmid DNA into the lumen of the neural tube and electroporated with specifically designed electrodes. In each condition, GFP was co-electroporated to check the electroporation efficiency. Chick microsurgery was done as described in previously[5], except that the electroporation performed before microsurgery was performed in only one side of the neural tube. Detection and quantification of apoptosis by TUNEL was performed using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche) as described previously[3]. For each embryo, GFP and TUNEL double-positive cells of the electroporated and non-electroporated sides of the neural tube were counted in more than six sections. The ratio of the number of TUNEL-positive cells from the electroporated side to that of the non-electroporated side was then calculated. For each condition, results from at least five embryos were used to calculate a mean of the ratio. A U test was done to evaluate if the difference between various conditions was significant. Fluorescent TUNEL was performed as described previously[30].

NF-*k*B luciferase reporter assays. Analysis of NF-*k*B activation was performed according standard luciferase reporter assays as described in Supplementary Information, Methods.

30. Furne, C., Rama, N., Corset, V., Chedotal, A. & Mehlen, P. Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105,** 14465–14470 (2008).

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

nature cell biology

DOI: 10.1038/ncb1880

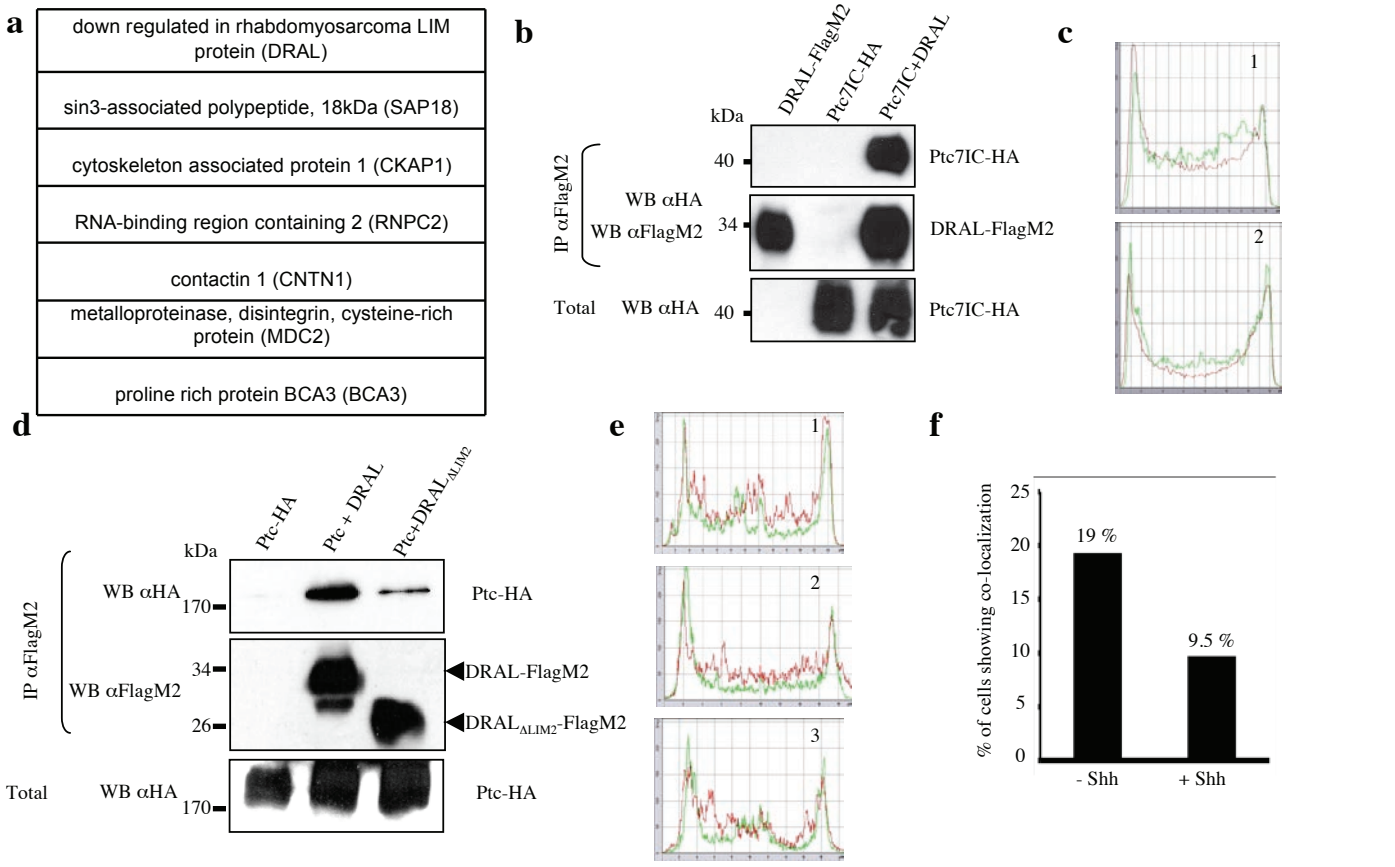


Figure S1 Mapping of Ptc and DRAL domains of interaction. (**a**) The putative seven Ptc partners found by two hybrid screen are shown. (**b**) Co-immunoprecipitations were performed on HEK293T cells transiently transfected with empty vector and either Ptc-7ICmyr (Ptc-7IC-HA) or DRAL vectors (DRAL-FlagM2) or transfected with Ptc-7ICmyr and DRAL vectors (Ptc-7IC + DRAL). Anti-FlagM2 antibody was used to immunoprecipitate DRAL (IP αFlagM2) and specific binding of Ptc-7ICmyr was revealed by Western blot by using anti-HA antibody. Western blot on lysates before pull down is shown (Total). (**c**) Ptc and DRAL in HEK293T cells co-localize at the plasma membrane. Profiles 1 and 2 correspond to Merge fluorescence analysis of the two positive transfected cells from the pictures shown in Fig1f. These profiles show that Ptc and DRAL fluorescence detection superimpose at the plasma membrane. (**d**) Co-immunoprecipitations were performed on HEK293T cells transiently transfected with empty vector and Ptc vector (Ptc-HA) or transfected with Ptc and either DRAL (Ptc + DRAL) or DRAL deleted of its LIM2 domain vectors (Ptc + $DRAL_{\Delta LIM2}$). Anti-FlagM2 antibody was used to immunoprecipitate DRAL (IP αFlagM2) and specific binding of Ptc was revealed by Western blot by using anti-HA antibody. Western blot on lysates before pull down is shown (Total). (**e**) Ptc and DRAL in Daoy cells co-localized at the plasma membrane mainly in the absence of Shh. Profiles 1, 2 and 3 correspond to Merge fluorescence analysis of three positive cells from the pictures shown Fig1h. These profiles show that Ptc and DRAL fluorescence detection superimposes at the plasma membrane. (**f**) Ptc and DRAL co-localization in cerebellar granular neurons is twice greater in the absence of Shh than in the presence of Shh. Total and yellow cells of five large fields were counted. The graphic is the representation of the % of the sum of yellow cells over the total number of cells counted on 5 randomly chosen fields (137 cells total were counted for the condition with Shh and 189 cells total were counted for the condition without Shh).

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

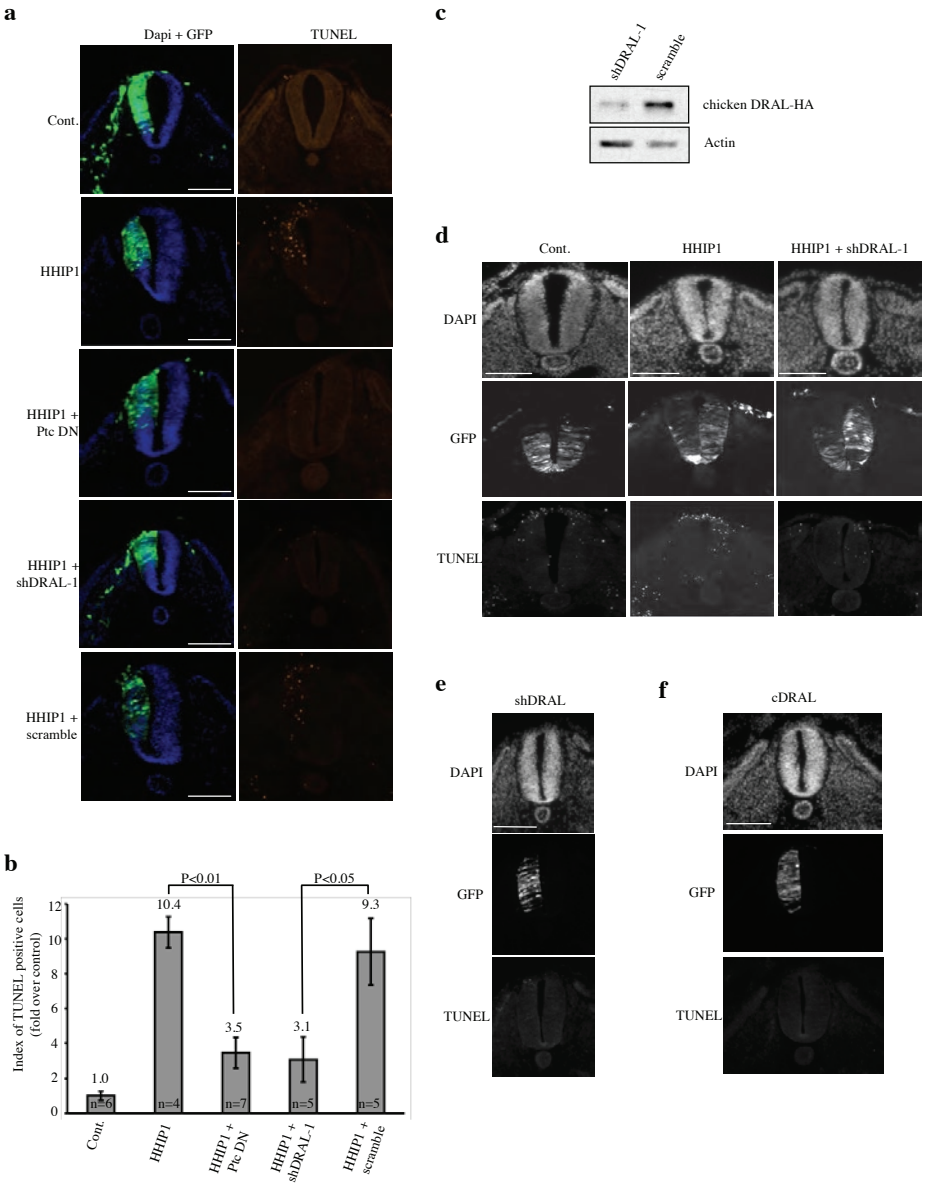


Figure S2 DRAL is required for Ptc-induced apoptosis *in vivo* during neural tube development. (**a**) DRAL function in Ptc-induced apoptosis was addressed *in vivo* by lateral electroporation of HHIP1 with or without shDRAL-1. In control condition (Cont.), HH 11-13 stage chick embryos were electroporated *in ovo* with GFP and empty vector. In all other conditions, embryos were co-electroporated with GFP and HHIP1 with either control vector (HHIP1) or Ptc dominant-negative (HHIP1 + Ptc DN) or shDRAL-1 (HHIP1 + shDRAL-1) or scramble (HHIP1 + scramble). A representative image of each condition is presented. Electroporated side of the neural tube is on the left side of the figures. Nuclei of cells and electroporation efficiency are shown on the left pictures (Dapi + GFP) and fluorescent TUNEL staining of the same sections are shown on the right pictures (TUNEL). The number of TUNEL positive cells is increased in the HHIP1-electroporated side of the neural tube. When co-electroporated with Ptc DN and shDRAL-1, HHIP1-induced apoptosis is inhibited. (**b**) Graphic representation of the TUNEL positive cells quantification as the mean of at least four embryos per condition (the exact number of embryo per each condition is indicated in the graphic). For each condition, the number of TUNEL positive cells in the ¾ ventral of the neural tube was quantified with respect to the electroporated area (GFP volume). Index of TUNEL positive cells is the ratio between the value of each condition and the value in the control condition (GFP). Error bars indicate SEM. U test was performed and p values are indicated. (**c**) A pcDNA3 plasmid encoding chicken DRAL HA-tagged was co-transfected with scramble or shDRAL-1 in HEK293T cells. Cell lysates were analyzed by Western blotting by using anti-HA antibody. Anti-Actin Western blot is shown as a control of loading. (**d**) Floor plate electroporation was performed *in ovo* in HH10-11 stage chick embryos. Conditions Cont., HHIP1 and HHIP1 + shDRAL-1 are same as described in (**a**). Fluorescent TUNEL staining was performed. A representative image of each condition is shown. (**e**) HH 11-13 stage chick embryos were electroporated with GFP and shDRAL-1 vectors. A representative image is presented. Electroporated side of the neural tube is to the left side of the figures. The section of the embryo is shown on top (DAPI). Electroporation efficiency is shown in the picture in the middle (GFP) and TUNEL staining of the corresponding section is shown in the bottom picture (TUNEL). The number of TUNEL positive cells is not modified in the shDRAL-electroporated side of the neural tube. (**f**) Same as in (**e**) but HH 11-13 stage chick embryos were electroporated *in ovo* with GFP and a vector encoding DRAL of chicken (cDRAL). A representative image is presented. Electroporated side of the neural tube is to the left side of the figures. The section of the embryo is shown on top (DAPI). Electroporation efficiency is shown in the picture in the middle (GFP) and TUNEL staining of the corresponding section is shown in the bottom picture (TUNEL). The number of TUNEL positive cells is not modified in the cDRAL-electroporated side of the neural tube. Scale bars : 50 μm.

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

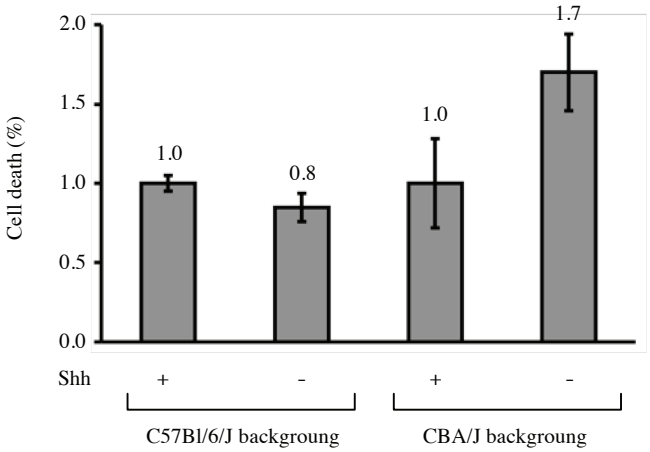


Figure S3 Effect of mice genetic background on Shh survival of primary cerebellum granular neurons. Primary culture of cerebellum granular neurons were prepared from C56Bl/6/J and CBA/J background mice. After 4 days of culture, cells were incubated during 24 hours in the presence of purified 5e1 antibodies (4 μg/ml) for a condition without Shh (Shh -) or with the antibody purification's buffer for a condition with Shh (Shh +). Cell death in each condition for the two genetic backgrounds was then assayed by Toxilight assay. Shh inhibition triggers cell death only in the CBA/J background.

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

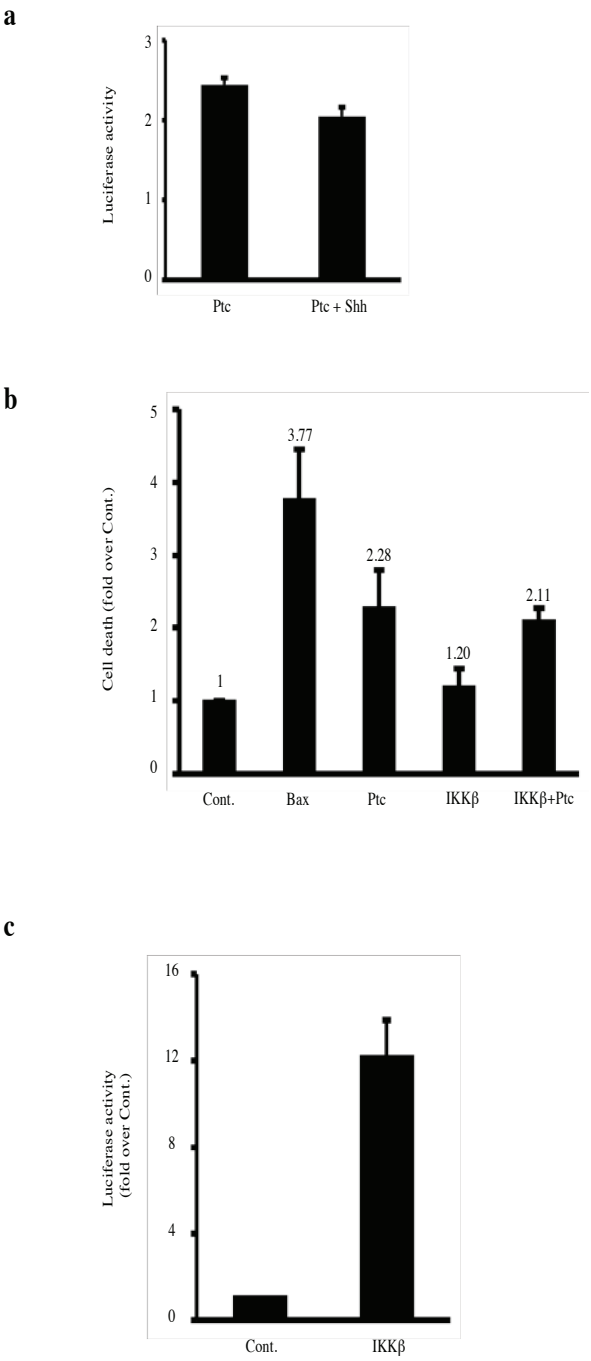


Figure S4 NF-κB pathway in Ptc-induced cell death. (**a**) HEK293-EcRShh cells were transiently co-transfected with *Renilla* luciferase expressing construct, a pFLRG-luciferase reporter and a Ptc-encoding vector in the absence of Shh (Ptc) or in the presence of Shh (Ptc + Shh) following both Muristerone A treatment plus addition of recombinant Shh. Cell lysates were prepared and luciferase activity associated with NF-κB activation and consequently with pFLRG driven luciferase reporter was measured in triplicate. Luciferase activity values were normalized to *Renilla* luciferase activity values to correct for variability in transfection efficiency between wells. Results are representative of at least six separate experiments. (**b**) HEK293T cells were transiently transfected with empty vector (Cont.), Bax encoding vector (Bax), Ptc encoding vector (Ptc), NF-κB pathway activator IKKβ encoding vector (IKKβ) or Ptc encoding vector plus IKKβ encoding vector (IKKβ + Ptc) and cell death was measured by Toxilight assay. The presence of IKKβ does not modify Ptc-induced cell death (n=5). (**c**) The efficiency of IKKβ as an activator of NF-κB pathway was checked by NF-κB Luciferase assay on HEK293T cells as described in (**a**). Results are representative of at least six separate experiments.

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

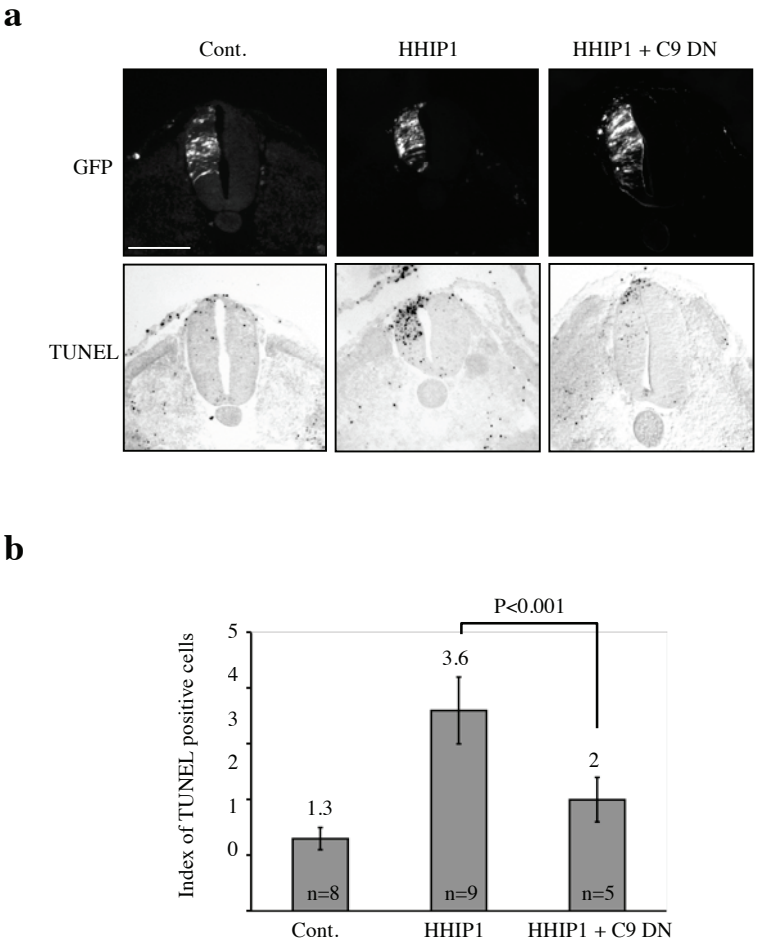


Figure S5 Requirement of caspase-9 in Ptc-induced apoptosis *in vivo*. (**a**) HH 11-13 stage chick embryos neural tube were electroporated as described Supp.Fig.2a with GFP and empty vector (Cont.), HHIP1 with empty vector (HHIP1) or HHIP1 with caspase-9 dominant negative (HHIP1 + C9 DN). A representative image of each condition is shown. Electroporated side of the neural tube is to the left side of the figures. Electroporation efficiency is shown in the upper pictures (GFP) and TUNEL staining of the corresponding sections are shown in the lower pictures (TUNEL). The number of TUNEL positive cells is increased in the HHIP1-electroporated side of the neural tube. HHIP1-induced apoptosis is blocked by co-electroporation with caspase-9 dominant negative. Scale bar : 50 μm. (**b**) TUNEL quantification as the mean of at least five embryos per condition. Error bars indicate s.d. U test was performed ($p<0.001$). The exact number of analyzed embryos is indicated in the graphic.

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

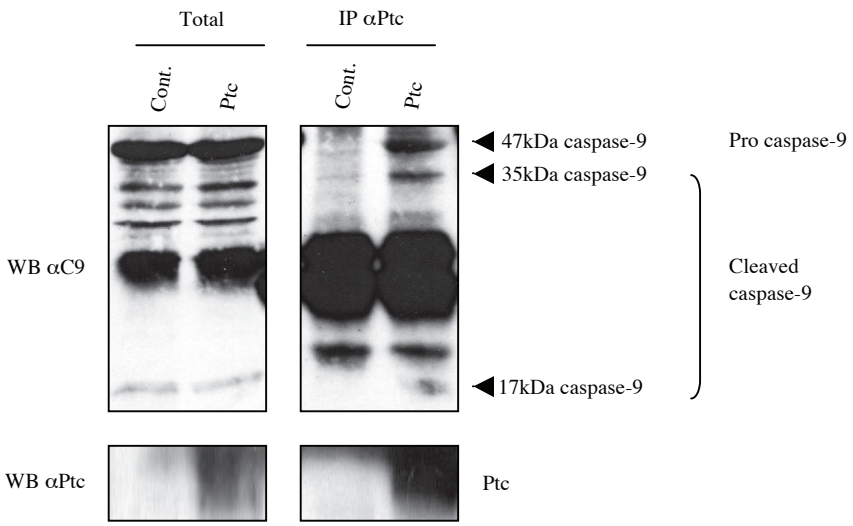


Figure S6 Full length and cleaved caspase-9 interact with Ptc. Co-immunoprecipitations between Ptc and endogenous caspase-9 were performed on HEK293T cells lysates transiently transfected with either empty vector (Cont.) or Ptc-encoding vector (Ptc) using anti-Ptc antibody (IP αPtc). Caspase-9 was detected by Western blotting using anti-caspase-9 antibody which recognizes both the full length and cleaved forms of caspase-9. Full length caspase-9 (Pro-caspase-9) and cleaved forms of caspase-9 (cleaved caspase-9) were co-immunoprecipitated by Ptc pull-down. The molecular weight of each form of caspase-9 is indicated.

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

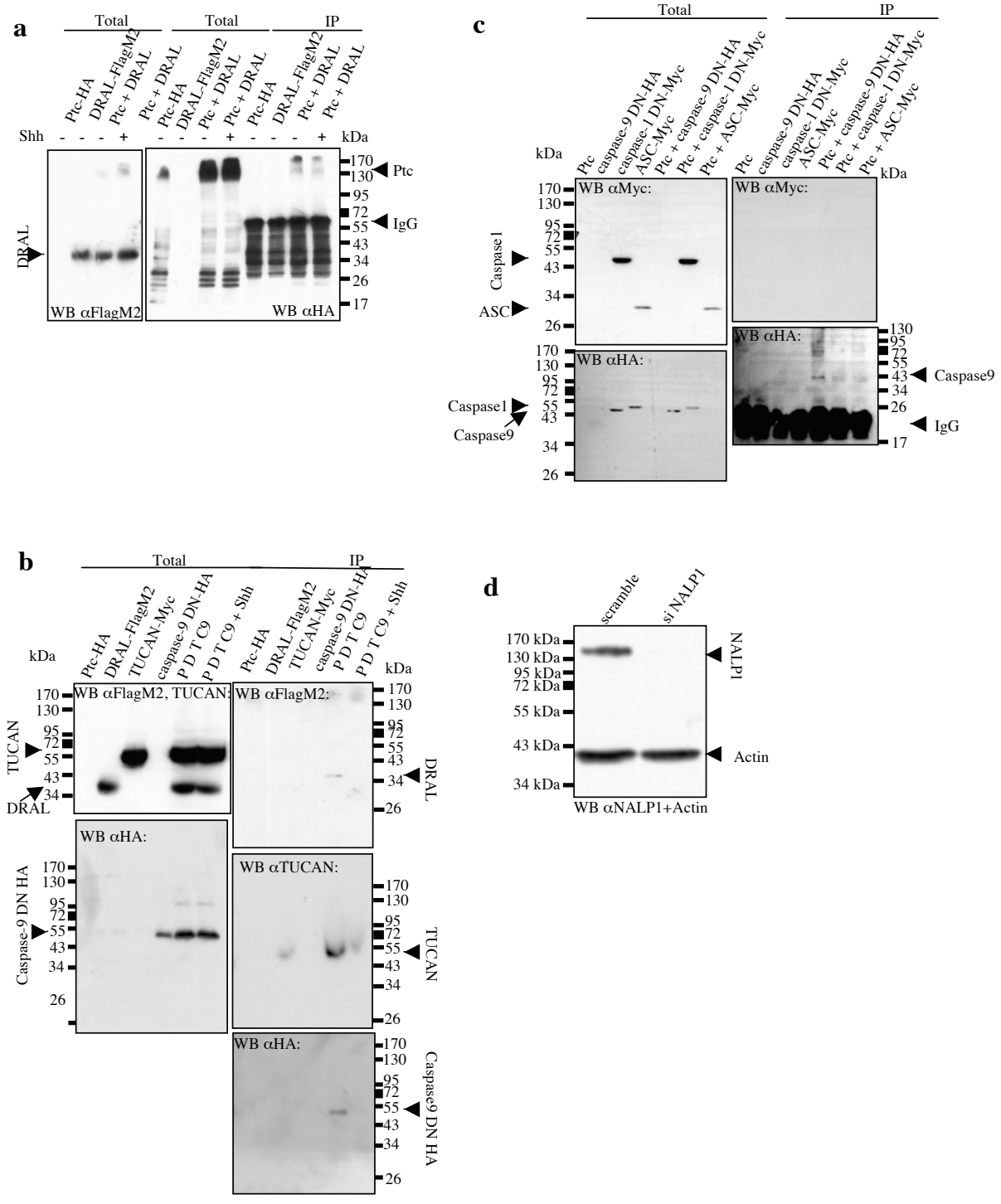


Figure S7 Full blots of key experiments. (**a**) Selected full blots for Fig.1d. (**b**) Selected full blots for Fig.3a. (**c**) Selected full blots for Fig.3g. (**d**) Selected full blots for Fig.4a.

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

Supplementary Table 1 Oligonucleotides used for cloning. The oligonucleotides used for all the cloning required for this study are shown.

mPtc1-Δ7IC-F	5'-GTCCTCTTATCCTTCTTTTAACCGTGTCCTGAG-3'
mPtc1-Δ7IC-R	5'-CTCAGGACACGGTTAAAAGAAGGATAAGAGGAC-3'
mPtc1-Eco-7IC-F	5'-GAGGCCGAATTCGGACCGTGTCCTGAGGTG-3'
mPtc1-Pst-7IC-R	5'-TAGCTTGGCTGCAGGTCAGTTGGAGCTGCT-3'
mPtc1-1393StopQC-F	5-AGCTACCCTGAGACTGATTAAGGGGTATTTGAG-3
mPtc1-1393StopQC-R	5-CTCAAATACCCCTTAATCAGTCTCAGGGTAGCT-3
Ptc-myr7IC-F	5'-GCACCATGGGGAGTAGCAAGAGCAAGCCTAAGGACCCCAGCCAGCGCGGACCGTGTCCTG-3'
Ptc-7IC-HA-R	5'-AAGGAAATGCGGCCGCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGTTGGAGCTGCTCCC-3'
DralΔLim2-F	5'-CCAACGAGTACTCATCCAAGTATGAGAAACAACATGCCATG-3'
DralΔLim2-R	5'-CATGGCATGTTGTTTCTCATACTTGGATGAGTACTCGTTGG-3'
Chick-DRAL-F	5'-CACCATGACTGAGCGTTTCGACTGCCAC-3'
Chick-DRAL-R	5'-TTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGATATCCTTTCCACATTCAGG-3'
pCAGGS-Chick-DRAL-XhoI-F	5'-AATTCTCGAGATGACTGAGCGTTTCGACTGCCAC-3'
pCAGGS-Chick-DRAL-BglII-R	5'-AATTAGATCTTTAGATATCCTTTCCACATTCAGG-3'
shDRAL1-F	5'-GGCACAATGATTGCTTTAATTCAAGAGATTAAAGCAATCATTGTGCCTTTTTT-3'
shDRAL1-R	5'-AATTAAAAAAGGCACAATGATTGCTTTAATCTCTTGAATTAAAGCAATCATTGTGCCGGCC-3'
scramble DRAL1-F	5'-GATGCCTGCATATGTAAATTTCAAGAGAATTTACATATGCAGGCATCTTTTTT-3'
scramble DRAL1-R	5'-AATTAAAAAAGATGCCTGCATATGTAAATTCTCTTGAAATTTACATATGCAGGCATCGGCC-3'
TUCANΔNterm-F	5'-CACCATGGTAGCTGCATCAGCCCCTCCT-3'
TUCANΔNterm-Myc-R	5'-TTACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGTTCCAAATTCTGCTGTCTAAGATAG-3'

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

Supplementary Methods

Site directed mutagenesis and plasmid constructs.

Plasmids encoding either entire mouse *ptc-1* gene (pRK5-Ptc) or mutant *ptc-1* gene (pRK5-Ptc-D1392N) or domains of mouse *ptc-1* gene (pcDNA3-Ptc-7IC, pcDNA3-Ptc-7IC-D1392N -Ptc dominant negative-, pcDNA3-Ptc 1165-1392) were described previously [1]. The pcDNA3-Ptc-7ICmyr construct was obtained by PCR on the pcDNA3-Ptc-7IC plasmid with the primers Ptc-myr7IC-F and Ptc-7IC-HA-R (given in Suppl. Table1). All these plasmids encode HA-tagged Ptc proteins. pRK5-Ptc plasmid encoding Ptc without tag has been described in [1]. Ptc mutant with the deletion of its last intracellular domain (pRK5-Ptc$_{\Delta 7IC}$) was obtained by directed mutagenesis *via* Quikchange strategy (Stratagene) on pRK5-Ptc with the primers given in Suppl. Table1 (mPtc1-Δ7IC-F and mPtc1-Δ7IC-R). For two-hybrid screen, the coding sequence of Ptc-7IC from pcDNA3-Ptc-7IC was amplified by PCR using the primers mPtc1-Eco-7IC-F and mPtc1-Pst-7IC-R (given in Suppl. Table1) which introduced EcoRI and PstI restriction sites. The digested PCR product was then inserted into pGBKT7 plasmid by digestion through EcoRI-PstI restriction sites. By directed mutagenesis *via* Quikchange strategy (Stratagene) on the resulting plasmid, a stop amino acid was generated in position 1393, in order to obtain the pGBKT7-GAL4 DNA binding domain/Ptc 1165-1392 fusion plasmid (for primers sequence mPtc1-1393StopQC-F and mPtc1-1393StopQC-R, see Suppl. Table1).

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

The human DRAL/FHL2 gene containing plasmid pcDNA3-DRAL-FlagM2 was obtained from B.W. Schäfer [2]. The constructs pcDNA3-DRAL-3xFlagM2 either wild type or with deletion of LIM1/2+1 (pcDNA3-DRAL-3xFlagM2$_{\Delta Lim1}$) or deletion of LIM1/2+1+2 (pcDNA3-DRAL-3xFlagM2$_{\Delta Lim1+2}$) were obtained from C. Sardet laboratory [3]. The construct pcDNA3-DRAL-3xFlagM2$_{\Delta LIM2}$ -deleted only of its LIM2 domain- was obtained by directed mutagenesis *via* Quikchange strategy (Stratagene) using the primers DralΔLim2-F and DralΔLim2-R (see Suppl. Table1) on the plasmid pcDNA3-DRAL-3xFlagM2 as matrix. A pcDNA3 plasmid encoding HA-tagged DRAL from chicken was generated by PCR on cDNAs of one day chick embryo by using the primers Chick-DRAL-F and Chick-DRAL-R given in Suppl. Table1. This plasmid was used as matrix to amplify by PCR DRAL-encoding sequence from chicken using the primers pCAGGS-Chick-FRAL-XhoI-F and pCAGGS-Chick-FRAL-BglII-R (see Supp. Table1). The PCR product was digested by XhoI and BglII and inserted into pCAGGS vector.

Human TUCAN (pcDNA3-TUCAN-Myc), NALP1 (pcDNA3-NALP1-Myc) and ASC cDNAs (pcDNA3-ASC-Myc) were previously described [4] [5] [6]. The pcDNA3-TUCAN$_{\Delta NTer}$ plasmid was obtained by PCR using the primers TUCAN ΔNTerm-F and TUCAN ΔNTerm-Myc-R (see Suppl. Table1) on the pcDNA3-TUCAN-Myc plasmid. pcDNA3-Bax was described before [7]. PcDNA3 encoding the dominant-negative caspase-9-HA and caspase-1-Myc with the mutation in the catalytic sites C287A or C285G respectively have been previously described [8] [9] [10]. For the *in ovo* chick electroporation, most constructs were based in pCAGGS which was

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

also used as empty vector. Empty pCAGGS was a kind gift from R. Sadoul [11]. pCAGGS-GFP has been described in [12]. pCAGGS-HHIP1 was a kind gift from J. Briscoe [13]. pCAGGS-caspase-9 dominant negative has been constructed by subcloning from pcDNA3-caspase-9 dominant negative [9] into pCAGGS vector by digestion through KpnI and NotI restriction sites. Primers to construct pSilencer1.0-U6 containing small interfering hairpins of DRAL mRNA were designed thanks to Promega siRNA Designer program. Primers (shDRAL1-F, shDRAL1-R, scrambleDRAL1-F, scrambleDRAL1-R, see Suppl. Table1) were hybridized by incubation in 500 mM NaCl, 60 mM TrisHCl pH 7.5, 10 mM DTT 3 minutes at 90°C and 1 hour at 37°C (final concentration of oligonucleotides was 40 ng/ml in 50 μl total). Hybridized oligonucleotides (8 ng) were ligated in linearized pSilencer 1.0-U6 (100 ng) with Roche T4 ligase DNA according to the manufacturer's instructions.

Cell cultures, transfection procedures, reagents and immunoblots.

Transient transfection of Human Embryonic Kidney 293T cells (HEK293T) and Human Embryonic Kidney 293 cells expressing Muristerone A-inducible Shh (HEK293-EcRShh [14]) were performed as previously described [1] according to a modified calcium phosphate procedure or using Lipofectamine according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Daoy cells (ATCC, #HTB-186) were grown in 10% DMEM media on poly-L-lysine (Sigma) coated round coverslip. Primary cultured cerebellar granule neurons (CGNs) were prepared from P6-

© 2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

aged mice (NMRI) as described in [15]. Primary cells were cultured on round coverslips previously coated with poly-D-lysin. 5e1 hybridoma cells producing a Shh blocking antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank), a generous gift from the Centro Nacional de Biotecnologia (Madrid), were maintained in 20% DMEM media. Immunoblots were performed as described previously [16] using anti-Myc (Sigma, 1/1000) anti-FlagM2 (Sigma, 1/5000), anti-HA (Sigma, 1/10000), anti-Ptc-1 (Santa Cruz Biotechnology, 1/1000), anti-DRAL (Abcam, 1/1000), anti-TUCAN (Abcam, 1/1000), anti-NALP1 (Abcam, 1/300), anti-caspase-8 (BD Biosciences, 1/500), anti-caspase-9 (Cell signaling, 1/1000), anti-GAPDH (Sigma, 1/5000), anti-Actin (Chemicon, 1/1000) or anti-Shh (R&D systems, 1/1000). Recombinant Shh-N was from R&D systems. To induce Shh production by HEK293-EcRShh cells, Muristerone A (A.G. Scientific, inc) was used (1 μM).

siRNA transfection.

For siRNA experiments, cells were transfected by Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) with 60 pmols siRNA total for a single siRNA transfection, or with 120 pmols siRNA total for double siRNA transfection. DRAL, caspase-8, caspase-9, NALP1, scramble siRNAs were from Santa Cruz Biotechnology; TUCAN siRNA was from Dharmacon. For DRAL, caspase-8 and -9 siRNA assays, 48 hours after Lipofectamine 2000 transfection of siRNA, cells were transfected with either empty vector (pcDNA3), Bax vector

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

as controls and Ptc vector by Lipofectamine Plus (Invitrogen). For TUCAN and NALP1 siRNA assays, the cells were transfected at the same time with siRNA and plasmids using Lipofectamine 2000.

Yeast two-hybrid screen.

Matchmaker two-hybrid system III (Clontech) was used according to the manufacturer's instructions. As a bait, the pGBKT7 plasmid harboring the DNA binding domain GAL4 fused to Ptc 1165-1392 was used to transform AH109 strain. The yeasts were further transformed with plasmids containing the GAL4 transcriptional activation domain AD fused to a human fetal brain cDNA library (Clontech). Cells were grown in the absence of leucine, tryptophane, adenine and histidine and in the presence of 30 mM 3-amino-1,2,4-triazole and X-α-Gal. For direct two-hybrid, the matchmaker two-hybrid system III (Clontech) was used with pGBKT7-Ptc 1165-1392 and pACT2-DRAL. As a negative control, yeast cells were co-transformed with Ptc 1165-1392 and empty Gal4AD vector, or with DRAL and empty Gal4BD vector. Cells were allowed to grow in the absence of leucine, tryptophane, adenine, histidine and in the presence of 30 mM 3-amino-1,2,4-triazole and X-α-Gal.

Co-immunoprecipitation assays.

In cellulo co-immunoprecipitation were carried out on HEK293T or HEK293-EcRShh cells (for experiments requiring Shh) transfected with various tagged

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

constructs as described previously [8]. For experiment requiring Shh, cells were treated or not with Muristerone A when plated and at the time of transfection, and recombinant Shh was added at a final concentration of 300 ng/ml 24 hours before harvesting the cells. Then, HEK293T or HEK293-EcRShh cells were lysed in 50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1% NP-40 in the presence of protease inhibitor cocktail (Roche), and further incubated with anti-HA (Sigma, 2.4 μg/ml), anti-FlagM2 (Sigma, 2.4 μg/ml), anti-Myc antibody (Sigma, 2.4 μg/ml), anti-Ptc-1 (Santa Cruz Biotechnology, 0.8 μg/ml), anti-TUCAN (Abcam, 4 μg/ml) or anti-caspase-9 (Cell Signaling, 4 μg/ml) and protein-A (Sigma) or protein-G Sepharose (GE Healthcare). Washes were done in 50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (4 washes) plus one extra wash in 50 mM HEPES pH 7.6, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA. *In vivo* immunoprecipitation were performed in OF-1 mice cortex embryos. Two cortices from E16.5 embryos were dissected out, cut in small species and triturated. Shh-treated cortices were incubated 40 minutes at 37°C in conditioned supernatant of HEK293-EcRShh-induced cells in which recombinant Shh-N (R&D systems) was also added at 900 ng per cortex. Non-treated cortices were incubated in the same condition in supernatant of non-induced HEK293-EcRShh cells and without addition of recombinant Shh-N. Dissociated cortices were further incubated in lysate buffer (50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, inhibitor protease cocktail (Roche), 0.15% NP40) and subjected to potterisation. Immunoprecipitation was performed overnight at 4°C in lysis buffer 1% BSA

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

using 4 μg/ml of anti-Ptc-1 antibodies (Santa Cruz Biotechnology) or Normal goat IgG as control (R&D systems) and then purified with μMACS Protein G MicroBeads system (Miltenyi Biotec). Immunoprecipitates were immunoblotted using anti-DRAL polyclonal antibody (Abcam).

Co-localization studies.

HEK293T cells were plated on 24 well-plate round coverslips and transfected for 24 hours either with empty vector or with pRK5-Ptc plus pcDNA3-DRAL-FlagM2. A day after seeding, Daoy cells were incubated for 4 hours either with medium enriched in recombinant Shh (900ng/ml) or with supernatant of 5e1 hybridoma cells producing a Shh blocking antibody, supplemented with purified Shh blocking antibody (10 μg/ml). For CGNs, 24h after platting, cells were treated with 10 μM of Cytosin-β-D- arabinofuranoside (Sigma) and kept 4 days in culture. Cells were then incubated for 5 hours either with supernatant of Muristerone A-induced HEK293-EcRShh enriched with recombinant Shh (900ng/ml) or with supernatant of 5e1 hybridoma cells, supplemented with purified Shh blocking antibody (5 μg/ml). Both medium were supplemented with 25 mM KCl and 10 mM HEPES. After transfection or treatment, 293T, Daoy or CGNs cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes, washed and permeabilized with Triton 0.2 % in PBS 30 minutes. Permeabilized cells were washed 3 times in PBS and then saturated for 1 hour with 2 % BSA and 2 % Normal Donkey Serum in PBS. After a PBS wash, cells were incubated for 1 hour at room temperature simultaneously

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

with the combination of the appropriate first antibodies diluted in PBS. After rinsing the cells 3 times with PBS, the Ptc-1 antibody at 0.44 μg/ml diluted in PBS (Santa Cruz Biotechnology) and the DRAL antibody at 2.2 μg/ml diluted in PBS (Abcam) were detected respectively using Alexa Fluor 488 monoclonal Donkey anti-Goat antibody (Invitrogen) and Alexa Fluor 647 monoclonal Donkey anti-Rabbit (Invitrogen) in combination at 4.4 μg/ml each one during 1 hour at room temperature. After three washes in PBS, the coverslips were mounted in crystal/mount (Biomeda) and photographed with a Zeiss Axioplan2 LSM510 confocal microscope. Profiles were created using Axiovision 4.0V4.6.1.0 program.

Gel filtration.

For the condition with Shh treatment, HEK293-EcRShh cells were treated twice with Muristerone A (24 hours before transfection and at the time of transfection) and recombinant Shh (300 ng/ml) was added 1 hour before harvesting the cells. HEK293-EcRShh cells transfected by pcDNA3-DRAL-FlagM2, pcDNA3-TUCAN-Myc and pcDNA3-caspase-9-DN with or without pRK5-Ptc-HA or pRK5-Ptc$_{\Delta 7IC}$ were lysed in 50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 0.1% NP-40 in the presence of protease inhibitors and sonicated 2 times 2 seconds per condition. The supernatant lysates were fractionated by size-exclusion chromatography on High Prep ™ Sephacryl ™ S300 (HR 16/60) columns using an FPLC protein purification system (Biologic HR, Biorad). Proteins were separated

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

with the lysis buffer. Columns were calibrated with protein standards (29 kDa-2000 kDa) according to the manufacturer's instructions (Sigma). Aliquots of the fractions were analyzed on Criterion XT Precast gels (Bis-Tris 4-12%; Biorad) and Western blotting. Aliquots of the 20th first fractions were also pooled and used for co-immunoprecipitation experiments as described for *in cellulo* co-immunoprecipitation.

Cell death analysis and caspase assays.

Cell death was analyzed 24h after transfection using trypan blue staining procedures as described previously [1]. Cell death was also analyzed using Toxilight assay according to the manufacturer's instructions (Lonza). Briefly, HEK293T were seeded at 50 000 cells/well in 24-well plates. The following day, cells were transfected using Lipofectamine Plus (Invitrogen) with 1 μg total DNA per well (0.7 μg pRK5-Ptc1-HA plus 0.3 μg IKKβ; Total DNA was kept constant using empty pcDNA3-3xFlag plasmid). 24 hours after transfection, the release of adenylate kinase by cells was measured from the supernatant and normalized to total adenylate kinase from cell lysate by luminometer (Infinite-F500, Tecan). For caspase-9 activity fluorometric assay, HEK293-EcRShh cells were treated twice (when seeded and when transfected) with Muristerone A for the condition with Shh, and recombinant Shh-N was added (300 ng/ml) 1 hour before harvesting the cells. Caspase-9 activity was then measured by using the caspase-9 fluorometric assay kit (BioVision). This assay uses the LEHD-AFC substrate. The

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

activity was measured every 30 minutes during 2 hours according to the manufacturer's instructions. For each condition, caspase-9 activation was calculated with the following way: we first calculated the average of the slopes of the affine regression curves representing the number of fluorescent units in terms of minutes; we then made the ratio between the caspase activity of the sample and that measured in 293T cells transfected with empty vector. The background level of the fluorescence (with lysis buffer only) has been substracted for each condition. Samples were also incubated with caspase-9 inhibitor zLEHD-fmk (20 μM) in order to eliminate the non-apoptotic background of fluorescence. Caspase-3 activity was measured by using the caspase-3 fluorometric assay kit (BioVision) as described previously [1].

Chick *in ovo* experiments and TUNEL staining on chick embryos.

Cell death analysis in the developing chick neural tube was performed using fertilized chicken eggs obtained from a local farm and incubated at 38°C. Embryos were staged according to Hamburger and Hamilton (HH). Chick embryos were electroporated with Sigma purified plasmid DNA (4.5 μg/μl) with 50 ng/ml Fast Green. For floor plate electroporation, chick embryos of stage HH10-11 were injected with plasmid DNA into the lumen of the neural tube and electroporated with specifically designed electrodes. These electrodes allowed us to fit the anode under the embryo and to lay the cathode on the embryo with 3 mm spacing. We carried out electroporation with 4 pulses of 50 ms duration at 20

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

V. The embryos were collected 24 hours after electroporation. For classical lateral electroporation of one side of the neural tube, plasmid DNA was injected into the lumen of HH stage 11-13 neural tubes and electrodes (CUY 613P3 standard electrodes; NEPA Gene) were placed either side of the neural tube (with 4 mm spacing) and electroporation carried out using CUY21 electroporator (NEPA Gene) delivering three 50 ms square pulses of 18 V with interval of 500 ms. In each condition, Green Fluorescent Protein (GFP) was co-electroporated (pCAGGS-GFP; 0.5 μg/μl) to check the electroporation efficiency. In the control condition, GFP was electroporated with empty vector alone (pCAGGS, 4 μg/μl). In all other conditions, GFP was co-electroporated with HHIP1 (pCAGGS-HHIP1, 2.5 μg/μl) with either empty vector or Ptc dominant negative (pcDNA3-Ptc-7IC D1392N) or shDRAL (pSilencer1.0-U6shDRAL1) or scramble DRAL (pSilencer1.0-U6-scrambleDRAL) or caspase-9 dominant negative (pCAGGS-caspase-9 DN), each then at 1.5 μg/μl. Chick microsurgery was done as described in [9], except that the electroporation performed before microsurgery was done in only one side of the neural tube. Transfected embryos were allowed to develop for 24 hours, then dissected, fixed 12 hours at 4°C in 4% paraformaldehyde in PBS, rinsed, sunk in 30% sucrose in PBS solution, embedded in gelatine 7.5%/sucrose 10% and sectioned in a MICROM cryostat (HM560). Detection and quantification of apoptosis by TUNEL was performed using the *in situ* cell TUNEL detection kit from Roche, following manufacturer's instructions and as previously described [17]. For each embryo, TUNEL-positive

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

cells of electroporated and non-electroporated side of the neural tube were added for more than six sections with adequate GFP expression. The ratio between the number of TUNEL-positive cells from the electroporated side to the non-electroporated side was then calculated. For each condition, results of at least five embryos were used to calculate a mean of the ratio. A U test was done to evaluate if the difference between various conditions was significant. Fluorescent TUNEL was done as described in [18].

NF-*k*B luciferase reporter assays.

HEK293-EcRShh or HEK293T cells were seeded respectively at 600 000 cells/well and 120 000 cells/well in 12-well plates. The following day, cells were transfected using Lipofectamine Plus (Invitrogen) with 10 ng of *Renilla* luciferase expressing construct (pRL-Rluc, Promega), 250 ng of reporter pFLRG-*Firefly* luciferase [19] and various expression plasmids (1.2 μg pRK5-Ptc1 0.5 μg pcDNA3-IKKβ) per well. Total DNA was kept constant using empty pcDNA3-3xFlag plasmid. After 24 hours, cells were lysed and activity from *Firefly* and *Renilla* luciferases was measured using a Dual-Luciferase Reporter System (Promega) by a luminometer.

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

Methods Reference.

1. Thibert, C. *et al.* Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* **301**, 843-846 (2003).
2. Scholl, F.A., McLoughlin, P., Ehler, E., de Giovanni, C. & Schafer, B.W. DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis. *J Cell Biol* **151**, 495-506 (2000).
3. Paul, C. *et al.* The LIM-only protein FHL2 is a negative regulator of E4F1. *Oncogene* **25**, 5475-5484 (2006).
4. Pathan, N. *et al.* TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. *J Biol Chem* **276**, 32220-32229 (2001).
5. Chu, Z.L. *et al.* A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 9239-9245 (2001).
6. Stehlik, C. *et al.* The PAAD/PYRIN-only protein POP1/ASC2 is a modulator of ASC-mediated nuclear-factor-kappa B and pro-caspase-1 regulation. *Biochem J* **373**, 101-113 (2003).
7. Llambi, F. *et al.* The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *Embo J* **24**, 1192-1201 (2005).
8. Forcet, C. *et al.* The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3416-3421 (2001).
9. Furne, C. *et al.* The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4128-4133 (2006).
10. Faustin, B. *et al.* Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* **25**, 713-724 (2007).

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

11. Mahul-Mellier, A.L., Hemming, F.J., Blot, B., Fraboulet, S. & Sadoul, R. Alix, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death in vivo. *J Neurosci* **26**, 542-549 (2006).
12. Momose, T. *et al.* Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* **41**, 335-344 (1999).
13. Stamataki, D., Ulloa, F., Tsoni, S.V., Mynett, A. & Briscoe, J. A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev* **19**, 626-641 (2005).
14. Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E. & Beachy, P.A. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* **280**, 1603-1607 (1998).
15. Trioulier, Y. *et al.* Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *J Biol Chem* **279**, 2046-2052 (2004).
16. Mehlen, P. *et al.* The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395**, 801-804 (1998).
17. Charrier, J.B., Lapointe, F., Le Douarin, N.M. & Teillet, M.A. Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development* **128**, 4011-4020 (2001).
18. Furne, C., Rama, N., Corset, V., Chedotal, A. & Mehlen, P. Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14465-14470 (2008).
19. Bartholin, L., Guindon, S., Martel, S., Corbo, L. & Rimokh, R. Identification of NF-kappaB responsive elements in follistatin related gene (FLRG) promoter. *Gene* **393**, 153-162 (2007).

© 2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.**

Annexe N°5 : The dependence on Sonic Hedgehog for cell survival occurs through the inhibition of CDO pro-apoptotic activity

The dependence on Sonic Hedgehog for cell survival occurs through the inhibition of CDO pro-apoptotic activity

Céline Delloye-Bourgeois[1], Nicola Rama[1], Jean-Guy Delcros[1], Benjamin Gibert[1], Jean-Yves Scoazec[2], Robert Krauss[3], Agnes Bernet[1#], and Patrick Mehlen[1#$]

[1]Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée 'La Ligue', CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France; [2]INSERM, U865, Faculté Laennec, 69372 Lyon cedex 08, France. [3]Department of Developmental and Regenerative Biology, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA.

[$]Corresponding author: P. Mehlen; FAX (33) 4 78 78 28 87; e-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr

[#]Senior authors

Abstract

Cell-adhesion molecule-related/Downregulated by Oncogenes (CDO), a positive regulator of skeletal muscle development, was recently identified as a receptor for the classic morphogen Sonic Hedgehog (SHH). We show here that CDO behaves as a SHH dependence receptor: it actively triggers apoptosis in absence of SHH. The pro-apoptotic activity of unbound CDO requires a proteolytic cleavage in its intracellular domain allowing the recruitment and activation of caspase-9. We show that the pair SHH/dependence receptor CDO plays a crucial role in neural crest cell survival during the formation of the first branchial arch. We also show that CDO acts as a tumor suppressor by inducing apoptosis in settings of SHH limitation. Indeed, CDO expression is decreased in a large fraction of human cancers and is associated with good prognosis in aggressive neuroblastoma. Moreover, in a therapeutic perspective, we propose that the SHH up-regulation known to occur in various human cancers provides a selective tumor growth advantage by blocking CDO-induced apoptosis. Consistently, interference with SHH/CDO interaction triggers a CDO-dependent apoptosis *in vitro* and tumor regression *in vivo*. This latter observation qualifies CDO as a relevant target for alternative targeted anti-cancer therapy in SHH high tumors.

Introduction

Sonic Hedgehog (SHH) is a key diffusible cue with multiple known functions during both embryonic development and through adulthood. SHH is a classic morphogen known to regulate many developmental processes including ventrodorsal patterning of the neural tube, establishment of limb polarity and development of the foregut and axio-cranial skeleton (*1, 2*). However, SHH is not only implicated in the promotion of differentiation but was also more recently described as a survival factor. Indeed, inhibition of SHH in the developing neural tube induces massive neuroepithelial cell death (*3, 4*). Similarly, SHH produced by the ventral foregut endoderm promotes survival of facial neural crest cells (NCCs) that colonize the first branchial arch (BA1), induces the patterning of BA1 (*5*) and is therefore an early signal for jaw development during facial skeleton formation.

In adults, SHH signaling is mainly quiescent, being physiologically reactivated only during specific processes such as tissue maintenance and repair. However, SHH signaling appears to be crucial during tumor progression (*6-9*). Abnormal induction of SHH signaling through different means -e.g., downregulation or mutation of SHH receptor(s) or effectors, autocrine or paracrine expression of SHH-, has been associated with many different types of human cancers (*10-13*). As a consequence, SHH and its downstream signaling effectors are considered as exciting targets for anti-cancer strategies (*14, 15*).

SHH signaling in the target cells was shown to be mediated mainly via its interaction with the twelve-transmembrane receptor Patched 1 (Ptc). Binding of SHH to Ptc relieves its suppressive effect on Smoothened (Smo), an orphan seven-transmembrane receptor that initiates a signaling pathway leading to the activation of the glioma-associated (Gli) family of transcription factors. However, a direct interaction has been described between SHH and other single-transmembrane proteins such as Cell-adhesion molecule-related/Downregulated by Oncogenes (CDO) and Brother of CDO (BOC), two homologous members of the Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM) family.

While CDO and BOC were first demonstrated to positively regulate skeletal muscle development (*16, 17*), they were recently described as hypothetical co-receptors of Ptc that positively regulate SHH signaling pathway in cooperation with other SHH-binding proteins such as Gas1 (*18-20*). CDO extracellular domain was then shown to directly bind SHH in a calcium-dependent and heparin-independent manner in mammals. This interaction enhances SHH-Ptc-Smo signaling in specific subregions of SHH expression (*21*). Distinct structural domains of CDO are involved in myogenesis and in SHH signaling pathway, thus suggesting multiple and independent functions of the receptor (*19*).

Composed of five Ig-like and three FnIII-like domains in the extracellular part followed by a single transmembrane domain and an intracellular domain with no clear homology with other known proteins, CDO resembles in many aspects to DCC (Deleted in Colorectal Cancer), the prototypical netrin-1 dependence receptor. Dependence receptors share the property of creating cellular state of dependence upon their ligand by inducing apoptosis when unbound by their ligand (*22*). Such a dependence effect has been hypothesized to be crucial to dictate adequate territories of neural cells migration or localization in the developing nervous system and to eliminate tumor cells that would develop in settings of ligand unavailability (*23*). These dependence receptors now include more than fifteen different transmembrane receptors and Ptc was recently described as a dependence receptor able to trigger apoptosis via the recruitment of a caspase-activating complex called dependosome (*4, 24*). We investigated here whether CDO, may, similarly to Ptc, behave as a SHH dependence receptor and as such display a role in regulating cell survival during embryonic development and tumor progression.

CDO induces apoptosis in the absence of SHH.

To determine whether CDO and/or BOC (see graphic representation in Fig. 1A and Fig. S1A) are dependence receptors, HEK293T cells were transiently forced to express both receptors. Expression of CDO and BOC could be detected at the plasma membrane (Fig. 1B and not shown). While, as observed for Ptc, CDO expression was associated with increased cell death as measured by trypan blue exclusion assay (Fig. 1C), no significant effect was observed upon BOC expression (Fig. S1B). CDO-induced cell death was, at least in part, apoptotic since it was associated with a specific increase in caspase-3 activity (Fig. 1D) and DNA-fragmentation as measured by TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated deoxyUridine triphosphate Nick End Labeling) staining (Fig. 1E). Moreover, such a pro-apoptotic effect was caspase-dependent since the addition of the general caspase inhibitor z-VAD-fmk inhibited CDO-induced cell death (Fig. 1CD).

We thus investigated whether, as expected for a dependence receptor, addition of the ligand could prevent CDO-induced cell death. As shown in Fig. 1CD, cell death associated with CDO expression was inhibited in a dose-dependent manner by addition of exogenous recombinant SHH. Treatment with recombinant netrin-1, the ligand of the dependence receptor DCC, had no significant incidence on CDO associated-cell death (Fig. 1C) while the addition of SHH had no effect on DCC-induced apoptosis (Fig. S1C). Along the same line, deletion of the third fibronectin domain of CDO, known to mediate its interaction with SHH, turned CDO to a constitutive pro-apoptotic moiety even when SHH was added (Fig. S1D). Altogether, these data demonstrate that CDO behaves as a SHH dependence receptor *in vitro*.

To first assay whether CDO triggers apoptosis *in vivo*, we took advantage of the chick developing neural tube model. In the developing neural tube, SHH is produced by the notochord (NT) and the floor plate (FP), which induces a ventrodorsal gradient of SHH and promotes the differentiation of ventral neurons (*25*). However, Le Douarin and colleagues elegantly demonstrated that SHH acts in

the developing neural tube not only as a morphogen but also as a survival factor for neuroepithelial cells (*3, 4*). We first forced the expression of CDO in one side of the neural tube of E1.5 chick embryos *in ovo* via electroporation (See schematic representation in Fig. 1F). As shown in Fig. 1G and Fig. S1E, the expression of CDO, detected by immunofluorescence in the electroporated side of the chick neural tube, was associated with an increase in the number of TUNEL-stained cells as compared to the non-electroporated side, but also as compared to neural tubes electroporated with a mock construct. In agreement with the SHH distribution along the neural tube, apoptosis was rather detected in the third dorsal part of the neural tube (see quantification in Fig.1G). Thus forced expression of CDO in the neuroepithelium is associated with apoptosis induction.

CDO triggers apoptosis via a caspase-9 dependent mechanism.

One common feature of most dependence receptors known so far is the cleavage of their intracellular part by caspases, a preliminary step required for their pro-apoptotic activity. We thus investigated whether CDO shares this property *in vitro*. As shown in Fig. 2AB, CDO intracellular domain (CDO-IC, amino acids 985 to 1250) was cleaved *in vitro* when incubated with purified active caspase-3, suggesting the existence of at least one cleavage site in CDO-IC. To determine the putative caspase cleavage site, aspartic acid residues in CDO intracellular domain were successively mutated. While the Asp^{1178} to Asn mutation (CDO-IC D1178N) had no effect on CDO-IC cleavage, mutation of Asp^{1153} to Asn (CDO-IC D1153N) strongly inhibited cleavage by caspase (Fig. 2A, left panel). However, the Asp^{1153} to Asn mutation revealed the presence of a secondary caspase cleavage site in CDO-IC as incubation of CDO-IC-D1153N with active caspase-3 was associated with the presence of another faint but detectable cleavage fragment. We thus mutated different Asp residues in CDO-IC-D1153N and assessed cleavage by caspase-3. As shown in Fig. 2A (right panel), Asp^{1153}/Asp^{1164} to Asn double mutation almost completely suppressed caspase-3 cleavage indicating that CDO was cleaved *in vitro*

by caspase at Asp^{1153} and Asp^{1164}, Asp^{1153} being the main cleavage site (Fig. 2B). We thus investigated whether endogenous CDO was cleaved *in vivo*. Full-length CDO and its putative cleavage fragment were detected in extracts from spinal cords from E12.5 mouse embryos. Incubation of the spinal cords with z-VAD-fmk inhibited the presence of the cleavage fragment, hence confirming the caspase cleavage of CDO *in vivo* (Fig. S2A).

To evaluate the functional relevance of CDO-IC cleavage, the full length CDO D1153N and CDO D1178N (non-caspase cleavage site mutation used as a control) mutants were transiently expressed in HEK293T cells and cell death was assessed by measuring caspase-3 activity and DNA fragmentation (TUNEL staining). Whereas wild-type CDO and CDO D1178N both triggered apoptotic cell death, CDO D1153N mutant (Fig. 2CD), and CDO D1153N/D1164N double mutant (data not shown) failed to induce any increase in caspase-3 activity or DNA fragmentation. Thus, the cleavage of CDO intracellular domain at Asp^{1153} is a prerequisite for its pro-apoptotic activity.

In an attempt to identify the region of CDO implicated in cell death induction - i.e., defined as the Addiction Dependence Domain for dependence receptors-, the pro-apoptotic activity of the CDO fragment potentially released by the caspase cleavage (CDO1154-1250) or the remaining membrane-bound CDO truncated at Asp^{1153} (CDO1-1153) was assessed. As shown in Fig. 2E, the expression of CDO1-1153 fragment triggered an increase in caspase-3 activation similar to that of full-length CDO, whereas the CDO1154-1250 fragment had no effect. Moreover, while SHH addition in the medium suppressed CDO-induced apoptosis, it had no effect on CDO1-1153-induced apoptosis (Fig. S2B). Together these results support the view that CDO addiction dependence domain lies upstream of its caspase cleavage site and that in the absence of SHH, CDO is cleaved by caspase at Asp^{1153}, leading to the exposure of a pro-apoptotic domain located in the N-terminal intracellular region (residues 985 to 1153).

Recent data support the view that once cleaved by a first line of active caspase, at least some dependence receptors recruit a caspase-activating complex named dependosome which includes the apical caspase-9 (*24, 26*). We thus investigated whether CDO could recruit and activate caspase-9. As shown in Fig. 2F, in the absence of SHH, CDO nicely pulled down caspase-9 when co-expressed in HEK293T cells. CDO-induced apoptosis is dependent on caspase-9 but not on caspase-8 since a caspase-9 dominant negative mutant efficiently blocked CDO-induced apoptosis while a caspase-8 dominant negative mutant did not (Fig. S2C). Moreover, we show that CDO triggered caspase-9 activation which was blocked by SHH treatment or if CDO was mutated at its caspase cleavage site (Fig. 2G). Thus together, these data support a model in which in the absence of SHH, CDO is initially cleaved by a first set of active caspases (or other proteases), leading the exposure of a pro-apoptotic domain recruiting and activating caspase-9 probably through a caspase-activating platform which remains to be determined.

Because CDO was shown to participate in the Ptc-Smo-Gli canonical pathway when engaged by SHH (*18*) and because Ptc was shown to trigger apoptosis through caspase-9 in the absence of SHH (*24*), we investigated possible crosstalks between CDO-induced apoptosis and Ptc-mediated signalings. We first analyzed whether forced expression of CDO alters the gene transcription response triggered by the Smo-Gli pathway. CDO expression or the expression of various CDO mutants generated above did not trigger transactivation of a Gli-1 reporter gene, nor affected the Gli-1 reporter gene activation mediated by Gli-1 activation (induced through Gli-1 transfection itself or through treatment with the Smo agonist SAG) (Fig. 2H). Conversely, CDO-induced apoptosis was affected neither by activation of the Smo-Gli-1 pathway (induced through Gli-1 transfection or through treatment with SAG, Fig. S2D) nor by inhibition of this pathway through treatment with the Smo antagonist cyclopamine (not shown). We next investigated whether Ptc pro-apoptotic activity is implicated in CDO-mediated apoptosis. As also observed for other dependence receptors -i.e., DCC, UNC5H, or TrkC- the intracellular domain of Ptc mutated at its

caspase cleavage site (Ptc-7IC-D1392N here called Ptc-DN) specifically behaves as a dominant negative for the pro-apoptotic activity of endogenous Ptc (*4, 27, 28*). Ptc-DN, while efficiently blocking Ptc-induced apoptosis (Fig. S3BCD), did not affect CDO-induced apoptosis both in HEK293T cells (Fig. 3A) or in electroporated chick neural tube (Fig. S3CD). Thus, the death signal induced by unbound CDO is independent of Ptc and is not related with or does not impact on the canonical Ptc-Smo-Gli pathway but is rather dependent on caspase-9 recruitment and activation.

The pair SHH/dependence receptor CDO controls the death of neural crest cells during the first branchial arch development.

We thus searched for the functional relevance of CDO pro-apoptotic activity *in vivo*. To do so, we first looked for a tool that would specifically inhibit CDO pro-apoptotic activity. As described above, the intracellular domain of most dependence receptor mutated at its caspase cleavage site(s) specifically behaves as a dominant negative for the pro-apoptotic activity of the respective endogenous dependence receptor (*4, 27, 28*). We thus analyzed whether the intracellular domain of CDO mutated at the caspase cleavage site(s) antagonized CDO-induced apoptosis. As shown in Fig. 3A, CDO-IC-D1153N markedly inhibited full-length CDO-induced HEK293T cell death, as measured by caspase-3 activity and by TUNEL staining (Fig. S3A). Furthermore, the CDO intracellular domain mutated on both caspase cleavage sites Asp^{1153} and Asp^{1164} (CDO-IC-D1153/1164N) completely inhibited full-length CDO-induced apoptotic cell death (Fig. 3A and Fig. S3A) while it had no effect on DCC or Ptc-induced apoptosis (Fig. S3B). It does not alters the gene transcription response triggered by the Smo-Gli pathway (Fig.2H). Thus, CDO-IC-D1153/1164N, named hereafter CDO-DN, acts as a specific dominant negative mutant for CDO full-length pro-apoptotic activity *in vitro*. Along this line, CDO failed to recruit caspase-9 when CDO-DN was co-expressed while Ptc-DN had no effect on CDO/caspase-9 interaction (Fig. 3B). We then assessed whether CDO-DN acts as a dominant negative *in vivo*. To do so, CDO-DN alone or in combination with full-length CDO was

overexpressed in E1.5 chick neural tube via unilateral electroporation. As shown in Fig. S3CD, while CDO overexpression induced an increased number of apoptotic cells specifically in the electroporated side of the chick neural tube as measured by TUNEL staining, this effect was completely prevented in presence of CDO-DN. CDO-DN was however unable to inhibit the death induced upon Ptc electroporation (Fig. S3CD). Thus, CDO-DN specifically represses full-length CDO pro-apoptotic activity and so acts as a dominant negative *in vivo.*

SHH has recently been implicated in the facial skeleton development and more precisely it was shown that SHH produced by the foregut endoderm is crucial for the survival of facial neural crest cells (NCCs) that colonize the first branchial arch (BA1) (*5, 29*). In chick embryos, the experimental excision of the entire forehead before HH-7/8 stage (seven somites) is associated with massive NCCs death in the first branchial arch, an effect blocked by addition of recombinant SHH. To assay whether CDO, which is known to be expressed in the BA1 during the early development (*30*), is implicated in the observed NCCs death in the BA1, we electroporated chick embryos with CDO-DN or mock constructs while interfering with SHH by injecting SHH-blocking antibody-secreting hybridoma cells (5E1) in the lateral mesenchyme before HH-7/8 stage (*31*) (experimental setting in Fig. 3C). The blocking antibody secreted by hybridoma cells was detected 24 hours after injection in the lateral mesenchyme (Fig. S4A). As shown in Fig. 3D and Fig. S4B, the SHH-blocking antibody, but not the non-related isotypic immunoglobulin (IgG1), induced a wave of cell death in the BA1 of control-electroporated embryos. In this setting, CDO-DN electroporation fully blocked cell death in the developing BA1 (Fig. 3D). Of interest, when a similar experiment was performed using Ptc-DN instead of CDO-DN, cell death was not inhibited (Fig. S4B), thus suggesting that in this model, SHH acts as a survival factor by specifically blocking CDO-mediated apoptosis.

CDO acts as a tumor suppressor.

It has been suggested that the pro-apoptotic activity of unbound dependence

receptors is a mechanism for eliminating tumor cells that would proliferate in an environment with constant and limited ligand availability or migrate toward tissues devoid of ligand during metastatic dissemination (*23, 32*). As such, dependence receptors behave as tumor suppressors. In agreement with this view, dependence receptors expression is usually decreased or lost in various cancers (*33, 34*). To assess whether CDO expression is affected in human cancers, we first analyzed CDO expression in a panel of 209 human tumors and their corresponding normal tissues using a dot blot array or Q-RT-PCR. As shown in Fig. 4A, CDO expression was decreased in a large fraction of ovary, uterus, thyroid, colon and lung cancers as compared to their normal corresponding tissues, even though at this stage we cannot conclude whether this decrease accounts for a decrease in CDO expression in tumor cells or for a change in the stromal environment. A marked decrease of CDO expression in epithelial tumor cells as compared to adjacent normal tissues was yet detected by immunohistochemistry in a fraction of human colon adenocarcinoma (Fig. S5).

We more specifically focused on neuroblastoma (NB), the most frequent extracranial solid tumor of early childhood, which is diagnosed according to 5 stages –i.e., 1,2,3,4 and 4S-. CDO expression was analyzed by Q-RT-PCR in a panel of 119 NB. While CDO was detected at a relatively high level in stages 1 or 2 that gather localized NB with low aggressiveness, CDO expression decreased with aggressiveness (Fig. 4B). Stage 4 NB that are highly aggressive and metastatic tumors displayed the lowest level of CDO. Of interest, the stage 4S NB which specifically affects neonates and encompasses highly metastatic tumors that yet often spontaneously regress displayed a level of CDO similar to that observed in stage 1-2 (Fig. 4B). Similar expression pattern was seen at the protein level as shown in Fig. 4C. This is of particular interest as *CDO* gene resides at human chromosome 11q24.2, a region very often included in the 11q23-24 deletion detected at high frequency in NB (*35, 36*). Moreover, high CDO expression appeared as a good prognostic marker. The overall survival at 10 years in all NB tested was 68% for

high CDO tumors and only 28% for low CDO tumors (p=0.002) (Fig.4D). When considering only metastatic NB (stage 4 and stage 4S), the overall survival at 10 years was 43% for high CDO tumors and 15% for low CDO tumors (p=0.0077) (Fig. 4D). Similarly, analysis of CDO protein level in a panel of 45 colorectal adenocarcinoma, revealed that CDO expression is inversely correlated with tumor grade according to the TNM classification (Fig. S5, χ^2 test: $p=4.3^{E-5}$). Thus, high CDO expression in human tumors appears as a constraint for tumor progression and aggressiveness.

We thus looked for cellular models to study the implication of CDO in tumorigenesis. We screened a panel of human cancer cell lines for expression of CDO and its ligand SHH (Table S1). One would expect that, in agreement with the expression of CDO in human tumors, some tumor cells lines have acquired a loss of CDO expression as a survival selective advantage. The neuroblastoma cell lines SHSY-5Y and SHEP, and the lung cancer cell lines H358 and H322 did show weak or no expression of CDO. The forced CDO expression in these four cell lines was associated with a significant increase in caspase-3 activity (Fig. 4E and not shown) and a loss of anchorage-independent growth in soft agar (Fig. 4F, left panels). In agreement with the dependence receptor model, both effects were prevented by addition of recombinant SHH (Fig. 4EF and not shown). In agreement with the dependence receptor model, while SHH presence was sufficient to block the CDO-mediated anchorage-independent growth inhibition, the Smo agonist SAG while stimulating *per se* anchorage-independent growth did not interfere with CDO inhibitory activity (Fig.4F right panels). Together these data support the view that CDO downregulation observed in a large fraction of cancers allows tumor cell survival in settings of limited SHH availability.

Targeting SHH inhibits tumor growth via CDO-induced apoptosis.

The therapeutic relevance of CDO as a tumor suppressor is obviously minimal in the fraction of cancers with downregulation of CDO. However, it is expected that

rather than a loss of CDO expression, some tumors may have selected up-regulation of SHH, which according to the mode of action of dependence receptors, should also be associated with a loss of dependence on SHH availability. In agreement with this hypothesis, autocrine or paracrine expression of SHH has been extensively described in different human cancers (*13, 14*). The general view is that this autocrine or paracrine SHH expression is a selective mechanism that constitutively activates Ptc-Smo signaling (*13, 14*). We thus investigated whether in SHH-expressing tumors, interference with SHH would trigger CDO-mediated tumor cell death.

The A549 and H522 cell lines were selected for their significant expression of CDO mRNA (Table S1) and protein (Fig. 5A). These cell lines both expressed a secreted form of SHH that could be quantified by ELISA (respectively, 10.0 ± 2.4 pg and 4.0 ± 1.6 pg per mL of culture medium) thus arguing for an autocrine expression of SHH (Fig. 5B). To investigate the role of this SHH autocrine production in regulating CDO-induced apoptosis, SHH expression was reduced by a RNA interference-based strategy. Transfection of both A549 and H522 cell lines with SHH and/or CDO respective siRNAs was associated with a specific and significant decrease of each targeted mRNA (Fig. 5C) and protein (Fig. S6AB). As shown in Fig. 5D, SHH siRNA transfection induced an increase in apoptosis monitored by an increase in caspase-3 activity (Fig. 5D, left panel) and in the number of TUNEL-labeled cells (Fig. 5D, right panel). Of key interest, co-transfection of a CDO siRNA abrogated SHH siRNA-induced cell death in both cell lines. Similar results were observed by co-transfecting a dominant negative mutant of CDO (Fig. S6C). In this setting, a dominant negative mutant of Ptc displayed no effect on caspase-3 activity associated with SHH siRNA (Fig. S6C). Moreover, in A549 cells, SHH siRNA transfection was associated with caspase-9 activation, which was inhibited when CDO siRNA was co-transfected (Fig. 5E). Thus together these data support the view that in SHH/CDO expressing tumor cells, SHH constitutively inhibits CDO-induced apoptosis.

To assess whether this CDO-mediated cell death upon SHH interference

observed *in vitro* could be translated *in vivo* in a therapeutic perspective, the A549 cell line was engrafted in *nude* mice. Animals with palpable tumors were treated twice a week by i.p. injection of either scramble siRNA or SHH siRNA alone or in combination with CDO siRNA during 28 days. Such siRNA i.p. injection allowed the detection of the siRNA within the tumor (Fig. S6D) and was shown to affect the target gene (*37-39*)(*40, 41*). As shown in Fig. 5FGH, SHH siRNA was associated with tumor growth inhibition as compared to scramble siRNA-treated mice. Of key interest, injection of CDO siRNA impaired the SHH siRNA anti-tumor effect, hence demonstrating that, in this model, the anti-tumor effect associated with SHH inhibition required CDO. As shown in Fig. 5I, caspase-3 activity was significantly increased in tumors from SHH siRNA-treated mice, as compared to tumors from scramble siRNA-treated mice, while such effect was not observed in tumors from CDO/SHH siRNAs-treated mice. Moreover, histological analysis of tumors at the end of the treatment revealed a large central area devoid of proliferating tumor cells specifically in SHH siRNA-treated mice but not in SHH/CDO siRNAs-treated animal (Fig. 5J). Taken together these data support the view that SHH expression in SHH-high cancer cells is a survival selective advantage that prevents CDO-induced apoptosis.

The prevalent hedgehog related therapeutic strategy assessed so far is the inhibition of the Smo/Gli-1 canonical pathway which is believed to be activated in many cancers either because of Ptc/Smo mutation(s) or because of a high SHH level. Smo antagonists such as cyclopamine have shown interesting tumor cell death effect *in vitro* and tumor growth inhibition activity in animal models (*14, 15*). Of interest CDO expression was shown to be down-regulated by the Smo/Gli-1 canonical pathway (*18*). We thus investigated whether tumor cell death observed upon Smo antagonists may be related to CDO pro-apoptotic activity. In agreement with Tenzen and collaborators' work, while A549 cells treated with cyclopamine showed increased level of CDO, SAG treatment was associated with a decrease in CDO level (Fig. 6A). In this setting, cyclopamine treatment was associated with A549 cell death. However this death effect was fully blocked when cells were transfected with CDO siRNA (Fig.

6B). Similar results were observed in H522 cells (not shown). Thus, tumor cell death induced by cyclopamine is, at least in part, due to the up-regulation of CDO. We then assessed whether the tumor growth inhibition effect of cyclopamine could be explained by an increase in CDO-induced apoptosis *in vivo*. A549 cells were engrafted in nude mice and animals with palpable tumors were treated by intra-tumoral injection of cyclopamine (or HBC vehicule) together with scramble siRNA or CDO siRNA for 2 weeks. As shown in Fig. 6C, while cyclopamine showed a potent tumor growth inhibition effect, this anti-tumor effect was in large part inhibited when CDO expression was silenced. Together, these data suggest that the Smo antagonist cyclopamine displays anti-tumor efficacy in part because it enhances CDO expression level and consequently CDO-induced apoptosis.

Early pre-clinical development of an inhibitor of SHH/CDO interaction.

The *in vitro* and *in vivo* data presented above strongly moot that interfering with SHH/CDO interaction may be an efficient anti-cancer strategy in SHH high tumors. We thus developed a drug candidate able to inhibit CDO/SHH interaction. To do so, the third fibronectin domain of CDO known to interact with CDO (*21*) was fused to a human IgG1 Fc fragment to create a stabilized recombinant protein (see schematic representation in Fig. 6D) with adequate pharmacokinetic properties (terminal half-life in mice blood 38 hours, not shown). This Fc-$CDO_{3FbnIII}$ recombinant protein titrates out SHH and prevents SHH from interacting with CDO (not shown). Of interest, Fc-$CDO_{3FbnIII}$ efficiently triggered apoptosis of A549 and H522 cells, a process blocked when an excess of recombinant SHH was added (Fig.6E and not shown). The in vivo activity of Fc-$CDO_{3FbnIII}$ was then assessed against A549 cells engrafted in *nude* mice. As shown in Fig. 6F, twice a week injection of Fc-$CDO_{3FbnIII}$ (10mg/kg) was associated with a potent tumor growth inhibition.

Discussion.

The data presented here suggest that CDO displays all the traits to belong to the functional family of the dependence receptors: CDO triggers apoptosis in the absence of its ligand SHH, CDO is cleaved at aspartic acid residue(s) by caspase-like protease(s) and CDO triggers caspase-9 dependent apoptosis through a domain exposed after this proteolytic cleavage. These *in vitro* features have been shown to be common to the vast majority of dependence receptors (*22*). In addition, we have shown here that these traits confer to the pair SHH/CDO a key regulatory role both during embryonic development –e.g. shown here by the role of SHH in blocking CDO pro-apoptotic activity in the first branchial arch- and cancer progression. An intriguing consequence of this work is the fact that among the known SHH receptors - i.e., Ptc, Hip1, Gas-1, BOC and CDO- at least two of them, Ptc and CDO, behave as dependence receptors. Thus, SHH mediates cell survival by blocking both CDO and Ptc dependence receptors pro-apoptotic activity, two receptors that are often expressed in the same cells and have been shown to work together to mediate the classic SHH/Gli signaling (*18, 19*). Why a cell would need more than one SHH receptor to undergo apoptosis upon SHH unavailability? This could suggest either redundancy in a common mechanism of cell death induction upon limitation in SHH availability to ensure apoptosis of an unwanted/inadequately located cell or conversely a double-check mechanism that secures only the death of unwanted cells.

If the mechanism by which CDO, together with or independently of Ptc, triggers apoptosis remains to be further analyzed, this observation may have clear consequences in term of alternative therapeutic anti-cancer strategy. SHH signaling is indeed of major focus for drug development as SHH and its signaling have extensively been shown to be deregulated in cancer. We show here that SHH expression in cancers may be a survival selective advantage to escape SHH dependence. Previous reports have shown that a large fraction of tumors from various cancer types show up-regulation of SHH (*6, 8, 9, 42*). Even though this observation has been mostly investigated under the classic view of the hyperactivation of SHH-Ptc-Smo-Gli signaling (*14*) or more recently under the

challenging view of a paracrine role of SHH on stromal cells (*13*), considering our results here, it is tempting to revisit this expression of SHH as a mechanism to block CDO-induced apoptosis.

The *in vitro* tumor cell death effect and the *in vivo* anti-tumor effect of SHH interference on SHH-expressing tumor cells support the view that the SHH/CDO interaction is a possible target for drug development. We propose here that a drug interfering with the interaction between SHH and its dependence receptor CDO, such as the presented Fc-$CDO_{3FbnIII}$, could potentially benefit to the large fraction of patients suffering from cancers with high SHH levels. Even though further preclinical and clinical testings remains to be performed, the proposed strategy is fundamentally different from the undergoing strategies that aim at antagonizing Smo-mediated signaling.

Materials and Methods

Cell lines, transfection procedures, reagents:

Human embryonic kidney HEK293T and lung cancer A549 cell lines were cultured in DMEM medium (Gibco®, Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum. Human H358, H322 and H522 lung cancer cell lines were cultured in RPMI 1640 Glutamax medium (Gibco®, Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) containing 10% fetal bovine serum. Cell lines were transfected using lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) for small interfering RNA (siRNA) or lipofectamine Plus reagent (Invitrogen) for plasmids. Recombinant human SHH was purchased from R&D system (Minneapolis, MN). 5E1 hybridoma cells producing a SHH-blocking antibody (Developmental Studies Hybridoma Bank) and IgG1 hybridoma cells producing an isotypic unrelated mouse antibody were maintained in Hybri-Care medium (ATCC).

Human tumors samples and biological annotations:

Following patients' consents, surgical human tumors material was immediately frozen. Human colorectal cancer samples and matched normal tissues (n=99) were provided by the tumor bank at the Hospices civils de Lyon, fresh tumor tissue being obtained during colorectal surgery prior to any systemic therapy. Human ovary cancer samples and normal tissues (n=15) were obtained from the Biological Resource Center of Centre Léon Bérard, Lyon, France. Human NSCLC samples (selected on the basis of at least 70 % tumor cells in frozen samples) and paired normal tissues were retrieved from the tumor bank of the Pathology Department of the Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France. Neuroblastoma material (n=119) and annotations were obtained from the Biological Resource Centers of Centre Léon Bérard, Lyon, France and Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. The use of all patient tissue specimens was carried out according to French laws and regulations.

Plasmid constructs and siRNA:

Mouse CDO fragments were PCR amplified using pBABE-mCDO-Myc (*16*) as a template and cloned in pcDNA3.1 vector using pcDNA™3.1 Directional TOPO® Expression Kit strategy (Invitrogen). A Flag tag was added to each construct. Mouse CDO IC fragments encompass sequences coding for CDO residues Leu^{984} to Thr^{1250}. Point mutations Asp (GAT or GAC) to Asn (AAT or AAC) were created using the QuickChange site directed mutagenesis strategy (Stratagene) using CDO full-length (for cell death assays) or CDO IC (for i*n vitro* caspase cleavage assay) constructs as templates. The dominant negative mutant for CDO (CDO-DN) thus corresponds to CDO IC fragment with Asp^{1154} to Asn and Asp^{1163} to Asn point mutations. Patched1 construct and dominant negative mutant for Patched1 (pcDNA3.1-PTC1-DN-HA) have been previously described (*4*). Dominant negative caspase encoding plasmids (pcDNA3.1-DNcasp8 and pcDNA3.1-DNcasp9) have been previously described(*26*). For *in ovo* chick electroporation, most constructs were based on pMiW vector which was also used as empty vector. Mouse full-length CDO was cut from pcDNA3.1-mCDO-Flag and cloned between HindIII and BglII sites of pMIW. Mouse CDO fragments cut from pcDNA3.1-CDO-DN-Flag and pcDNA3.1-PTC1-DN-HA were cloned between HindIII and NotI sites of pMIW. List of all primers used is available upon request.

For cell culture use and *in vivo* experiments, human CDO and SHH siRNAs were designed by Santa Cruz (CA) as a pool of 3 to 5 target-specific 20-25nt siRNAs. For detection of siRNA within the xenografts *in vivo*, biotinylated SHH or scramble siRNA were purchased from Sigma.

***In vitro* translation and caspase-3 cleavage assay:**

Plasmids pcDNA3.1-CDO-IC with different point mutations were transcribed using T7 polymerase and then translated using the TNT system (Promega) in the presence of 50 μCi [^{35}S]methionine (Perkin Elmer) for 3 h at 30 8C. Translation products were incubated for 2 h in 20mM PIPES pH 7.2, 100mM NaCl, 1% Chaps, 10% sucrose,

10mM dithiothreitol and 0.1mM EDTA, at 37 °C in the presence of purified active caspase-3 kindly provided by G. Salvezen. Samples were loaded on a 14% Tris-Glycine acrylamide gel (Invitrogen).

For the detection of endogenous CDO caspase cleavage fragment, four E12.5 mouse embryonic spinal cords (SC) were dissected and incubated at 37°C in Hanks' balanced salt solution (HBSS, Invitrogen) for 6 hours with the general caspase inhibitor z-VAD-fmk or DMSO as a control. SCs were then lysed in the presence of the general caspase inhibitor z-VAD-fmk or DMSO and immunoblot was performed on these lysates using a CDO C-terminal domain specific antibody (Santa Cruz).

Cell death assays:

1.8 x 10^5 cells were grown in serum-poor medium and transfected with plasmids using Lipofectamine Plus Reagent (invitrogen) or with siRNAs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cell death was analyzed using trypan blue staining procedures as previously described (*43*), 24 hours after transfection. The extent of cell death is presented as the percentage of trypan blue-positive cells in the different cell populations. Apoptosis was monitored by measuring caspase-3 activity as described previously (*43*) using Caspase 3/CPP32 Fluorimetric Assay Kit (Gentaur Biovision, Brussel, Belgium) 24 hours after transfection. For detection of DNA fragmentation, treated cells were cytospun 48 hours after transfection and Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL) was performed with 300U/mL TUNEL enzyme (300U/mL) and 6 μM biotinylated dUTP (Roche Diagnostics, Meylan, France), as previously described (*44*).

Soft agar assay for colony formation:

For bottom agar, 2 ml of 1.4% agarose were diluted with 2 ml of 2x DMEM (2x DMEM, 20% fetal bovine serum, 0.2% gentamycin, 500 μg/ml fungizone). A 4-ml volume of bottom agar was plated in a 60-mm tissue culture dish and allowed to harden. Cells were trypsinized and resuspended at 1.10^6 cells/ml in DMEM medium.

The top agar cell suspensions were composed of 100 μl of cell suspension, 1 ml of 2x DMEM, and 1 ml of 0.7% agarose and were overlaid on dishes containing bottom agar. The final plating concentration was 10^5 cells per dish. Treatment with recombinant SHH, DMSO or Smoothened Agonist (SAG, 200nM) were added in the culture medium and replaced every two days. 14 days later, clones were fixed with 4% paraformaldehyde for 5 minutes, stained with 1 ml of 0.005% Crystal Violet for 30 minutes and washed with distilled water.

Quantitative RT-PCR:

To assay SHH and CDO expression in human tumor and healthy tissues and in human cell lines, total RNA was extracted using the Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) and 1 μg was reverse-transcribed using the iScript cDNA Synthesis kit (BioRad). Real-time quantitative RT-PCR was performed on a LightCycler 2.0 apparatus (Roche) using either the Light Cycler FastStart DNA Master SYBERGreen I kit (Roche) for CDO and LightCycler® TaqMan® Master kit (Roche) for SHH. Reaction conditions for all optimal amplifications, as well as primers selection were determined as already described. The ubiquitously expressed human *HPRT* gene was used as an internal control. The sequences of the primers are available upon request.

Dot Blot analysis of CDO expression in human tissues:

CDO gene expression in human tumor and normal paired tissues was monitored by using the Cancer Profiling Array (CLONTECH) following the manufacturer's suggested procedure. CDO probe was prepared by using Amersham Megaprime DNA Labeling System (GE Healthcare) with human full-length CDO cDNA as template. The following primers were used: 5'-GCATCTCGTCCTTATCAAGTGG-3' and 5'-TATGGTATTCTGCTGGCGATTC-3'. The dot blot was quantified by using

Quantity one 4.6.1 software (Biorad). CDO loss of expression was defined by a fold change (normal versus tumor) of greater than 2.

Immunohistochemistry, co-immunoprecipitation and immunoblotting analysis:

For immunohistochemistry on cells, $6.5*10^4$ cells were grown on coverslips. For immunohistochemistry on chick embryos and tumors, samples previously fixed in 4% paraformaldehyde were embedded in 7.5% gelatin – 0.12M sucrose and 20 μm sections were performed. Slides were then incubated at room temperature for two hours with a primary antibody recognizing the human CDO (1:200, R&D systems, Minneapolis, MN), the FlagM2 tag (1/400, Sigma), Ptc (1/200, Santa Cruz) or the HA tag (1/500, Sigma). After rinsing in phosphate buffer saline, the slides were incubated with an Alexa-488-Donkey or Cy3-Donkey anti-Goat antibody (Molecular Probes), or Cy5-Donkey anti-Mouse/anti-rabbit/anti-goat antibodies (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) (Molecular Probes) respectively. Nuclei were visualized with Hoechst staining. Fluorescence imaging was performed with AxioVision Release 4.6 software. Co-immunprecipitations and immunoblots were performed as already described using anti-CDO (1/2000, R&D Systems), anti-FlagM2 (1/5000, Sigma), anti-HA (1:7500, Sigma) or anti-β-actin (1:1000, Chemicon) primary antibodies.

SHH ELISA assay:

For SHH determination in cell culture supernatants, white 96-well plate (CORNING) were coated with a monoclonal anti-mouse SHH N-term peptide antibody (MAB4641 - R&D systems), blocked with bovine serum albumin, incubated with the samples, followed by detection of SHH using a biotinylated anti-mouse SHH antibody (BAM4641 – R&D systems), a streptavidin-peroxidase polymer (S2438 – Sigma) and a chemiluminescent substrate (Pierce ECL Western Blotting Substrate). The luminescence was read on a Tecan Infinite F-500 luminometer.

Chick *in ovo* experiments and TUNEL staining on chick embryos:

Cell-death analysis in the developing chick neural tube was performed using fertilized chicken eggs obtained from a local farm and incubated at 38°C. Embryos were staged according to Hamburger and Hamilton (HH). Chick embryos were electroporated with purified plasmid DNA (4.5 µg/µl) allowing expression in chicken (constructs based on pMIW vector).

For neural tube electroporation, chick embryos of stage HH10-11 were injected with plasmid DNA into the lumen of the neural tube and electroporated with specifically designed electrodes, only in one side of the neural tube. In each condition, GFP was co-electroporated to check the electroporation efficiency. Twenty-four hours after electroporation, live embryos were harvested, fixed overnight in 4% PFA, embedded in 7.5% gelatin – 0.12M sucrose and 20 μm sections were performed. Detection and quantification of apoptosis by TUNEL was performed using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche). For each embryo, TUNEL positive cells of the electroporated and non-electroporated sides of the neural tube were counted in more than ten sections. The ratio of the number of TUNEL-positive cells from the electroporated side to that of the non-electroporated side was then calculated. For each condition, results from at least six embryos were used to determine a mean ratio.

For *in ovo* experiments on NCCs migrating to BA1, chick embryos were bilaterally electroporated at 3ss- to 5-ss with pMIW empty vector, pMIW-CDO-DN-Flag or pMIW-PTC1-DN-HA. When embryos reached 5-ss to 7-ss stage, a glass needle was placed at the midbrain–hindbrain level, and 5E1 or IgG1 secreting hybridoma cells were pressure injected into the lateral head mesenchyme, as previously described (*31*). Thirty six hours later, live embryos were harvested, fixed overnight in 4% PFA and subjected to whole mount immunofluorescent staining to detect antibodies secreted by injected hybridoma cells or TUNEL staining to detect apoptotic cells in the BA1.

SHH inhibition in A549-engrafted *nude* mice:

Seven-week-old (20-22 g body weight) female athymic nu/nu mice were obtained from Charles River animal facility. The mice were housed in sterilized filter-topped cages and maintained in a pathogen-free animal facility. A549 cells were implanted by s.c. injection of 10^7 cells in 200μL of PBS into the right flank of the mice. Once tumors were established (V≈100 mm^3), mice were treated with scramble siRNA, SHH siRNA and/or CDO siRNA by i.p. injection of 6 μg total siRNA during 4 weeks, twice a week or with 10 mg/kg Fc-$CDO_{3FbnIII}$ (using PBS-glycerol as a control) during three weeks twice a week. Tumor sizes were measured with a caliper. The tumor volume was calculated with the formula v = 0.5*(length*$width^2$). At the end of the treatment, tumors were harvested, weighted and were embedded in 7.5% gelatin – 0.12M sucrose and sectioned into 20 μm slices. Tumors histology was studied after Hematoxylin-PhloxinB-Safran staining of tumor slides. To measure apoptotic cell death, some tumors were harvested after one week of treatment, immediately frozen and then mechanically lysed in caspase-3 activity lysis buffer. Then, caspase-3 activity was quantified using Caspase 3/CPP32 Fluorimetric Assay Kit (Gentaur Biovision).

For the cyclopamine/siRNA co-treatment experiment, cyclopamine was prepared as a complex with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HBC, Sigma) (1 mg cyclopamine per milliliter of 45% HBC in sterile PBS stirred for 60 minutes at 65°C (*45*)). Once tumors reached approximately 40 mm^3, 3 μg of scramble or CDO siRNA were than added to 100 μL of cyclopamine-HBC or HBC alone and the mix was injected intra/peri-tumorally daily during 12 days.

Acknowledgments:

We wish to thank Olivier Meurette for critical reading of the manuscript. This work was supported by institutional grants from CNRS (PM), University of Lyon (PM), Centre Léon Bérard (PM) and from the Ligue Contre le Cancer (PM), INCA (PM), ANR (PM), STREP Hermione (PM), IP ApoSys (PM), NIH (RK) and The march of Dimes (RK).

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.M. (e-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr).

References

1. T. M. Jessell, *Nat Rev Genet* **1**, 20 (Oct, 2000).
2. P. W. Ingham, A. P. McMahon, *Genes Dev* **15**, 3059 (Dec 1, 2001).
3. J. B. Charrier, F. Lapointe, N. M. Le Douarin, M. A. Teillet, *Development* **128**, 4011 (Oct, 2001).
4. C. Thibert *et al.*, *Science* **301**, 843 (Aug 8, 2003).
5. J. M. Brito, M. A. Teillet, N. M. Le Douarin, *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11607 (Aug 1, 2006).
6. N. Dahmane, J. Lee, P. Robins, P. Heller, A. Ruiz i Altaba, *Nature* **389**, 876 (Oct 23, 1997).
7. D. N. Watkins *et al.*, *Nature* **422**, 313 (Mar 20, 2003).
8. D. M. Berman *et al.*, *Nature* **425**, 846 (Oct 23, 2003).
9. S. P. Thayer *et al.*, *Nature* **425**, 851 (Oct 23, 2003).
10. J. Xie *et al.*, *Nature* **391**, 90 (Jan 1, 1998).
11. C. Raffel *et al.*, *Cancer Res* **57**, 842 (Mar 1, 1997).
12. M. D. Taylor *et al.*, *Nat Genet* **31**, 306 (Jul, 2002).
13. R. L. Yauch *et al.*, *Nature* **455**, 406 (Sep 18, 2008).
14. S. J. Scales, F. J. de Sauvage, *Trends Pharmacol Sci* **30**, 303 (Jun, 2009).
15. M. R. Tremblay, M. Nesler, R. Weatherhead, A. C. Castro, *Expert Opin Ther Pat* **19**, 1039 (Aug, 2009).
16. J. S. Kang, P. J. Mulieri, C. Miller, D. A. Sassoon, R. S. Krauss, *J Cell Biol* **143**, 403 (Oct 19, 1998).
17. J. S. Kang, P. J. Mulieri, Y. Hu, L. Taliana, R. S. Krauss, *EMBO J* **21**, 114 (Jan 15, 2002).
18. T. Tenzen *et al.*, *Dev Cell* **10**, 647 (May, 2006).
19. W. Zhang, J. S. Kang, F. Cole, M. J. Yi, R. S. Krauss, *Dev Cell* **10**, 657 (May, 2006).
20. D. C. Martinelli, C. M. Fan, *Genes Dev* **21**, 1231 (May 15, 2007).
21. J. S. McLellan *et al.*, *Nature* **455**, 979 (Oct 16, 2008).
22. D. Goldschneider, P. Mehlen, *Oncogene* **29**, 1865 (Apr 1, 2010).
23. P. Mehlen, A. Puisieux, *Nat Rev Cancer* **6**, 449 (Jun, 2006).

24. F. Mille *et al.*, *Nat Cell Biol* **11**, 739 (Jun, 2009).
25. N. M. Le Douarin, M. E. Halpern, *Curr Opin Neurobiol* **10**, 23 (Feb, 2000).
26. C. Forcet *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3416 (Mar 13, 2001).
27. S. Tauszig-Delamasure *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13361 (Aug 14, 2007).
28. C. Furne, N. Rama, V. Corset, A. Chedotal, P. Mehlen, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14465 (Sep 23, 2008).
29. J. M. Brito, M. A. Teillet, N. M. Le Douarin, *Development* **135**, 2311 (Jul, 2008).
30. P. J. Mulieri, A. Okada, D. A. Sassoon, S. K. McConnell, R. S. Krauss, *Dev Dyn* **219**, 40 (Sep, 2000).
31. S. C. Ahlgren, M. Bronner-Fraser, *Curr Biol* **9**, 1304 (Nov 18, 1999).
32. M. Castets *et al.*, *Dev Cell* **16**, 614 (Apr, 2009).
33. A. Bernet *et al.*, *Gastroenterology* **133**, 1840 (Dec, 2007).
34. W. M. Grady, *Gastroenterology* **133**, 2045 (Dec, 2007).
35. Q. Wang *et al.*, *Cancer Res* **66**, 6050 (Jun 15, 2006).
36. C. Guo *et al.*, *Oncogene* **18**, 4948 (Sep 2, 1999).
37. D. Compagno *et al.*, *PLoS ONE* **2**, e1006 (2007).
38. A. Morin, C. Gallou-Kabani, J. R. Mathieu, F. Cabon, *Curr Top Med Chem* **9**, 1117 (2009).
39. C. Delloye-Bourgeois *et al.*, *J Natl Cancer Inst* **101**, 237 (Feb 18, 2009).
40. C. Delloye-Bourgeois *et al.*, *J Exp Med* **206**, 833 (Apr 13, 2009).
41. J. Bouzas-Rodriguez *et al.*, *J Clin Invest* **120**, 850 (Mar 1).
42. Z. Yuan *et al.*, *Oncogene* **26**, 1046 (Feb 15, 2007).
43. P. Mehlen *et al.*, *Nature* **395**, 801 (Oct 22, 1998).
44. A. M. Ghoumari, R. Wehrle, O. Bernard, C. Sotelo, I. Dusart, *Eur J Neurosci* **12**, 2935 (Aug, 2000).
45. G. R. van den Brink *et al.*, *Gastroenterology* **121**, 317 (Aug, 2001).

Figure Legends

Figure 1: CDO induces apoptosis *in vitro* and *in vivo*, depending on SHH availability.

A. Schematic representation of CDO protein structural domains. **B.** CDO immunofluorescence staining of HEK293T transfected with a full-length mouse CDO expression plasmid. CDO (green) and nuclei (Hoechst in blue) staining are shown. **C-E.** Cell death induction in HEK293T cells was quantified by trypan blue exclusion assay (**C**), caspase-3 activity assay (**D**) or TUNEL staining (**E**) after transfection with mock, CDO or Ptc expression vectors. Increasing amounts of recombinant SHH added in the cell culture medium are displayed above the graphs. Recombinant netrin-1 (NTN1) was added in the culture medium as a negative control. The general caspase inhibitor z-VAD-fmk was used as a control to block apoptotic cell death. In **D**, lower panel shows detection of CDO and Ptc proteins by Western Blot. In **E**, TUNEL stained cells (orange) and nuclei (Hoechst staining in blue) are shown. Data are means of at least three independent assays. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to mock-transfected condition (* $P < 0.05$). **F.** Schematic representation of the *in ovo* electroporation method of HH-10 chick embryos. Electrodes are represented by + and – schemes. **G.** Left panel: Quantification of the number of TUNEL positive cells in the electroporated side versus the non-electroporated side for each condition shown in right panels. Quantification was performed separately in the dorsal third and in the ventral two-thirds of the neural tube. The number of embryos used for each condition is indicated above the graph. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to mock-transfected condition (* $P < 0.05$). Right panels: Representative images of CDO immunofluorescence staining (in red) and TUNEL staining (in green) of chick embryos neural tubes electroporated with mock or CDO encoding plasmids are shown.

Figure 2: CDO triggers apoptosis through CDO proteolytic cleavage and recruitment and activation of caspase-9.

A. *In vitro*-translated CDO intracellular domains (CDO-IC) wild type (wt) or mutated on one (left panel) or two (right panel) aspartic acid residues were incubated in the absence or in the presence of recombinant purified active caspase-3. Autoradiographs show the cleavage by caspase-3 of CDO-IC wt, whereas CDO-IC-D1153N was weakly cleaved and CDO-IC-D1153N-D1164N was almost completely resistant to cleavage. **B.** Schematic representation of CDO intracellular domain and its different mutant constructs. CDO-IC main (D1153) and secondary (D1164) caspase cleavage sites are displayed. **C-D.** Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity (**C**) and TUNEL staining (**D**) was quantified in HEK293T cells transfected with wild type (CDO) full-length or mutated full-length CDO expression plasmids. In **C**, upper panel shows the western blot analysis of wt and mutant CDO proteins. In **D**, TUNEL positive cells (orange) and nuclei (Hoechst in blue) are shown. **E**. Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity was quantified in HEK293T cells transfected with constructs encoding full-length CDO or the CDO hypothetical fragments resulting from its cleavage by caspase at D1153 (CDO1-1153 and CDO 1154-1250). Data are means of at least three independent assays. Error bars indicate s.e.m.. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to mock-transfected condition (* $P < 0.05$; ** $P<0.01$). **F.** HEK293T cells were transfected with constructs encoding CDO and/or caspase-9 and cell lysates were subjected to immunoprecipitation with a CDO specific antibody. CDO and caspase-9 proteins were detected by western blot in immunoprecipitated and input fractions. **G.** Caspase-9 activity was quantified in HEK293T cells transfected with wild type (CDO) full-length or mutated full-length CDO (D1153N) expression plasmids. **H.** Gli1 transcriptional activity was measured in NIH3T3 cells transfected with a Gli1-responsive element cloned upstream the firefly luciferase reporter gene. Cells were

co-transfected with constructs encoding Gli1 and/or different CDO fragments, and/or treated with 50nM Smoothened Agonist (SAG). Firefly luciferase activity was indexed on renilla luciferase activity used as an internal transfection control. For G and H, data are means of at least three independent assays. Error bars indicate s.e.m.. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to mock-transfected condition (* $P < 0.05$).

Figure 3: The pair SHH/dependence receptor CDO controls neural crest cells death during first Branchial Arch development.

A. Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity was quantified in HEK293T cells transfected with full-length CDO alone or together with CDO-IC domain mutated on one (CDO-IC-D1153N) or two (CDO-IC-D1153/64N) caspase cleavage site(s), or Ptc dominant negative (Ptc-DN). Upper panel shows detection of CDO (α-CDO), CDO-IC mutants (α-Flag) and Ptc-DN (α-HA) proteins by immunoblot. CDO-IC-D1153/64N, named hereafter CDO-DN, behaves as a dominant negative for CDO pro-apoptotic activity. Data are means of at least three independent assays. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to mock-transfected condition (** $P < 0.01$). **B.** HEK293T cells were transfected with constructs encoding CDO, CDO-DN, Ptc-DN and/or caspase-9 and cell lysates were subjected to immunoprecipitation with a CDO specific antibody. Each protein was then detected by western blot in immunoprecipitated and input fractions. **C.** Upper panel: Schematic representation of the *in ovo* electroporation method of HH-7/8 chick embryos, followed by injection of antibody-secreting hybridoma cells in the lateral mesenchyme. Lower panel: Representative image of a chick embryo electroporated with a GFP-construct (in green), injected with control antibody-secreting hybridoma cells and then subjected to TUNEL staining (in orange). The dotted area highlights the zone observed at higher magnification in D. **D.** *In toto* TUNEL staining performed on chick embryos 36 hours after electroporation of mock or CDO-DN encoding constructs and injection of SHH-

blocking antibody (5E1) secreting hybridoma cells. Electroporation efficiency is controlled with GFP green fluorescence. TUNEL staining is shown in orange. Arrows point at the first branchial arch in formation. The number of embryos analyzed is indicated on each illustrated condition.

Figure 4: CDO expression is decreased in human cancers.

A. Quantification of CDO expression by Q-RT-PCR and/or by dot blot array in a panel of 209 human tumors and paired normal tissues. For each type of tissue, the percentage of tumors showing loss of CDO expression as compared to paired normal tissue is indicated. Loss of CDO expression is considered when a more than 2-fold decrease of expression is observed. **B.** Quantification of CDO expression by Q-RT-PCR in a panel of 119 human stages 1-2, 3, 4 and 4S neuroblastoma. The number of cases for each stage is indicated below the graph. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Student t-test. **C.** Representative CDO immunostainings on stage 2, stage 4 and stage 4S tumors. Inset: control without primary antibody is presented. **D.** CDO high expression is a marker of good prognosis in NB. Ten-year overall survival in a panel of 108 patients (left panel, every NB stages) or 86 patients (right panel, aggressive metastatic NB) diagnosed with NB showing either CDO low (in grey) or CDO high (in black) level was analyzed. Statistical treatment of the data: Kaplan-Meier method, p value is indicated. **E.** Apoptotic cell death was quantified by caspase-3 assay in SHSY-5Y and SHEP cell lines transfected with CDO encoding construct. SHH availability in the culture medium was modulated by addition of recombinant SHH (+SHH). **F.** Soft agar assay for colony formation was performed on HEK293T cells 14 days after transfection with CDO encoding construct alone or after addition of recombinant SHH, Smoothened Agonist (SAG) or DMSO (SAG's diluent). The mean number of clones per dish and per condition is presented in the right panel. For E and F data are means of at least three independent assays. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared

to mock-transfected condition (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Figure 5: Inhibition of SHH triggers tumor growth arrest and regression via CDO-induced apoptosis.

A. CDO immunofluorescence staining of A549 and H522 cells using anti-CDO antibody to reveal CDO endogenous expression. Inset: immunostaining without primary antibody is presented as a control. **B.** Quantification of endogenous secreted SHH by ELISA assay in A549, H522 and H460 cells culture medium. **C.** Quantification of SHH and CDO expression by Q-RT-PCR was performed to check the efficiency and specificity of SHH and CDO siRNAs 24 hours after transfection of A549 cell line. **D.** Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity (upper panel) and TUNEL staining (lower panel) was quantified in A549 and H522 cells transfected with SHH siRNA alone or together with CDO siRNA. **E**. Caspase-9 activity was measured in A549 cells 18 hours after transfection with SHH siRNA alone or together with CDO siRNA. For **C-E**, data are means of a minimum of three independent assays. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to scramble siRNA-transfected condition (* $P < 0.05$). **F.** Nude mice were engrafted with A549 cells by subcutaneous injection of 10 millions cells. When the mean tumor volume reached approximately 100 mm^3, animals were treated twice a week by i.p. injection of scramble or SHH siRNA alone or in combination with CDO siRNA during 4 weeks. Mean tumor volume and number of animals for each group are indicated. **G**. Representative images of scr siRNA, SHH siRNA or SHH siRNA + CDO siRNAs-treated tumors on day 35. **H.** Mean tumor mass of scr siRNA, SHH siRNA or SHH siRNA + CDO siRNAs-treated tumors on day 46, at the end of treatment. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to scramble siRNA-treated condition (* $P < 0.05$). **I.** Apoptosis quantification by caspase-3 activity assay on xenografted tumor lysates analyzed after 1 week of treatment with siRNAs. Error bars indicate s.e.m. **J.**

Xenografts histology was analyzed by Hematoxylin-PhloxinB-Safran (HPS) staining on tumors harvested at the end of the treatment. Note that SHH siRNA-treated xenografts are characterized by a vast central area devoid of tumor cells. Scale bar: 1mm

Figure 6: Interference with SHH/CDO interaction as a promising therapeutic strategy.

A. Quantification of CDO mRNA was performed after treatment of A549 cells either with 1μM or 5μM cyclopamine (cyclo.) or with 50nM or 200nM Smoothened Agonist (SAG). **B**. Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity was quantified in A549 cells treated with cyclopamine (cyc.) and transfected either with scramble (siScr.) or with CDO siRNA. A549 cells were also treated with SAG and transfected either with siScr. or with SHH siRNA. Data are means of a minimum of three independent assays. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to scramble siRNA-transfected condition (* $P < 0.05$). **C**. Nude mice were engrafted with A549 cells by subcutaneous injection of 10 millions cells. When the mean tumor volume reached approximately 40 mm^3, animals were treated daily by intra-tumoral injection of cyclopamine and either scramble or CDO siRNA alone during 13 days. Mean tumor volume and number of animals for each group are indicated. **D**. Schematic representation of the Fc-$CDO_{3FbnIII}$ recombinant protein comprising the CDO juxtamembrane fibronectin domain associated with a human IgG1 Fc fragment. **E**. Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity was quantified in A549 cells treated with 2μg/mL Fc-$CDO_{3FbnIII}$ alone or together with an excess recombinant SHH added in the culture medium. Data are means of a minimum of three independent assays. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to control condition (* $P < 0.05$). **F.** Nude mice were engrafted with A549 cells by subcutaneous injection of 10 millions cells. When the mean tumor volume reached approximately 100 mm^3,

animals were treated twice a week by i.p. injection of 10mg/kg Fc-$CDO_{3FbnIII}$ during two weeks. Mean tumor volume and number of animals for each group are indicated.

Supplementary Figure 1: CDO, but not BOC, induces apoptosis *in vitro* depending on SHH binding.

A. Schematic representation of BOC protein structural domains. **B.** Cell death induction in HEK293T cells was quantified by trypan blue exclusion assay after transfection with mock or BOC expressing constructs and treatment with recombinant SHH added in the cell culture medium. **C**. Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity was quantified in HEK293T cells transfected with full-length DCC alone or with recombinant SHH (rSHH) added in excess in the culture medium. Upper panel shows detection DCC-HA protein by immunoblot using anti-HA antibody. **D.** Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity was quantified in HEK293T cells transfected either with full-length rat CDO or with rat CDO deleted from its SHH-binding site (CDOΔFbn3) alone or with recombinant SHH (rSHH) added in excess in the culture medium. For B, C and D, data are means of a minimum of three independent assays. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to control condition (* $P < 0.05$). **E.** CDO immunofluorescence staining of chick embryos neural tubes electroporated with mock or CDO encoding plasmids. CDO immunodetection is shown in orange. Electroporation efficiency is controlled with GFP green fluorescence. Hoechst staining is in blue.

Supplementary Figure 2: CDO intracellular cleavage is inhibited by the presence of SHH.

A. Detection of endogenous full length CDO and CDO fragment released by its intracellular cleavage by Western Blot in E12.5 mouse embryonic spinal cords (SC) lysates in the presence of the general caspase inhibitor z-VAD-fmk or DMSO as a

control, using a CDO C-terminal domain specific antibody. **B**. Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity was quantified in HEK293T cells transfected with constructs encoding CDO or CDO hypothetical fragment resulting from its cleavage by caspase at D1153 (CDO 1-1153) and treated or not with 900 ng/mL recombinant SHH added in the culture medium. **C**. Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity was quantified in HEK293T cells transfected with a construct encoding CDO together with Caspase-9 dominant negative (DN-C9) or Caspase-8 dominant negative (DN-C8) constructs. Upper panel shows detection of CDO (α-CDO), DN-C9 (α-Flag) and DN-C8 (α-HA) by immunoblot. **D**. Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity was quantified in HEK293T cells transfected with a construct encoding CDO alone or together with Gli1, or after treatment with 200 nM SAG. For B-D, data are means of a minimum of three independent assays. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to control condition (* $P < 0.05$).

Supplementary Figure 3: CDO-DN specifically blocks CDO-induced cell death *in vitro* and *in vivo.*

A. Apoptotic cell death induction as measured by TUNEL staining was quantified in HEK293T cells transfected with full-length CDO alone or together with CDO-IC domain mutated on two caspase cleavage sites (CDO-IC-D1153/64N). TUNEL positive cells (in orange) and nuclei (Hoechst in blue) are shown on representative images for each condition (left panels). **B**. Apoptotic cell death induction as measured by caspase-3 activity was quantified in HEK293T cells transfected with Ptc or DCC alone or together with CDO-DN or Ptc-DN constructs. Upper panel shows detection of Ptc, DCC and Ptc-DN (α-HA), and CDO-DN (α-Flag). For A and B, error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to mock-transfected condition (* $P < 0.05$). **C.** Immunofluorescence (upper panels) and TUNEL staining (median panels) on chick

embryos neural tubes electroporated with mock, CDO or Ptc alone or together with CDO-DN or Ptc-DN encoding plasmids. Immunodetection of full length CDO (anti-CDO antibody), CDO-IC domain (detection of both CDO and CDO-DN with anti-Flag antibody), Ptc (anti-Ptc antibody) and Ptc-DN (anti-HA antibody) is shown in red. TUNEL staining is in green. TUNEL and immunofluorescence staining are shown as merge in lower panels. The number of embryos used for each condition is indicated above the panels. **D.** Quantification of the number of TUNEL positive cells in the electroporated side versus the non-electroporated side for each condition presented in C. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to mock-transfected condition (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$).

Supplementary Figure 4: CDO dependence receptor controls neural crest cells death during first Branchial Arch development.

A. Immunodetection of hybridoma cells injected in the lateral mesenchyme of chick embryos 24 hours after injection. The secretion of mouse immunoglobulins by 5E1- or IgG1-secreting hybridoma cells was evidenced with a cy3-anti-mouse antibody (white arrowhead). **B.** *In toto* TUNEL staining performed on chick embryos 36 hours after electroporation of mock or Ptc-DN encoding constructs and injection of control (IgG1) or SHH-blocking antibody (5E1) secreting hybridoma cells. TUNEL staining is shown in orange. Electroporation efficiency is controlled with GFP green fluorescence. Arrows point at the first branchial arch in formation. The number of embryos analyzed is indicated on each illustrated condition.

Supplementary Figure 5: Loss of CDO protein is correlated with colorectal adenocarcinoma aggressiveness.

A. Table recapitulating CDO protein level (quantified by immunohistochemistry) in 9 isolated (Tis), 16 Stage 1/2 (T1/2) and 20 Stage 3/4 (T3/4) human colorectal adenocarcinomas according to the TNM classification. The number of cases showing

either a higher, an equal, a lower or no CDO expression in the tumor as compared to the normal tissue is indicated. **B.** Representative CDO immunohistochemistry on a human colon adenocarcinoma. N: Normal tissue; T: Tumor tissue. Note that CDO is clearly detected in the normal tissue (arrows) whereas the tumor tissue is only weakly, if not, stained.

Supplementary Figure 6:

A. Quantification of endogenous secreted SHH by ELISA assay in the culture medium of A549 cells transfected with scramble or SHH siRNA. **B**. CDO immunofluorescence staining of A549 cells transfected with scramble or CDO siRNA using a CDO specific antibody (in green). Nuclei were stained with Hoechst. **C**. Apoptotic cell death was quantified by caspase-3 assay in A549 cells transfected with SHH siRNA alone or together with CDO-DN or Ptc-DN constructs. For C, data are means of a minimum of three independent assays. Error bars indicate s.e.m. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Mann-Whitney test compared to control transfected condition (* $P < 0.05$). **D.** A biotinylated SHH siRNA (siSHH-[btn]) was injected i.p. in *nude* mice bearing A549 xenografts. Thirty minutes after injection, tumors were harvested and siSHH-[btn] was detected within the tumor with Cy3-Streptavidine (in orange). Nuclei were stained with Hoechst (in blue). PBS intra-peritoneal injection was used as a control.

Supplementary Table 1:

Quantification of CDO and SHH expression by Q-RT-PCR in 21 NSCLC, 23 neuroblastoma, 10 colorectal cancer, 4 ovarian cancer and 1 pancreatic cancer cell lines.

Figure 1

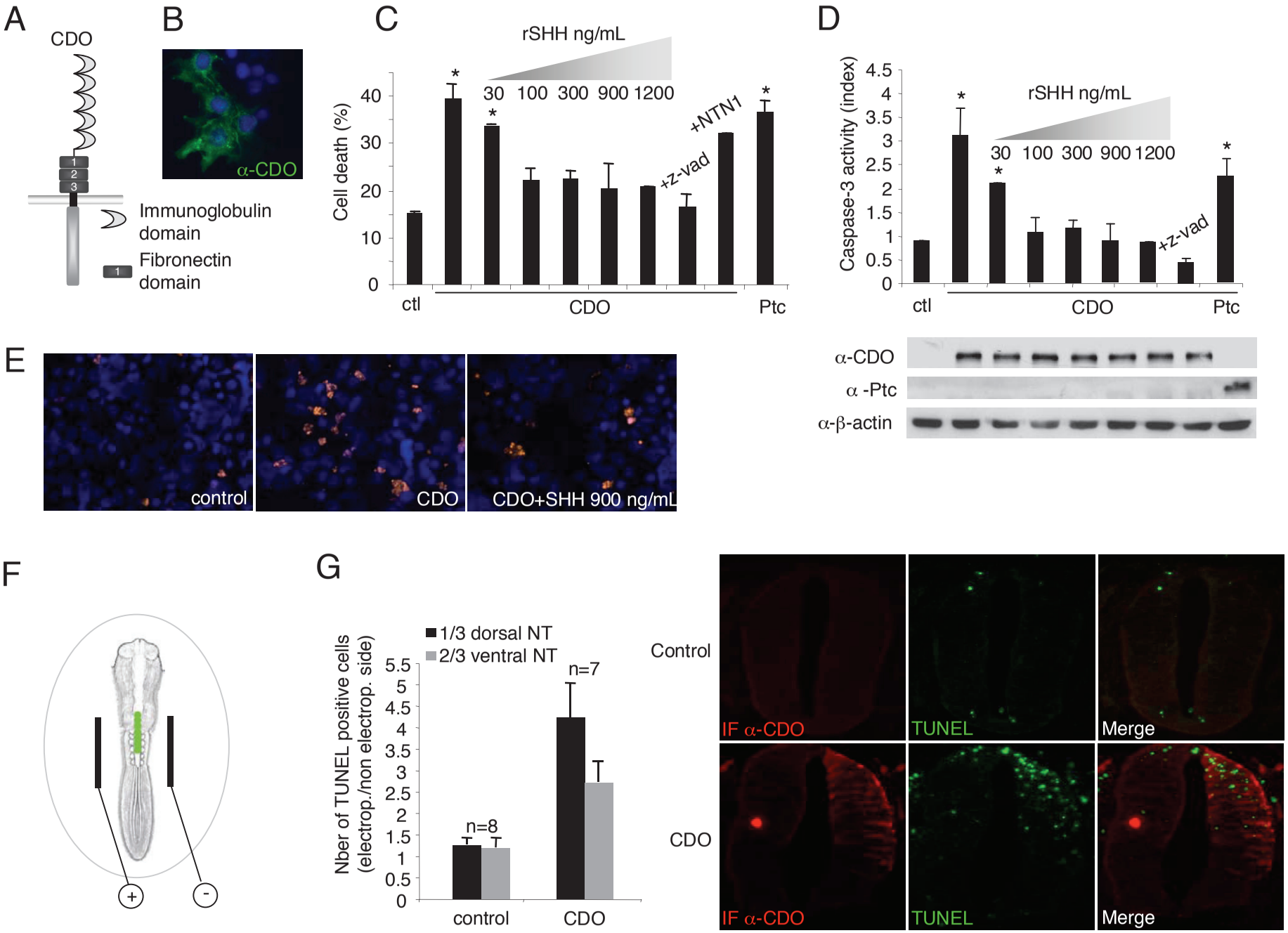

A
CDO
1
2
3
Immunoglobulin domain
Fibronectin domain
1
B
α-CDO
C
rSHH ng/mL
30 100 300 900 1200
+NTN1
+z-vad
Cell death (%)
0
10
20
30
40
ctl
CDO
Ptc
D
rSHH ng/mL
30 100 300 900 1200
+z-vad
Caspase-3 activity (index)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
ctl
CDO
Ptc
α-CDO
α -Ptc
α-β-actin
E
control
CDO
CDO+SHH 900 ng/mL
F
+
-
G
1/3 dorsal NT
2/3 ventral NT
Nber of TUNEL positive cells (electrop./non electrop. side)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
5.5
n=8
n=7
control
CDO
Control
CDO
IF α-CDO
TUNEL
Merge
IF α-CDO
TUNEL
Merge

Figure 2

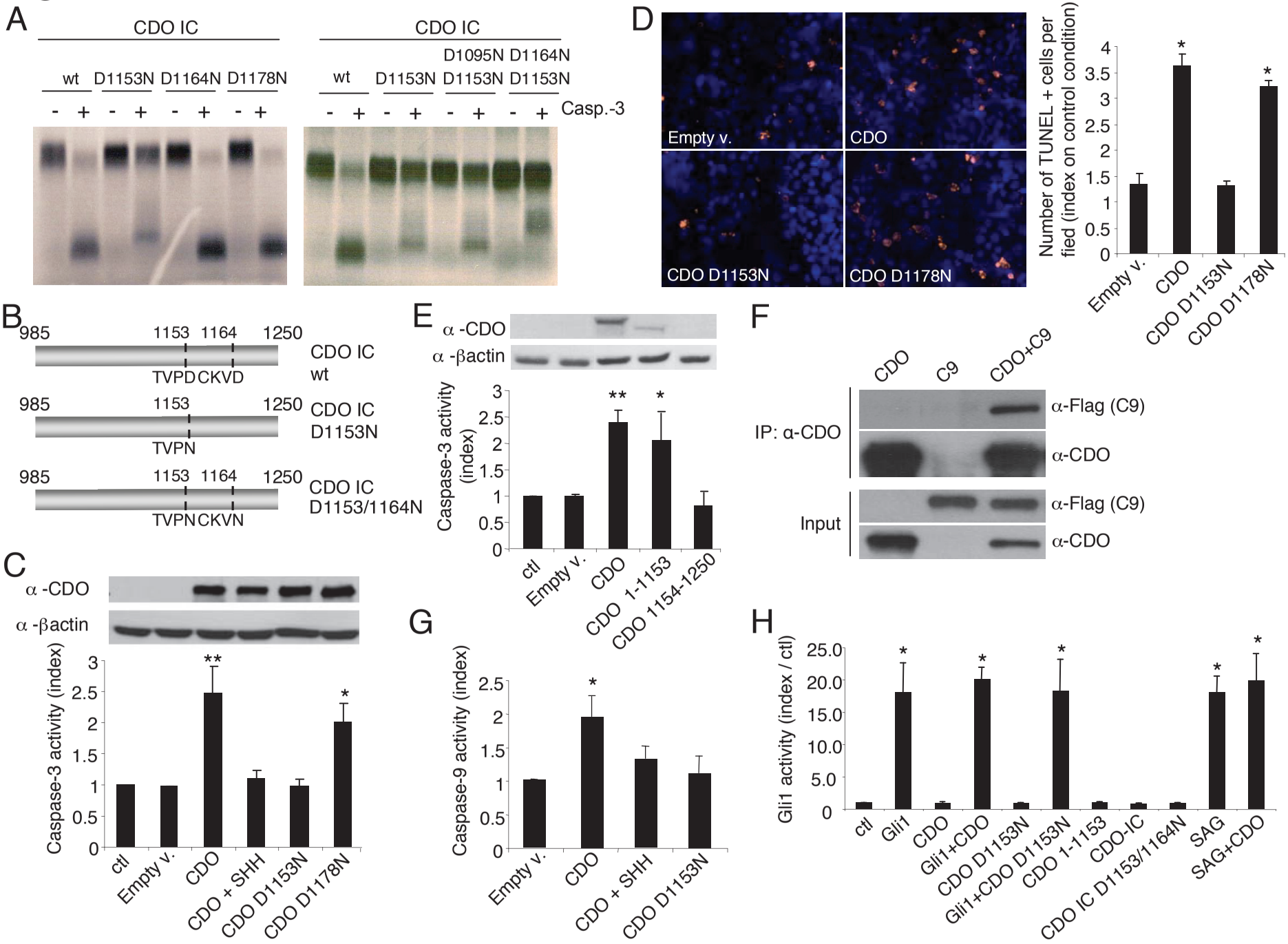

A
CDO IC
wt D1153N D1164N D1178N
- + - + - + - +
CDO IC
wt D1153N D1095N D1153N D1164N D1153N
- + - + - + - +
Casp.-3
B
985 1153 1164 1250
TVPD CKVD
CDO IC wt
985 1153 1250
TVPN
CDO IC D1153N
985 1153 1164 1250
TVPN CKVN
CDO IC D1153/1164N
C
α -CDO
α -βactin
Caspase-3 activity (index)
ctl
Empty v.
CDO
CDO + SHH
CDO D1153N
CDO D1178N
D
Empty v.
CDO
CDO D1153N
CDO D1178N
Number of TUNEL + cells per fied (index on control condition)
E
α -CDO
α -βactin
Caspase-3 activity (index)
ctl
Empty v.
CDO
CDO 1-1153
CDO 1154-1250
F
CDO
C9
CDO+C9
IP: α-CDO
α-Flag (C9)
α-CDO
Input
α-Flag (C9)
α-CDO
G
Caspase-9 activity (index)
Empty v.
CDO
CDO + SHH
CDO D1153N
H
Gli1 activity (index / ctl)
ctl
Gli1
CDO
Gli1+CDO
CDO D1153N
Gli1+CDO D1153N
CDO 1-1153
CDO-IC
CDO IC D1153/1164N
SAG
SAG+CDO

Figure 3

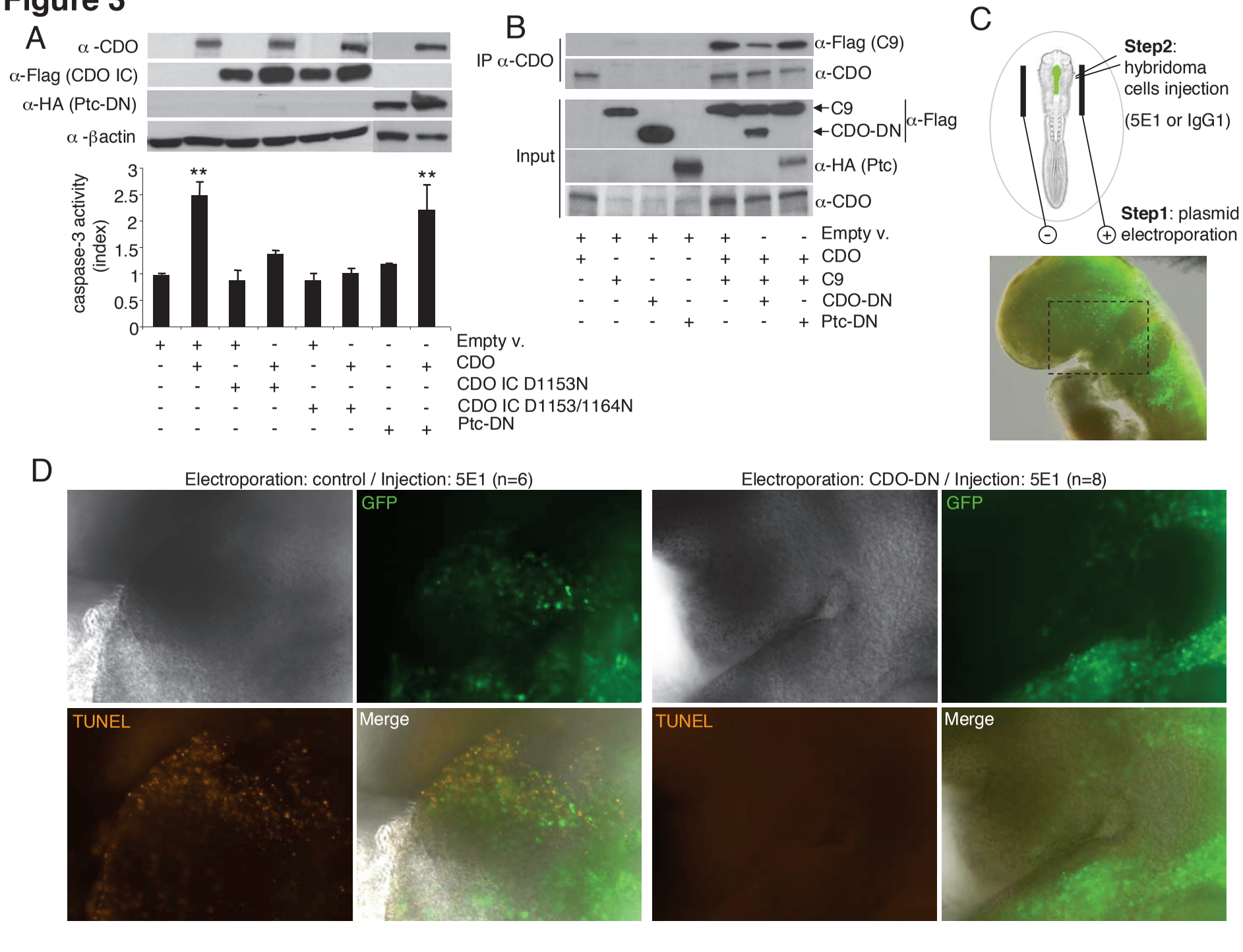
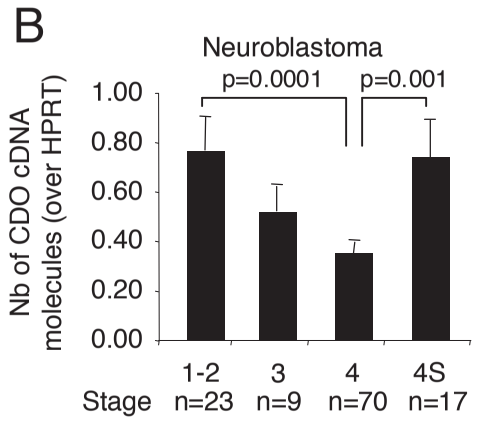
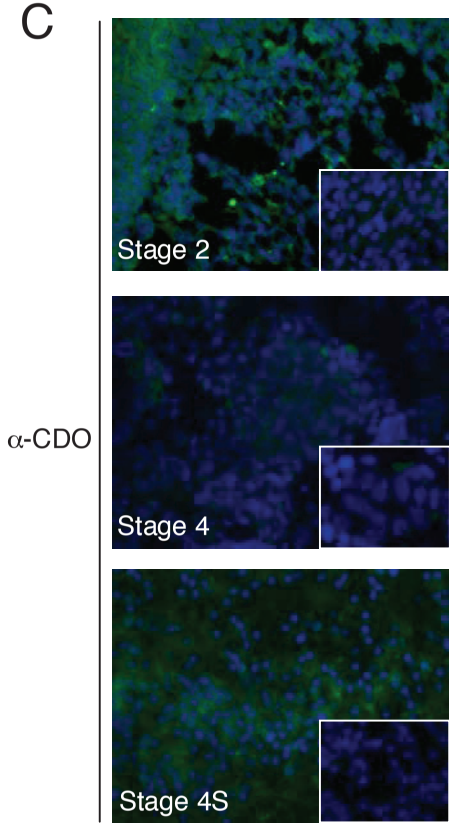

A
α -CDO
α-Flag (CDO IC)
α-HA (Ptc-DN)
α -βactin
caspase-3 activity (index)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
**
Empty v.
CDO
CDO IC D1153N
CDO IC D1153/1164N
Ptc-DN
B
IP α-CDO
α-Flag (C9)
α-CDO
Input
C9
CDO-DN
α-Flag
α-HA (Ptc)
α-CDO
Empty v.
CDO
C9
CDO-DN
Ptc-DN
C
Step2: hybridoma cells injection
(5E1 or IgG1)
Step1: plasmid electroporation
D
Electroporation: control / Injection: 5E1 (n=6)
Electroporation: CDO-DN / Injection: 5E1 (n=8)
GFP
GFP
TUNEL
Merge
TUNEL
Merge

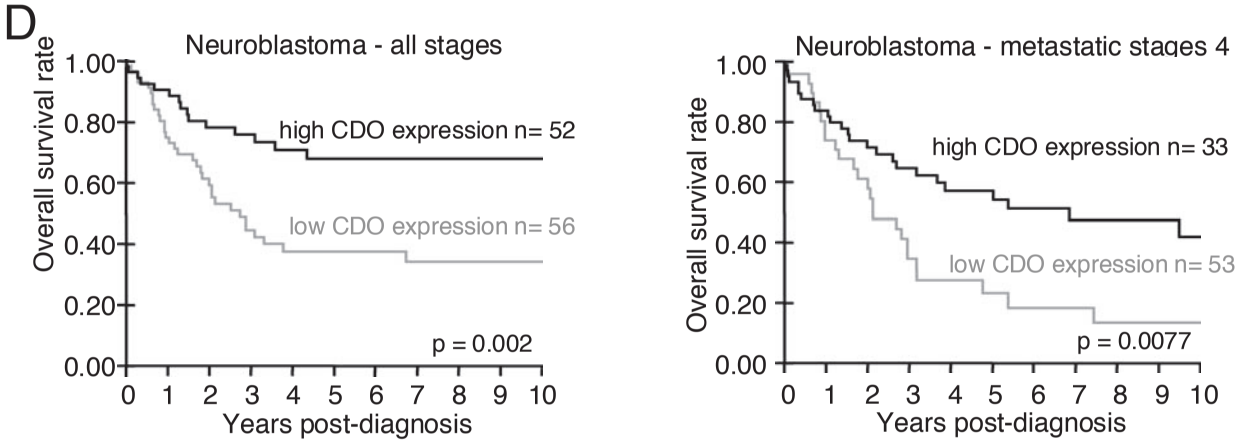
Figure 4

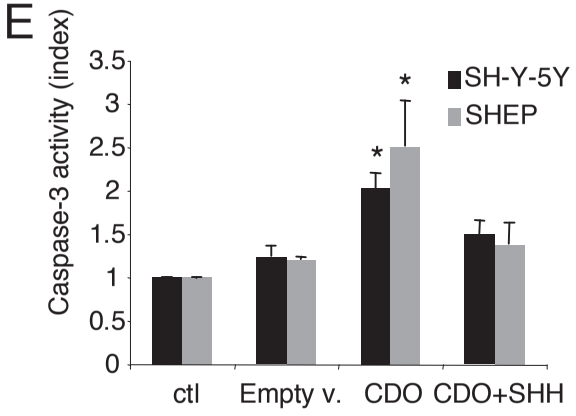
A

Tissue	Nb of paired samples	Quantification method	% tumors with CDO loss
Breast	50	Dot Blot	24%
Uterus	42	Dot Blot	57%
Ovary	29	Dot Blot and Q-RT-PCR	62%
Thyroid	6	Dot Blot	67%
Lung	38	Q-RT-PCR	74%
Colon	44	Q-RT-PCR	66%









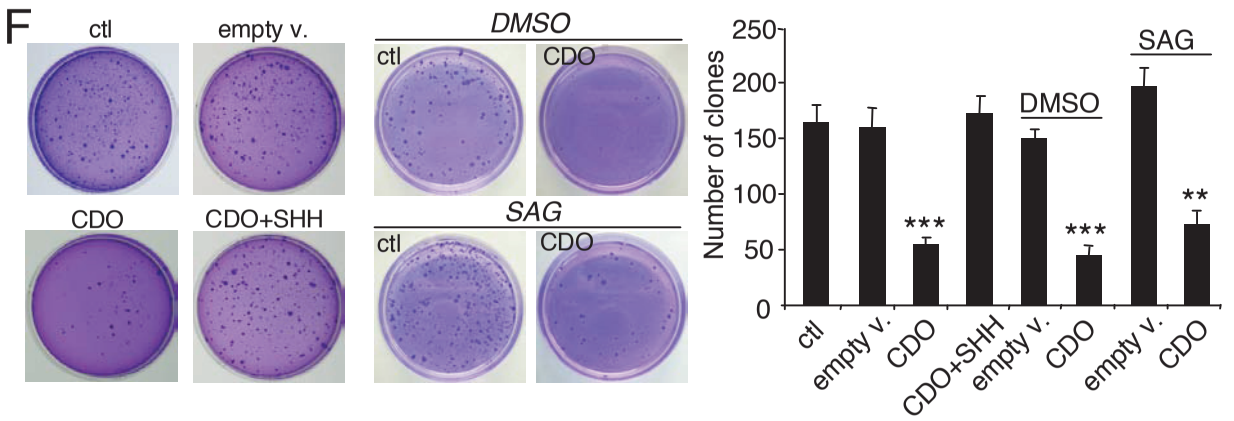


Figure 5

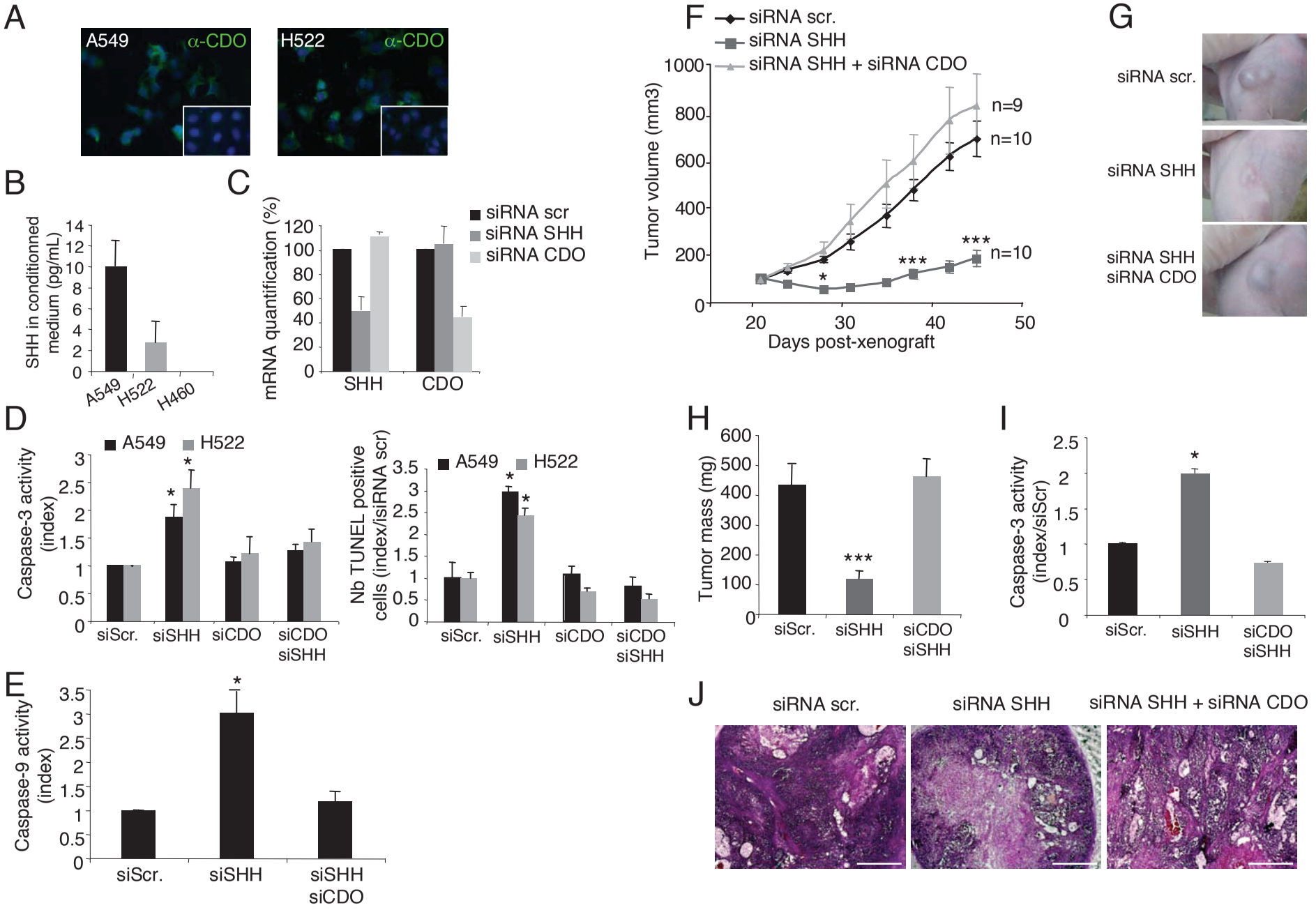
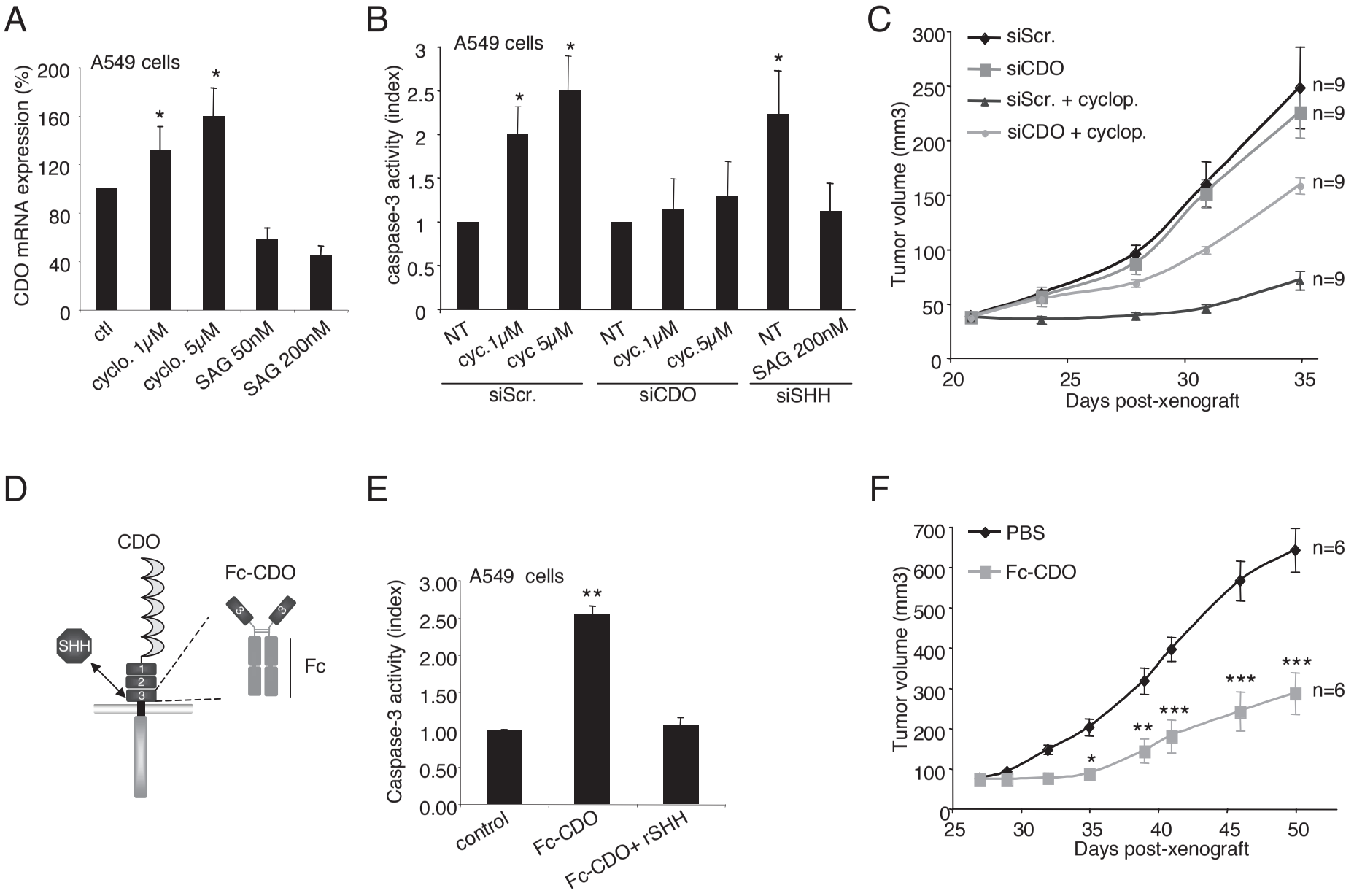
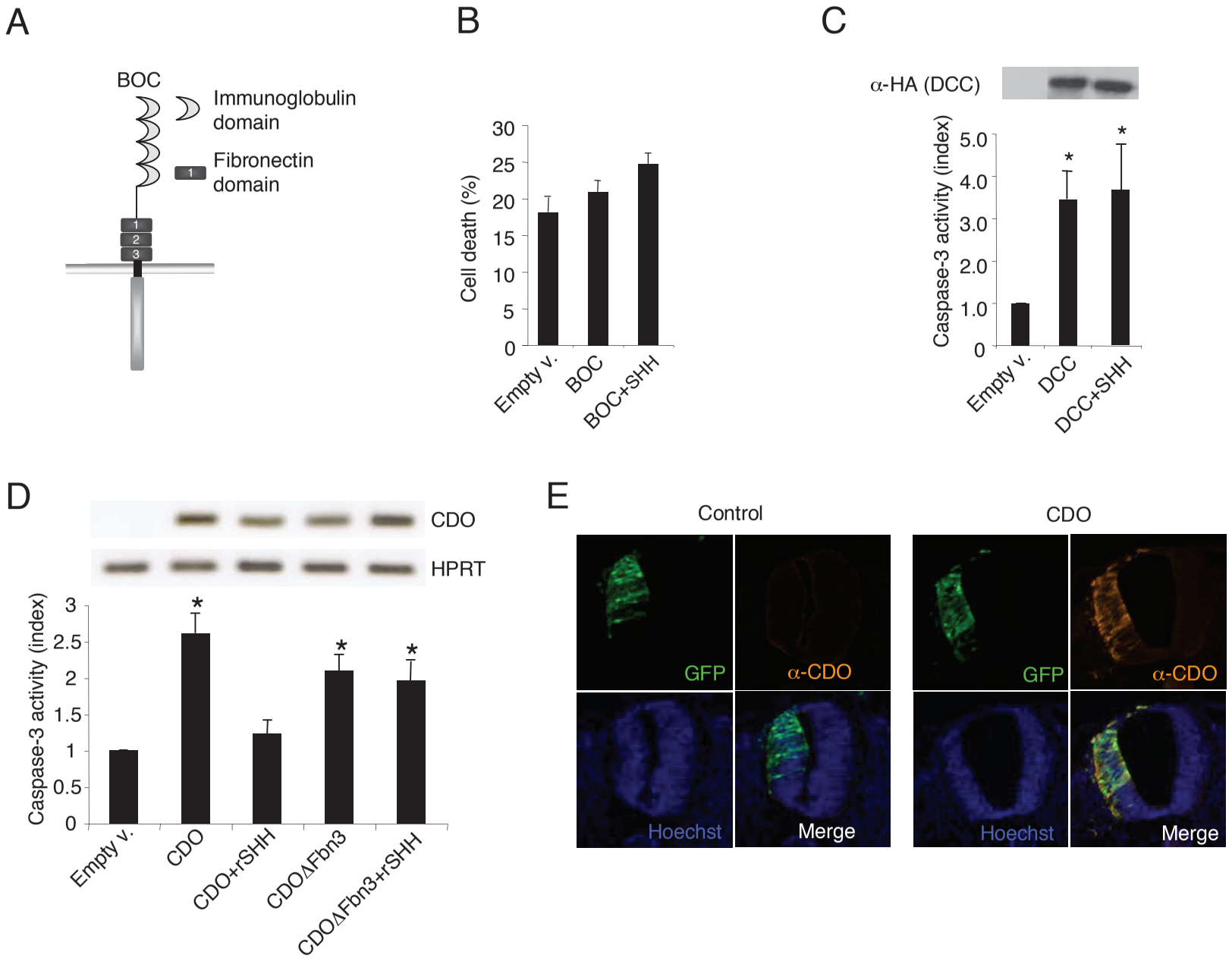

A
A549
α-CDO
H522
α-CDO
B
SHH in conditionned medium (pg/mL)
A549
H522
H460
C
mRNA quantification (%)
siRNA scr
siRNA SHH
siRNA CDO
SHH
CDO
F
siRNA scr.
siRNA SHH
siRNA SHH + siRNA CDO
Tumor volume (mm3)
n=9
n=10
n=10
Days post-xenograft
G
siRNA scr.
siRNA SHH
siRNA SHH
siRNA CDO
D
A549
H522
Caspase-3 activity (index)
siScr.
siSHH
siCDO
siCDO siSHH
Nb TUNEL positive cells (index/isiRNA scr)
E
Caspase-9 activity (index)
siScr.
siSHH
siSHH siCDO
H
Tumor mass (mg)
siScr.
siSHH
siCDO siSHH
I
Caspase-3 activity (index/siScr)
siScr.
siSHH
siCDO siSHH
J
siRNA scr.
siRNA SHH
siRNA SHH + siRNA CDO

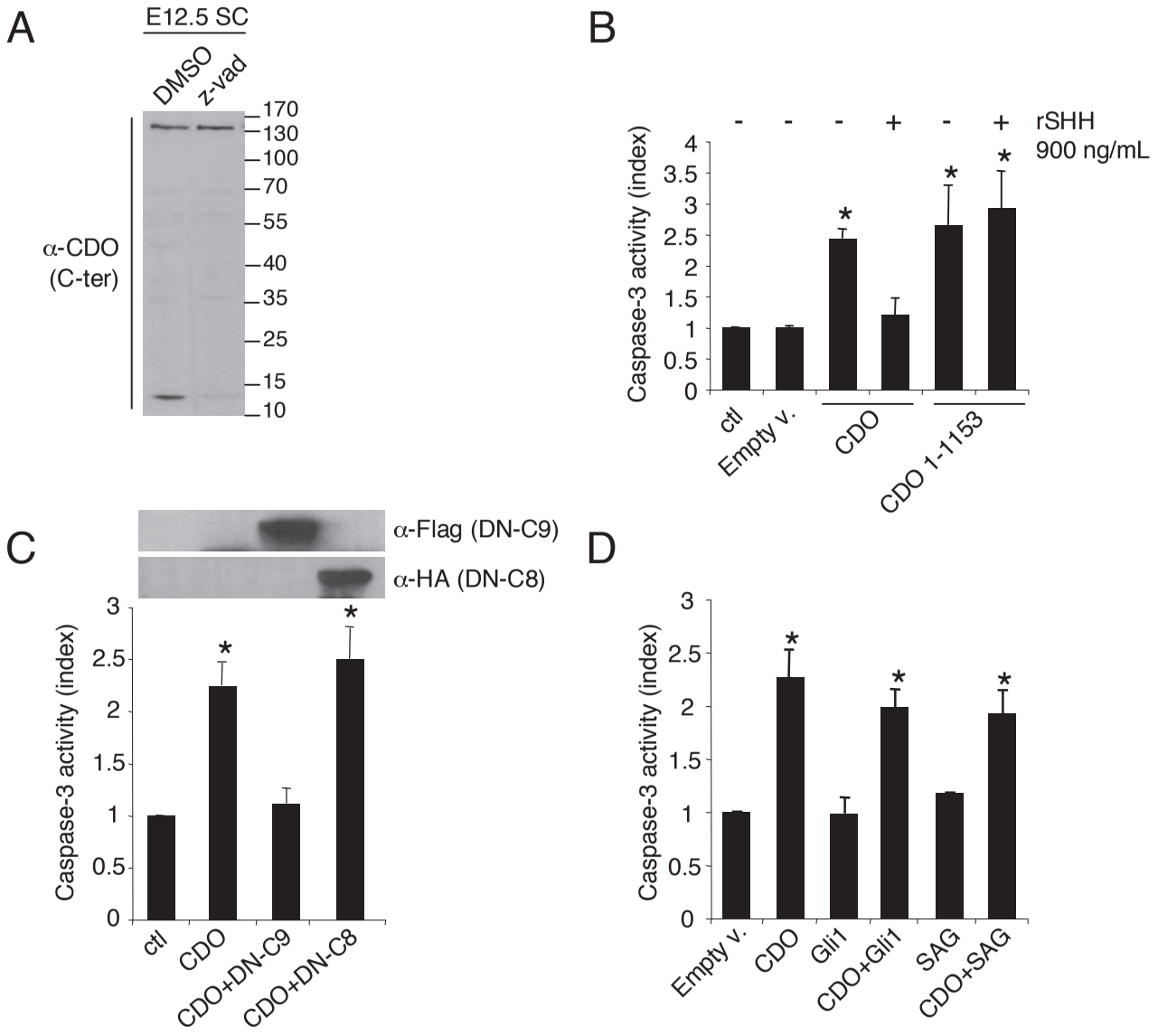
Figure 6


A
A549 cells
CDO mRNA expression (%)
200
160
120
80
40
0
ctl
cyclo. 1μM
cyclo. 5μM
SAG 50nM
SAG 200nM
B
A549 cells
caspase-3 activity (index)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
NT
cyc.1μM
cyc 5μM
NT
cyc.1μM
cyc.5μM
NT
SAG 200nM
siScr.
siCDO
siSHH
C
siScr.
siCDO
siScr. + cyclop.
siCDO + cyclop.
n=9
n=9
n=9
n=9
Tumor volume (mm3)
300
250
200
150
100
50
0
20
25
30
35
Days post-xenograft
D
CDO
Fc-CDO
SHH
1
2
3
Fc
E
A549 cells
Caspase-3 activity (index)
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
control
Fc-CDO
Fc-CDO+ rSHH
F
PBS
Fc-CDO
n=6
n=6
Tumor volume (mm3)
700
600
500
400
300
200
100
0
25
30
35
40
45
50
Days post-xenograft

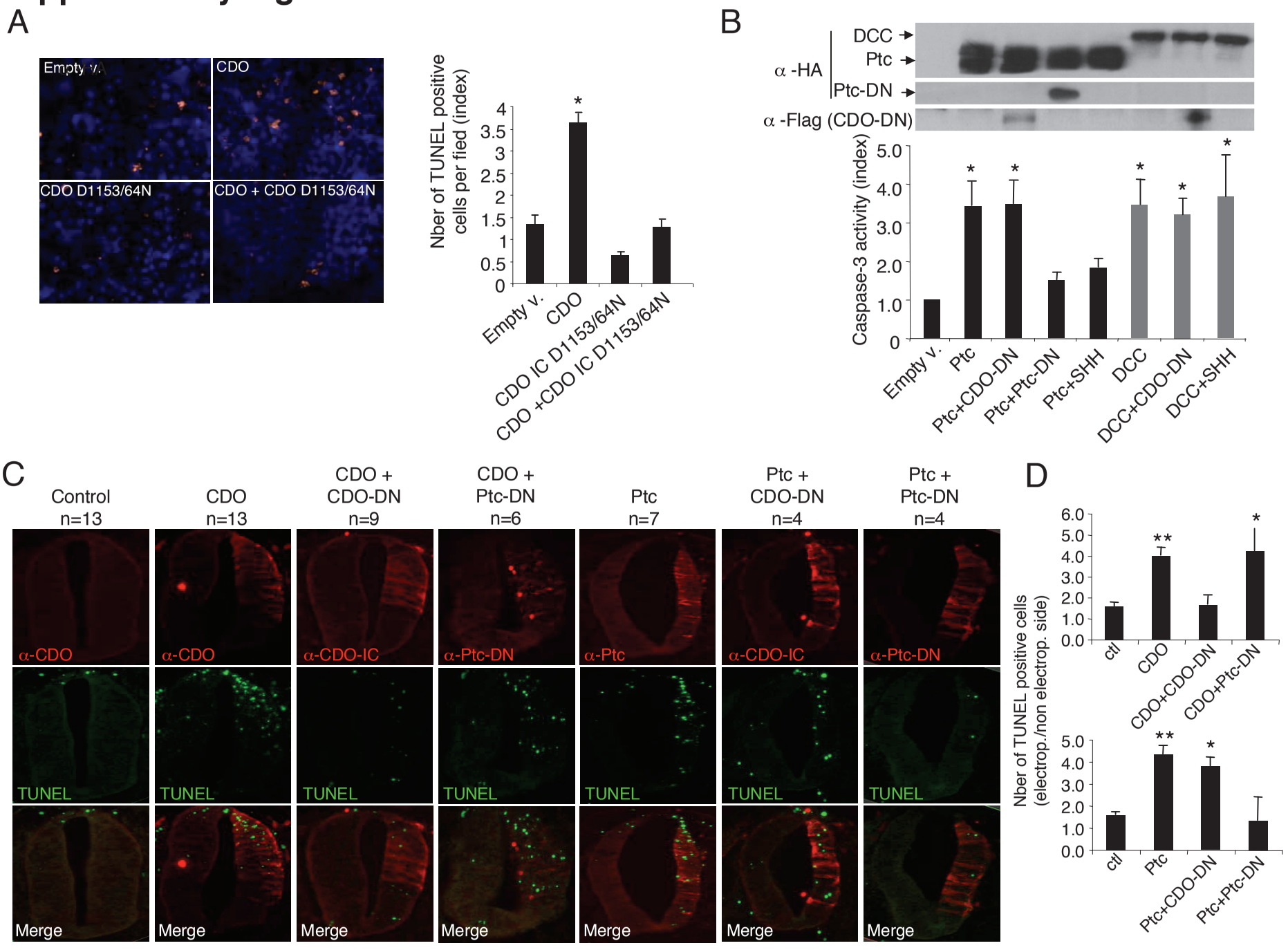
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2

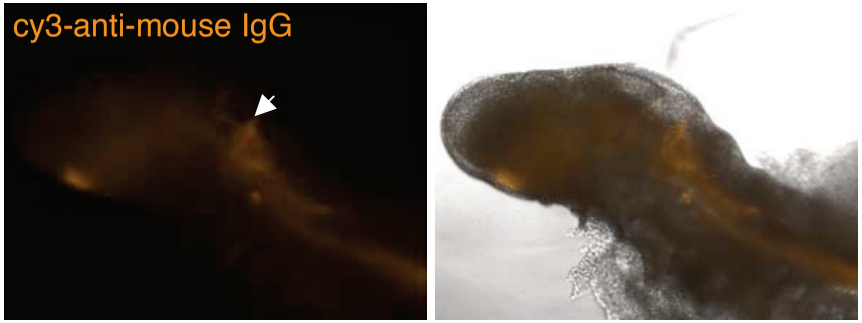


Supplementary Figure 3

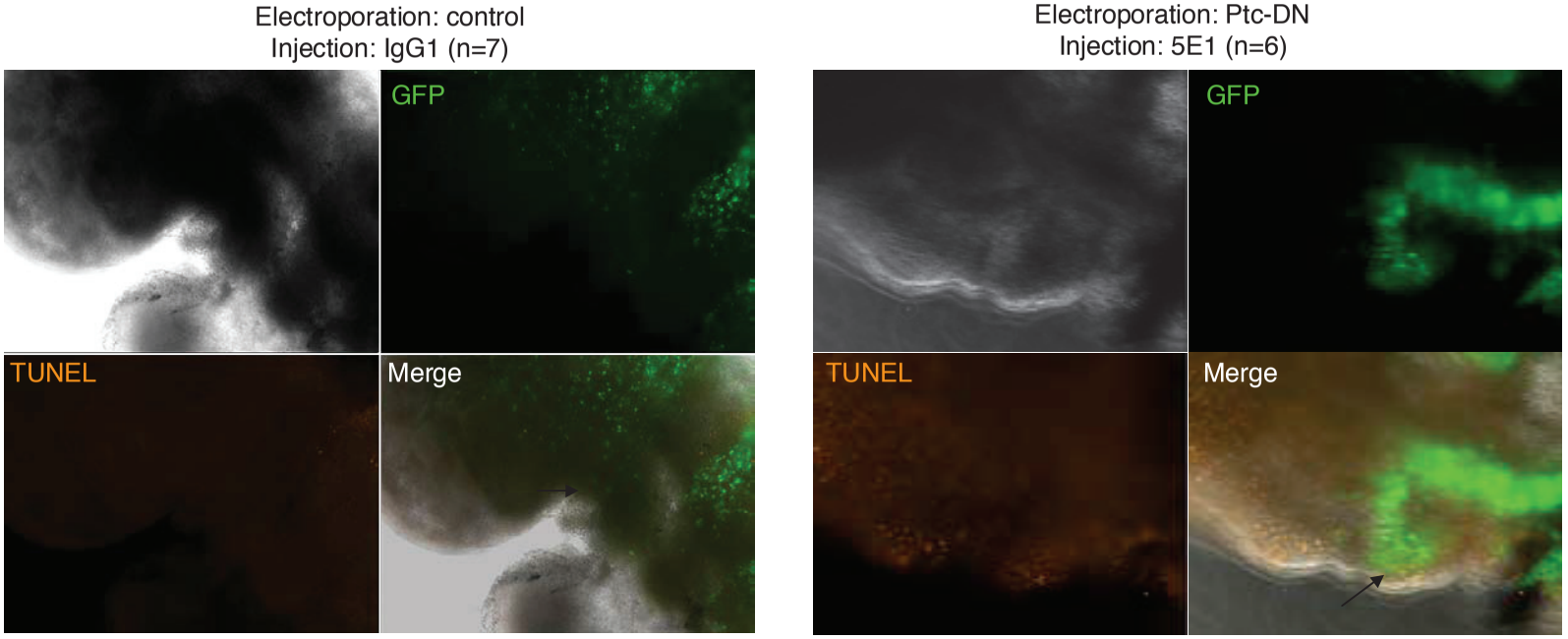


Supplementary Figure 4

A



B

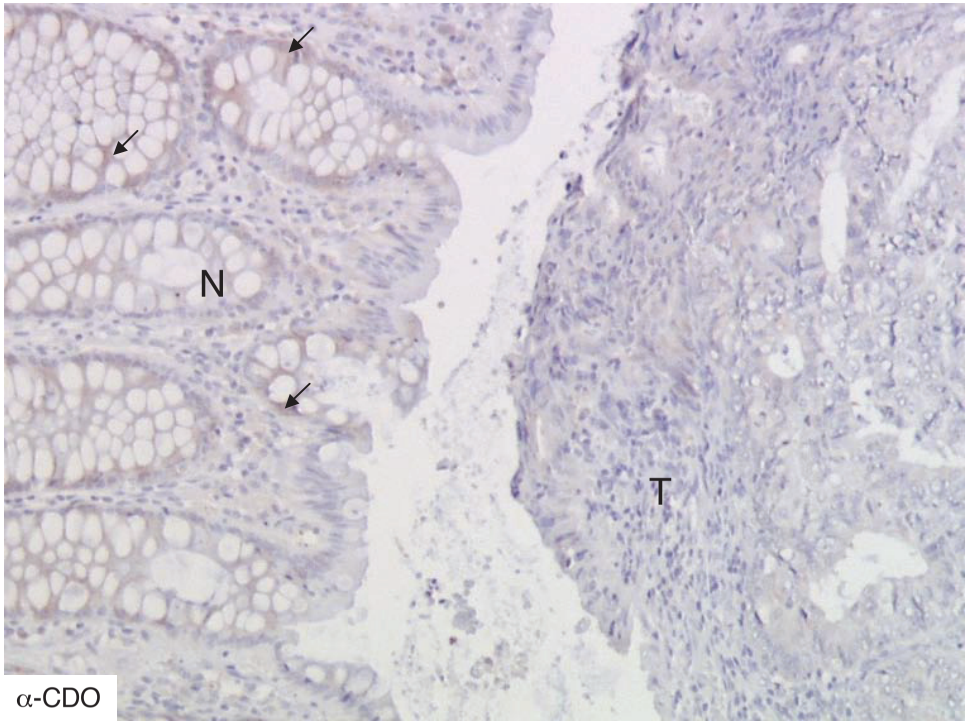


Supplementary Figure 5

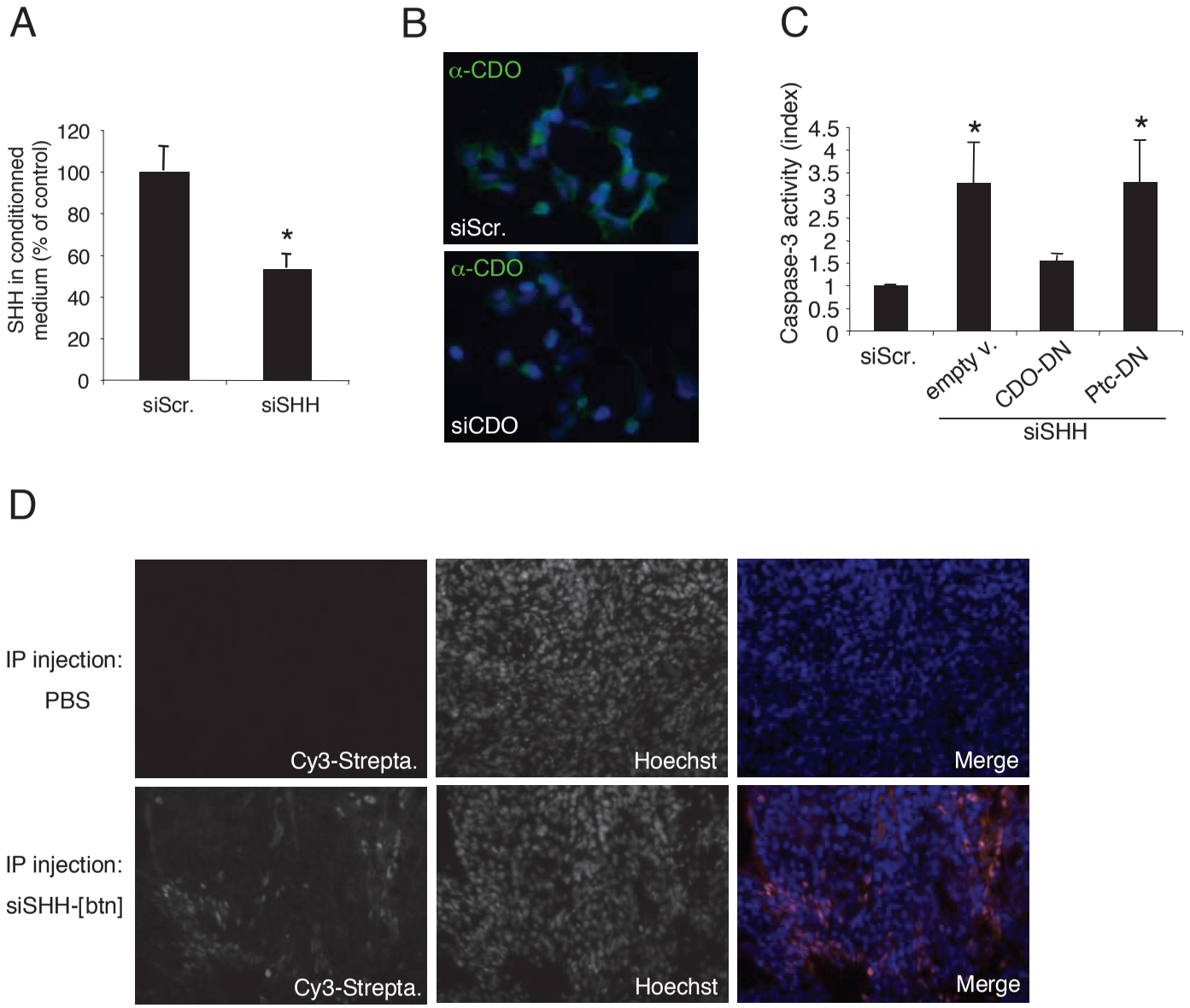
A

	Colorectal Adenocarcinomas		
	Tis (n=9)	T1/T2 (n=16)	T3/T4 (n=20)
Normal < Tumor	0	0	0
Normal = Tumor	7	3	0
Normal > Tumor	2	8	7
Tumor = 0	0	5	13

B



Supplementary Figure 6



Supplementary Table 1

Cell type	Cell line	CDO	SHH
NSCLC	Calu3	+++	+++
	H2228	+++	+
	H1373	+++	+
	H1651	++	+
	H1581	++	+/-
	H522	++	+
	A427	++	+/-
	A549	++	++
	H2342	++	+/-
	H1793	++	+/-
	Hs 229.T	+	+/-
	H661	+	+
	H460	+	-
	H1435	+	+
	H2073	+/-	+/-
	H1703	+/-	+/-
	H1404	+/-	++
	H2347	+/-	+/-
	H2087	+/-	++
	H358	-	+/-
	H322	-	+/-
Colorecal cancer	HCT116	+++	+/-
	LS174T	++	+
	HT-29	++	++
	Co-115	++	+/-
	V9P	++	+/-
	SW48	++	+
	SW480	++	++
	LoVo	+	+++
	ISR1	+/-	+/-
	LS513	+/-	+
Pancreatic cancer	MIA-Paca	+++	++

Cell type	Cell line	CDO	SHH
Neuroblastoma	IMR32	+++	+++
	CLB-Hut	+++	-
	CLB-Sed	++	-
	CLB-Bel	++	-
	CLB-Es	++	++
	CLB-Ma1	++	-
	CLB-Bar	++	-
	CLB-Ca	+	+/-
	CLB-BerLud1	+	-
	IGR-N-91	+	+
	SKNAS	+/-	++
	SHEP	+/-	+
	CLB-BerLud2	+/-	-
	CLB-Pe	+/-	-
	CLB-Ma2	+/-	-
	CLB-VolMo	+/-	+++
	CLB-Tr	+/-	+
	SHSY 5Y	+/-	-
	CLB-Re	+/-	++
	CLB-BouLT	+/-	-
	CLB-Ga	+/-	+/-
	CLB-BARREC	+/-	-
	CLB-Ge2	+/-	-
Ovarian cancer	A2780	++	+/-
	OVCAR-3	++	+/-
	IGROV-1	+	++
	OAW-42	+	+

Annexe N°6 : Etude comportementale des souris DCCD1290N

RAPPORT D'ÉTUDE

Analyse de la fonction motrice de souris transgéniques vs souris sauvages en fonction du sexe et au cours du développement

Rapport d'étude n°: PAYS/0210/Module 6

Version finale: Juin 30, 2010

Directeur d'étude : Corinne HUCHET-CADIOU
e-mail: corinne.cadiou@univ-nantes.fr

Lieu de l'étude: **CNRS UMR 6204 - CARDIEX PLATFORM**

Sponsor : **Laboratoire Apoptose Cancer et Développement**
CNRS UMR 5238
FNCLCC Lyon Centre Léon Bérard

SOMMAIRE

SOMMAIRE **2**

LISTE DES TABLES ET DES FIGURES **3**

PERSONNES IMPLIQUÉES DANS L'ÉTUDE **5**

STUDY REPORT APPROVAL **6**

RÉSUMÉ DU RAPPORT D'ÉTUDE **7**

RAPPORT D'ÉTUDE **8**

A - INTRODUCTION ET OBJECTIF **8**

B - MATÉRIEL ET MÉTHODES **8**
1- Modèle animal *8*
2 -Exploration fonctionnelle de la motricité : tests moteurs *9*
3 - Expression des résultats et analyse statistique *10*

C - RÉSULTATS **11**
1 – Evolution du poids des animaux au cours du temps *11*
2 -Exploration fonctionnelle de la motricité : tests moteurs *15*
a) Exploration fonctionnelle au premier stade de développement : 8 semaines d'age.....15
b) Exploration fonctionnelle au deuxième stade de développement : 24 semaines d'age.....33
3 -Analyse du poids des organes et des muscles lors du sacrifice (24/25 semaines d'age) *51*

D - ANALYSE DES RÉSULTATS **56**
1 – Evolution du poids des animaux au cours du temps *56*
2 -Exploration fonctionnelle de la motricité : tests moteurs *56*
a) Exploration fonctionnelle au premier stade de développement : 8 semaines d'age.....56
b) Exploration fonctionnelle au deuxième stade de développement : 24 semaines d'age.....58
3 -Analyse du poids des organes et des muscles lors du sacrifice (24/25 semaines d'age) *59*

CONCLUSIONS GÉNÉRALES **60**

LISTE DES TABLES ET DES FIGURES

Tableau 1 et figure 1 : Evolution du poids (g) des animaux en fonction de leur age..... 11

Tableau 2 et figure 2 : Prise de poids (%) observée par rapport à la première mesure (semaine 7)..... 13

Tableau et figure 3 : Temps de maintien sur la barre en rotation observés sur le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 8 semaines (valeurs absolues)..... 15

Tableau et figure 4 : Temps de maintien sur la barre en rotation observés sur le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 8 semaines (% valeurs sauvage). 16

Tableau et figure 5 : Temps de maintien sur la barre en rotation observés sur le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 8 semaines (% valeurs male). 17

Tableau 6 : Analyse de paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 8 semaines (valeurs absolues).... 18

Tableau et figure 7 : Evolution de nombre de mouvements associés à la locomotion horizontale déterminés au cours d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 8 semaines (valeurs absolues).. 19

Tableau et figure 8 : Analyse des paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 8 semaines (% valeurs sauvage)..... 21

Tableau et figure 9 : Analyse de paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 8 semaines (% valeurs male)..... 23

Tableau et figure 10 : Analyse du poids et des forces d'agrippement développées par les souris de 8 semaines des différents lots. Les résultats sont exprimés en valeur absolue (g ou g/g)..... 25

Tableau et figure 11 : Analyse des forces d'agrippement normalisées développées par les souris de 8 semaines (% valeurs sauvage).. 26

Tableau et figure 12 : Analyse des forces d'agrippement normalisées développées par les souris âgées de 8 semaines (% valeurs male)..... 27

Tableau 13 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) déterminés pour des animaux de 8 semaines au cours du Wire Test (valeurs absolues).... 28

Figure 13 : Evolution du score lors de l'analyse de la répartition des chutes au cours des 300 secondes de test pour des animaux de 8 semaines.. 28

Tableau et figure 14 : Evolution de la moyenne des scores calculée toutes les minutes au cours des 300 secondes du test pour des animaux de 8 semaines. (valeurs absolues).. 29

Tableau et figure 15 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) observée pour des animaux de 8 semaines au cours du Wire Test (% valeurs sauvage)..... 31

Tableau et figure 16 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) observés pour des animaux de 8 semaines au cours du Wire test (% valeurs male)..32

Tableau et figure 17 : Temps de maintien sur la barre en rotation observé pour le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 24 semaines (valeurs absolues)..... 33

Tableau et figure 18 : Temps de maintien sur la barre en rotation observés sur le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 24 semaines (% valeurs sauvage).. 34

Tableau et figure 19 : Temps de maintien sur la barre en rotation observés sur le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 24 semaines (% valeurs male)..... 35

Tableau 20 : Analyse de paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 24 semaines (valeurs absolues)..... 36

Tableau et figure 21 : Evolution de nombre de mouvements associés à la locomotion horizontale déterminés au cours d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 24 semaines (valeurs absolues).... 37

Tableau et figure 22 : Analyse des paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 24 semaines (% valeurs sauvage)..... 39

Tableau et figure 23 : Analyse des paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 24 semaines (% valeurs male). 41

Tableau et figure 24 : Analyse du poids et des forces d'agrippement développées par les souris de 24 semaines des différents lots. Les résultats sont exprimés en valeur absolue (g ou g/g). 43

Tableau et figure 25 : Analyse des forces d'agrippement normalisées développées par les souris de 24 semaines (% valeurs sauvage).. 44

Tableau et figure 26 : Analyse des forces d'agrippement normalisées développées par les souris âgées de 24 semaines (% valeurs male)..... 45

Tableau 27 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) déterminés pour des animaux de 24 semaines (valeurs absolues)... 46

Figure 27 : Evolution du score lors de l'analyse de la répartition des chutes au cours des 300 secondes de test pour des animaux de 24 semaines. 46

Tableau et figure 28 : Evolution de la moyenne des scores calculée toutes les minutes au cours des 300 secondes du test pour des animaux de 24 semaines (valeurs absolues).. 47

Tableau et figure 29 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) déterminés pour des animaux de 24 semaines (% valeurs sauvage)... 49

Tableau et figure 30 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) déterminés pour des animaux de 24 semaines (% valeurs male). 50

Tableau 31 : Poids des animaux, organes et muscles déterminés lors du sacrifice des animaux (valeurs absolues).. 51

Tableau et figure 32 : Poids des animaux et poids normalisés des organes et muscles exprimés déterminés lors du sacrifice des animaux (% valeurs sauvage)..... 52

Tableau et figure 33 : Poids des animaux et poids normalisés des organes et muscles exprimés déterminés lors du sacrifice des animaux (% valeurs male)..... 54

PERSONNES IMPLIQUÉES DANS L'ÉTUDE

***SPONSOR*:** **PAYS L.**

Adresse: **CNRS UMR 5238 LACD**
Laboratoire Apoptose Cancer et Développement
FNCLCC Lyon Centre Léon Bérard
28 Rue Laënnec
69373 Lyon CEDEX 08
FRANCE
Tel: 33 (0) 4.78.78.59.72

***LIEU D'ETUDE*:** **CNRS UMR 6204 - CARDIEX PLATFORM**

Adresse: **UFR Sciences et Techniques**
2 rue de la Houssinière
44322 Nantes Cedex
FRANCE
Tel: 33 (0) 2 51 12 56 15
Fax: 33 (0) 2 51 12 56 06

Directeur d'étude: Corinne HUCHET-CADIOU
e-mail: corinne.cadiou@univ-nantes.fr

Management: Pierre PACAUD
e-mail: pierre.pacaud@univ-nantes.fr

Personnel Technique: Aude LAFOUX
Pascal GERVIER

STUDY REPORT APPROVAL

Analyse de la fonction motrice de souris transgéniques vs souris sauvages en fonction du sexe et au cours du développement

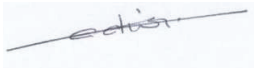
I, the undersigned, declare that the indicated sections of the work reported in the present document were performed under my supervision according to the procedures herein described and assume the responsibility of the validity of the reported data.

Study performed at: UFR Sciences et Techniques
2 rue de la Houssiniere
44322 Nantes Cedex
FRANCE
Tel: 33 (0) 2 51 12 56 15
Fax: 33 (0) 2 51 12 56 06

Dates of experimental period: from September 21, 2009 to May 12, 2010.

Directeur d'étude **Corinne HUCHET - CADIOU**

Juin 30, 2010



RÉSUMÉ DU RAPPORT D'ÉTUDE

Résumé du rapport d'étude	
NOM DU SPONSOR: L. **PAYS**	**Rapport d'étude n°: PAYS/0210/Module 6**
Titre de l'étude	Analyse de la fonction motrice de souris transgéniques vs souris sauvages en fonction du sexe et au cours du développement
Planning	Période de l'étude: 21 Septembre 2009 au 12 Mai 2010 Date du rapport final: 30 Juin 2010
Directeur d'étude	Corinne HUCHET-CADIOU UMR CNRS 6204 / CARDIEX PLATFORM - NANTES 44322 - France
Objectif	Mise en évidence de modifications potentielles de la fonction motrice de souris transgéniques males et femelles à différents stades de développement *versus* souris sauvages
Méthodes Animaux Groupe d'animaux	 Souris sauvages et transgéniques de 8 et 24 semaines **4 lots :** **souris femelles sauvages (n=7),** **souris femelles transgéniques (n=11),** **souris males sauvages (n=5),** **souris males transgéniques (n=8).**
Méthodes Tests	**Analyse de la croissance et de la fonction motrice** Poids des animaux, actimetre, rotarod, wire test, grip test.

RAPPORT D'ÉTUDE

A - Introduction et objectif

L'objectif de l'étude est de mettre en évidence des atteintes potentielles de la fonction motrice chez des souris transgéniques mâles et femelles à deux stades de développement de 8 et 24 semaines.

B - Matériel et méthodes

1- Modèle animal

L'approche a été conduite de manière comparative chez des souris sauvages et transgéniques (Tg), males et femelles, fournies par le laboratoire Apoptose Cancer et Développement, CNRS UMR 5238 (Lyon) selon la répartition suivante :

	Femelles		Males	
Date arrivée	**Sauvages**	**Tg**	**Sauvages**	**Tg**
16/09/2009	1	3	1	4
05/11/2009	2	8	2	4
07/01/2010	4		2	
Effectif final (n)	*7*	*11*	*5*	*8*

Dès leur arrivée au sein de l'animalerie de l'UFR Sciences et techniques, les souris, alors âgées de 5/6 semaines, ont été individualisées grâce à un marquage à l'oreille afin d'assurer un suivi de chaque animal, puis placées dans des boites en fonction de leur sexe (male ou femelle), génotype (sauvage et Tg) et leur date d'arrivée, avec un effectif maximal de 4 animaux par boite.

Afin d'évaluer la croissance et prise de poids des souris des différents groupes, une mesure hebdomadaire du poids des animaux a été effectuée, de la première semaine suivant leur arrivée (age des souris : 6 semaines) jusqu'à l'age de 24 semaines.

L'exploration fonctionnelle de la motricité a été effectuée à deux stades de développement, à 8 et 24 semaines d'age.

2 -Exploration fonctionnelle de la motricité : tests moteurs

Analyse de la coordination motrice et résistance à la fatigue : Rotarod

Le Rotarod (LE-8500, Bioseb, France) est une méthode d'analyse de la coordination motrice, de l'équilibre et de la résistance à l'effort des rongeurs via la mesure du temps de maintien de l'animal sur une barre en rotation à vitesse croissante. Après une phase de conditionnement étalée sur 2 jours, les souris sont placées sur une barre en plastique de 3 cm de diamètre tournant à la vitesse de 4 rotations par minutes (rpm), puis la vitesse augmente graduellement de 4 à 40 rpm au cours d'une session de 5 minutes. Le temps de maintien sur la barre est enregistré au cours de trois sessions espacées de 60 minutes de repos, et le meilleur essai est retenu pour l'analyse statistique. Ce test, largement utilisé dans la bibliographie, permet de mettre en évidence de manière plus particulièrement les variations potentielles de la coordination motrice des animaux.

Analyse de l'activité locomotrice horizontale et verticale : actimètre IR

L'activité motrice spontanée des animaux est mesurée à l'aide d'un actimètre à infra-rouge (LE-8810, Bioseb, France). Chaque animal est placé pendant 15 minutes dans une arène transparente entourée de 32 capteurs infra-rouge situés à différentes hauteur (réglable en fonction de la taille de l'animal) permettant ainsi de mesurer les mouvements horizontaux et verticaux. Différents paramètres sont alors analysés à l'aide du logiciel Actitrack (Panlab, Bioseb, France) à savoir :

- le nombre total de mouvements, avec la distinction entre mouvements stéréotypés et les mouvements associés à la locomotion
- la vitesse maximale de déplacement (cm/sec) et la distance totale parcourue (cm)
- le nombre et durée moyenne de redressements (sec)
- le temps de repos (sec)

Analyse de la force d'agrippement : Grip test

Ce test permet d'évaluer la force musculaire. L'animal est placé sur une grille reliée à un capteur de tension de telle sorte que la souris s'accroche à la grille soit par les pattes antérieures, soit par les quatre pattes. La souris est ensuite tirée horizontalement vers l'arrière par la queue jusqu'au relâchement de la grille et le capteur enregistre la résistance maximale développée par l'animal à chaque essais. Les résultats, exprimés en valeur absolue (g) ou normalisés par rapport au poids de l'animal (g/g), résulte de la moyenne de 3 essais consécutifs réalisés dans chacune des configurations (pattes antérieures ou quatre pattes).

Analyse de la force et de la résistance à la fatigue : Wire test

Ce test permet d'évaluer la force et l'endurance. Les souris sont suspendues par les pattes antérieures sur une tige horizontale de 1,5 mm de diamètre située à 35 cm de hauteur. Les capacités motrices sont alors analysées par deux types d'observation :

1) Attribution d'un score (ou indice de comportement) en fonction du comportement de l'animal sur la barre au cours de 30 secondes de test (Niimi et al., 2009 [1]) selon le barème suivant :

- Si chute de l'animal : score = 0
- Si souris immobile (pendant au moins 5 secondes) : score = 1
- Si traction (passage de la tête au dessus de la barre) : score = 2
- Si accrochage de 3 pattes sur la barre : score = 3
- Si accrochage des 4 pattes + queue (= redressement) : score =4
- Si redressement + fuite de l'animal sur les bords du système : score = 5

Pour chaque animal, la valeur retenue pour l'analyse statistique résulte de la moyenne des scores obtenus lors de deux sessions successives, sans temps de repos.

2) Analyse du nombre et du temps de chutes au cours de 5 minutes de test (Raymackers et al., 2003 [2]) : après suspension des animaux par les pattes, le temps de chaque chute est relevé jusqu'à la fin du test. L'épreuve est arrêtée après la 10ème chute ou au bout de 300 secondes. Pour ce test, les résultats sont exprimés en calculant un score moyen décrit par Raymackers et collaborateurs (2003). Au début du test, un score initial de 10 points est attribué à chaque animal et réduit de 1 point à chaque chute. Le score moyen pour un même groupe de souris est déterminé à toutes les secondes du test grâce à la formule suivante : score moyen = (10n-x)/n, avec n : le nombre d'animaux testés par groupe, x : le nombre de chutes cumulées. Le temps maximal de suspension à la barre est également déterminé.

3 - Expression des résultats et analyse statistique

Les résultats obtenus lors des différents tests sont présentées sous la forme de moyenne ± erreur standard, et n indique le nombre d'animaux. Pour chacun des paramètres analysés, les résultats sont présentés en valeurs absolues dans un premier temps (paragraphe **valeurs absolues**), puis exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour les souris sauvages du même sexe (male ou femelle ; paragraphe **Comparaison souris transgéniques *versus* souris sauvages**) et enfin en pourcentage des valeurs obtenues pour les souris males du même génotype (sauvage ou Tg ; paragraphe **Comparaison souris femelles *versus* souris males**). Le mode d'analyse de variance et les tests statistiques utilisés pour étudier la significativité des différences à 5 et 10%, réalisés à l'aide du logiciel SigmaStat 3.5 (Systat) sont indiqués sous chaque représentation de résultats (tableaux et figures).

[1] *Niimi K, Takahashi E, Itakura C. Analysis of motor function and dopamine systems of SAMP6 mouse. Physiol Behav. 2009 Mar 2;96(3):464-9.*

[2] *Raymackers JM, Debaix H, Colson-Van Schoor M, De Backer F, Tajeddine N, Schwaller B, Gailly P, Gillis JM.Consequence of parvalbumin deficiency in the mdx mouse: histological, biochemical and mechanical phenotype of a new double mutant. Neuromuscul Disord. 2003 Jun;13(5):376-87.*

C - Résultats

1 – Evolution du poids des animaux au cours du temps

Valeurs absolues

	Femelles		Males	
Age (sem)	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
7	18,0 ± 0,4 §	20,1 ± 0,3 *§	23,2 ± 0,7	23,8 ± 0,5
8	18,2 ± 0,4 §	20,8 ± 0,3 *§	24,1 ± 0,5	24,8 ± 0,6
9	19,5 ± 0,5 §	21,1 ± 0,4 **§	24,3 ± 0,3	25,1 ± 0,5
10	19,7 ± 0,4 §	21,6 ± 0,4 *§	25,6 ± 0,5	25,7 ± 0,7
11	20,3 ± 0,6 §	22,7 ± 0,4 *§	26,2 ± 0,5	26,7 ± 0,9
12	21,0 ± 0,5 §	23,3 ± 0,5 *§	27,1 ± 0,5	27,7 ± 1,0
13	21,5 ± 0,6 §	23,7 ± 0,5 *§	27,7 ± 0,4	28,1 ± 1,0
14	21,4 ± 0,5 §	24,2 ± 0,5 *§	28,2 ± 0,5	28,8 ± 1,1
15	22,0 ± 0,6 §	24,6 ± 0,4 *§	28,5 ± 0,6	29,0 ± 1,1
16	22,3 ± 0,8 §	24,9 ± 0,5 *§	29,2 ± 0,7	29,4 ± 1,3
17	22,9 ± 1,0 §	25,2 ± 0,4 *§	29,7 ± 0,7	28,4 ± 1,5
18	23,0 ± 0,7 §	25,6 ± 0,5 *§	30,4 ± 0,8	30,2 ± 1,2
19	23,3 ± 0,8 §	25,7 ± 0,5 *§	30,1 ± 0,8	30,5 ± 1,2
20	23,8 ± 1,0 §	26,3 ± 0,5 *§	30,7 ± 0,8	30,9 ± 1,3
21	23,8 ± 1,1 §	26,4 ± 0,5 *§	31,0 ± 0,8	31,1 ± 1,3
22	23,6 ± 1,1 §	26,2 ± 0,5 *§	30,9 ± 0,8	31,3 ± 1,3
23	23,5 ± 1,3 §	26,3 ± 0,6 *§	31,2 ± 1,1	31,5 ± 1,4
24	24,0 ± 1,3 §	26,4 ± 0,5 *§	31,4 ± 1,2	31,6 ± 1,2
n	*7*	*11*	*5*	*8*

Tableau 1 et figure 1 (voir page suivante) : Evolution du poids (g) des animaux en fonction de leur age (en nombre de semaines). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à mesures répétées à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * et ** indiquent une différence significative à 5 et 10 % respectivement avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). § indique une différence significative à 5 % avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux.

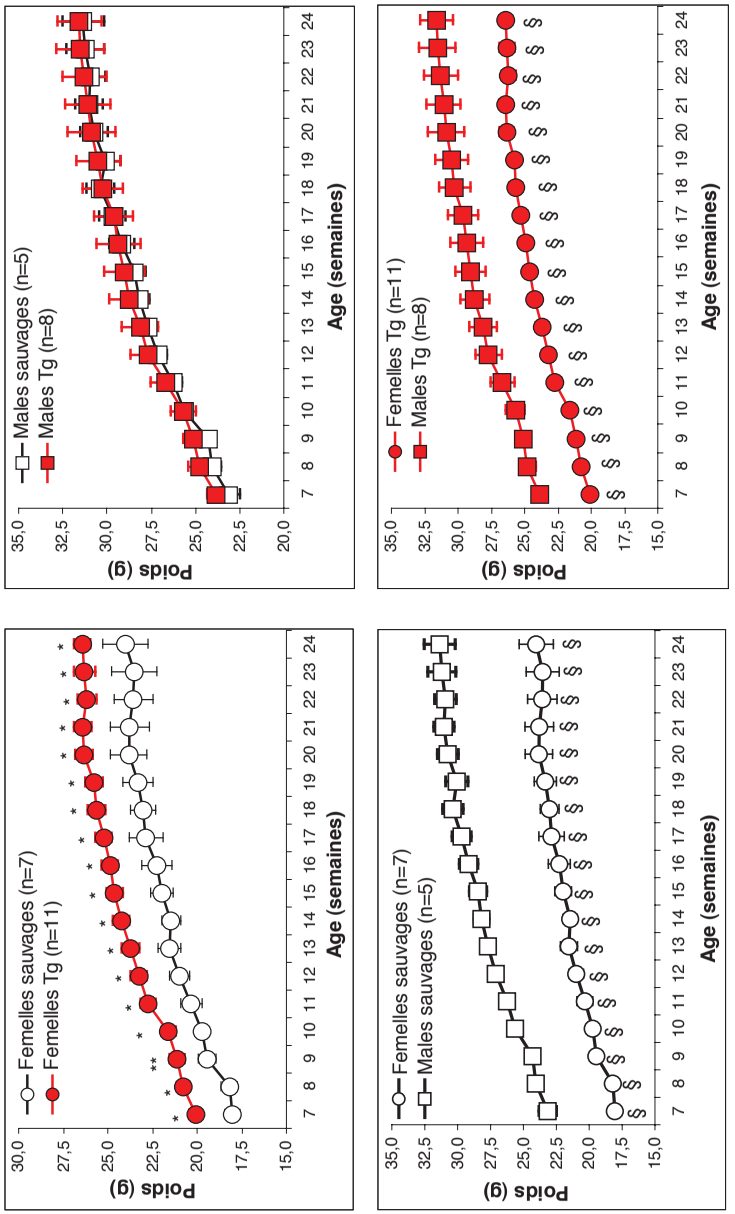


Figure 1

	Femelles		Males	
Age (sem)	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
8	0,9 ± 1,1	3,4 ± 0,8	4,0 ± 1,4	4,0 ± 0,7
9	7,8 ± 0,8	5,3 ± 1,1	5,1 ± 1,7	5,5 ± 0,5
10	9,4 ± 1,5	7,6 ± 1,0	10,9 ± 1,6	7,7 ± 0,8
11	12,6 ± 1,1	13,2 ± 1,6	13,5 ± 2,3	11,8 ± 1,7
12	16,3 ± 1,2	15,8 ± 1,1	17,2 ± 2,4	16,1 ± 2,2
13	19,3 ± 1,3	18,1 ± 1,6	19,8 ± 2,3	17,9 ± 2,6
14	18,9 ± 0,8	20,8 ± 1,8	21,9 ± 2,6	20,5 ± 2,6
15	21,8 ± 1,8	22,7 ± 2,0	23,1 ± 2,8	21,6 ± 2,5
16	23,2 ± 1,9	23,9 ± 1,3	26,2 ± 3,2	22,9 ± 2,9
17	26,5 ± 2,7	25,8 ± 1,7	28,5 ± 3,2	24,1 ± 2,2
18	27,4 ± 1,3	27,7 ± 1,5	31,3 ± 3,5	26,6 ± 2,5
19	29,2 ± 2,0	28,2 ± 1,5	30,1 ± 3,9	27,7 ± 2,7
20	31,8 ± 3,0	31,2 ± 2,2	33,0 ± 3,7	29,3 ± 3,0
21	31,6 ± 3,2	31,6 ± 2,0	34,3 ± 3,6	30,1 ± 2,7
22	30,3 ± 3,3	30,4 ± 2,0	33,7 ± 2,7	31,0 ± 2,7
23	30,1 ± 4,1	31,2 ± 2,6	34,8 ± 3,4	32,0 ± 3,1
24	32,8 ± 4,4	31,7 ± 2,0	35,5 ± 4,0	32,3 ± 2,9
n	*7*	*11*	*5*	*8*

Tableau 2 et figure 2 (voir page suivante) : Prise de poids (%) observée par rapport à la première mesure (semaine 7). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à mesures répétées à deux facteurs. n représente le nombre d'animaux.

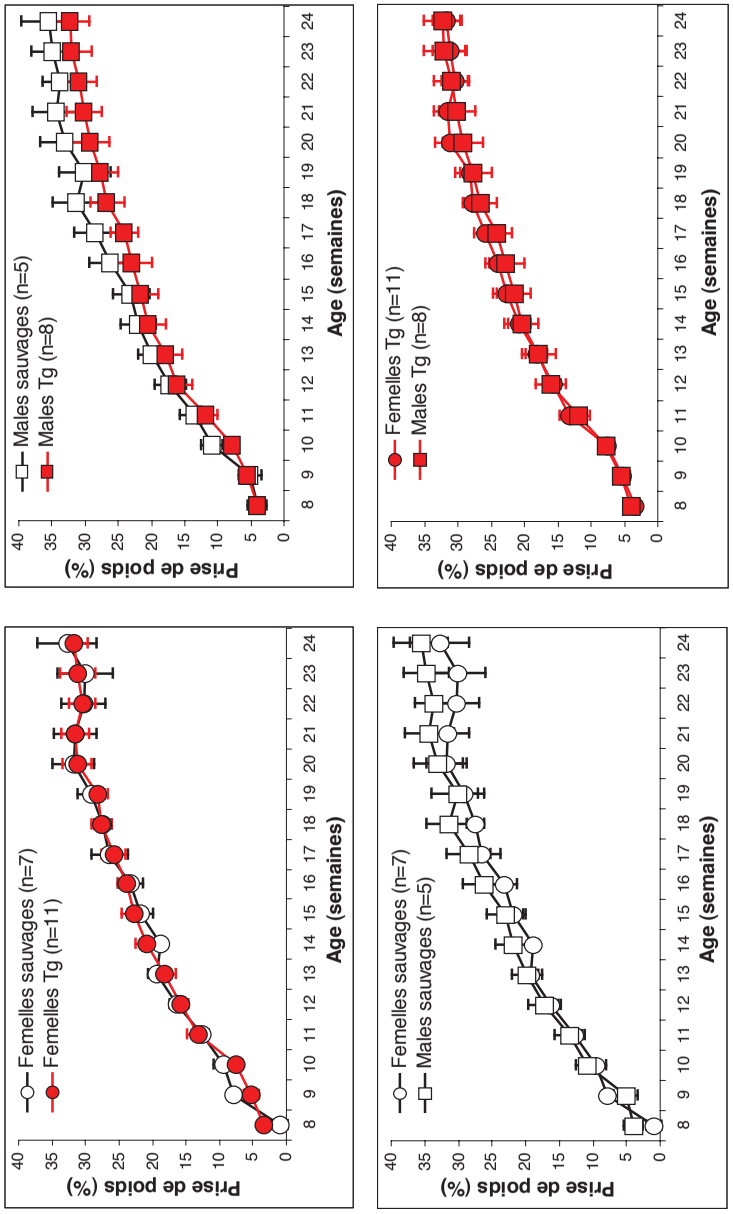


Figure 2

2 -Exploration fonctionnelle de la motricité : tests moteurs

a) Exploration fonctionnelle au premier stade de développement : 8 semaines d'age

- ***Analyse de la coordination motrice et résistance à la fatigue : Rotarod, vitesse croissante de 4 à 40 rpm***

Valeurs absolues

	Femelles		Males	
	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
Temps max (sec)	79 ± 8	**88 ± 6**	76 ± 10	**90 ± 7**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

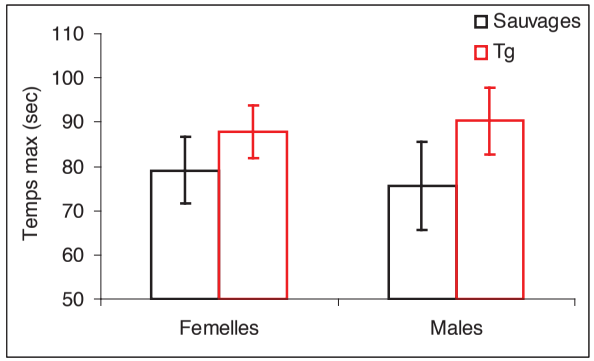


Tableau et figure 3 : Temps de maintien (Temps max) sur la barre en rotation observés sur le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 8 semaines. Les valeurs sont exprimées en secondes (sec). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs et n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris transgéniques *versus* souris sauvages

	Femelles		Males	
	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
Temps max (% sauvages)	100 ± 10	**111 ± 7**	100 ± 13	**119 ± 10**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

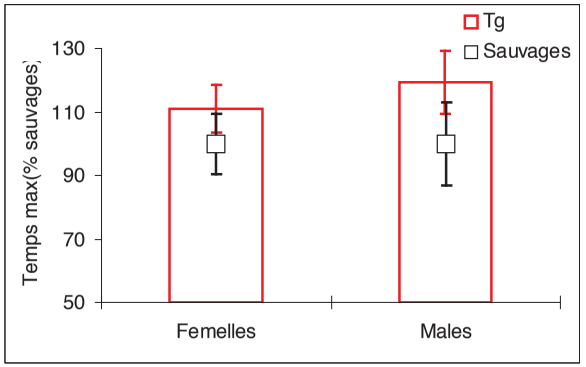


Tableau et figure 4 : Temps de maintien (Temps max) sur la barre en rotation observés sur le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 8 semaines. Les valeurs sont exprimées en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs et n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris femelles *versus* souris males

	Sauvages		Tg	
	Femelles	**Males**	**Femelles**	**Males**
Temps max (% males)	105 ± 10	100 ± 13	**97 ± 7**	**100 ± 8**
n	*7*	*5*	***11***	***8***

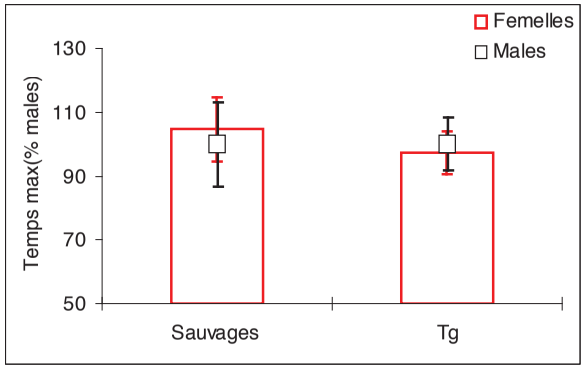


Tableau et figure 5 : Temps de maintien (Temps max) sur la barre en rotation observés sur le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 8 semaines. Les valeurs sont exprimées en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs et n représente le nombre d'animaux.

➢ ***Analyse de l'activité locomotrice horizontale et verticale : actimètre IR***

Valeurs absolues

	Femelles		Males	
	Sauvages	**Tg**	**Sauvages**	**Tg**
Activité horizontale				
Nb total de mvts	2824,6 ± 244,6	**2367,5 ± 163,9****	2739,0 ± 250,4	**2488,6 ± 180,1**
Nb mvts stéréotypés	117,7 ± 16,6	**110,9 ± 6,7§§**	126,8 ± 20,4	**141,1 ± 12,0**
Nb mvts associés à la locomotion	2706,9 ± 229,3	**2256,6 ± 158,6****	2612,2 ± 232,7	**2347,5 ± 173,9**
Vitesse max (cm/sec)	16,0 ± 1,3	**16,6 ± 1,4**	15,9 ± 1,6	**18,2 ± 2,7**
Distance parcourue (cm)	1950,4 ± 284,8	**1410,4 ± 151,8****	1752,6 ± 270,1	**1559,5 ± 173,0**
Activité verticale				
Nb de redressement	99,4 ± 12,0	**91,9 ± 8,3**	79,6 ± 12,8	**96,3 ± 11,1**
Durée moyenne (sec)	1,0 ± 0,0	**1,0 ± 0,1**	1,1 ± 0,1	**1,1 ± 0,1**
Temps de repos (%)	51,1 ± 5,5	**61,9 ± 3,2****	52,6 ± 5,2	**57,8 ± 3,9**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

Tableau 6 : Analyse de paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 8 semaines. Les résultats sont exprimées en valeurs absolues. L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs. ** indique une différence significative à 10 % avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle), §§ indique une différence à 10 % avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux. Abréviations : Nb = Nombre ; mvts : mouvements.

	Femelles		Males	
Temps (min)	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	239,6 ± 20,2	188,3 ± 19,7	219,0 ± 12,2	176,8 ± 23,8
2	428,0 ± 40,9	361,7 ± 31,6	378,0 ± 33,8	310,1 ± 43,9
3	607,9 ± 63,6	512,9 ± 42,8	543,2 ± 50,9	453,3 ± 57,8
4	778,4 ± 78,6	654,7 ± 48,9	712,4 ± 78,3	593,1 ± 66,7
5	951,3 ± 95,7	823,2 ± 57,1	895,0 ± 97,0	739,6 ± 76,4
6	1097,4 ± 122,8	971,8 ± 60,1	1079,4 ± 111,6	903,6 ± 78,4
7	1287,1 ± 138,2	1125,6 ± 69,6	1249,0 ± 132,7	1064,0 ± 89,4
8	1438,4 ± 164,0	1283,6 ± 81,0	1417,2 ± 147,2	1221,5 ± 101,2
9	1616,1 ± 169,0	1435,3 ± 91,0	1591,2 ± 158,8	1382,5 ± 111,2
10	1810,9 ± 171,1	1586,5 ± 99,8	1770,8 ± 164,2	1516,0 ± 126,9
11	1985,3 ± 192,8	1702,0 ± 107,8	1946,6 ± 180,4	1695,1 ± 138,2
12	2158,0 ± 210,1	1841,4 ± 123,4	2121,8 ± 196,6	1864,3 ± 149,5
13	2344,9 ± 219,7	1981,1 ± 134,9	2291,2 ± 208,3	2033,0 ± 162,0
14	2514,6 ± 220,9	2114,4 ± 148,5**	2444,2 ± 215,1	2177,4 ± 164,3
15	2706,9 ± 229,3	2256,6 ± 158,6*	2612,2 ± 232,7	2347,5 ± 173,9
n	*7*	*11*	*5*	*8*

Tableau et figure 7 (voir page suivante) : Evolution de nombre de mouvements associés à la locomotion horizontale déterminés au cours d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 8 semaines. Les résultats sont exprimés en valeur absolue. L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à mesures répétées à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * et ** indiquent une différence significative à 5 et 10 % respectivement avec le groupe sauvage. n représente le nombre d'animaux.

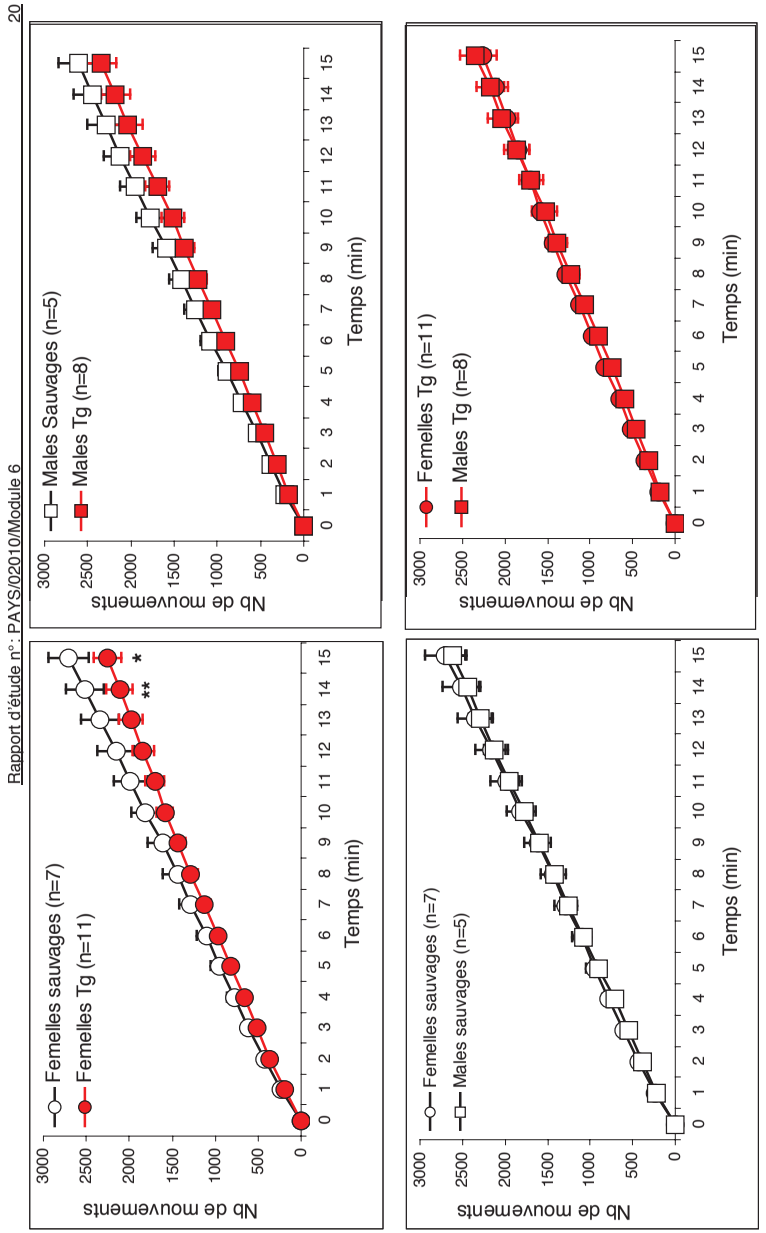


Figure 7

Comparaison souris transgéniques *versus* souris sauvages

	Femelles		Males	
	Sauvages	**Tg**	**Sauvages**	**Tg**
Activité horizontale				
Nb total de mvts	100,0 ± 8,7	**83,8 ± 5,8****	100,0 ± 9,1	**90,9 ± 6,6**
Nb mvts stéréotypés	100,0 ± 14,1	**94,2 ± 5,7**	100,0 ± 16,1	**111,3 ± 9,4**
Nb mvts associés à la locomotion	100,0 ± 8,5	**83,4 ± 5,9****	100,0 ± 8,9	**89,9 ± 6,7**
Vitesse max	100,0 ± 8,3	**103,8 ± 8,8**	100,0 ± 10,1	**114,2 ± 16,9**
Distance parcourue	100,0 ± 14,6	**72,3 ± 7,8****	100,0 ± 15,4	**89,0 ± 9,9**
Activité verticale				
Nb de redressement	100,0 ± 12,1	**92,4 ± 8,4**	100,0 ± 16,1	**120,9 ± 13,9**
Durée moyenne	100,0 ± 3,4	**103,7 ± 5,5**	100,0 ± 5,9	**94,5 ± 6,5**
Temps de repos	100,0 ± 10,8	**121,0 ± 6,2****	100,0 ± 9,8	**110,0 ± 7,4**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

Tableau et figure 8 (voir page suivante) : Analyse des paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 8 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs. ** indique une différence significative à 10 % avec le groupe sauvage et n représente le nombre d'animaux. Abréviations : Nb = Nombre ; mvts : mouvements.

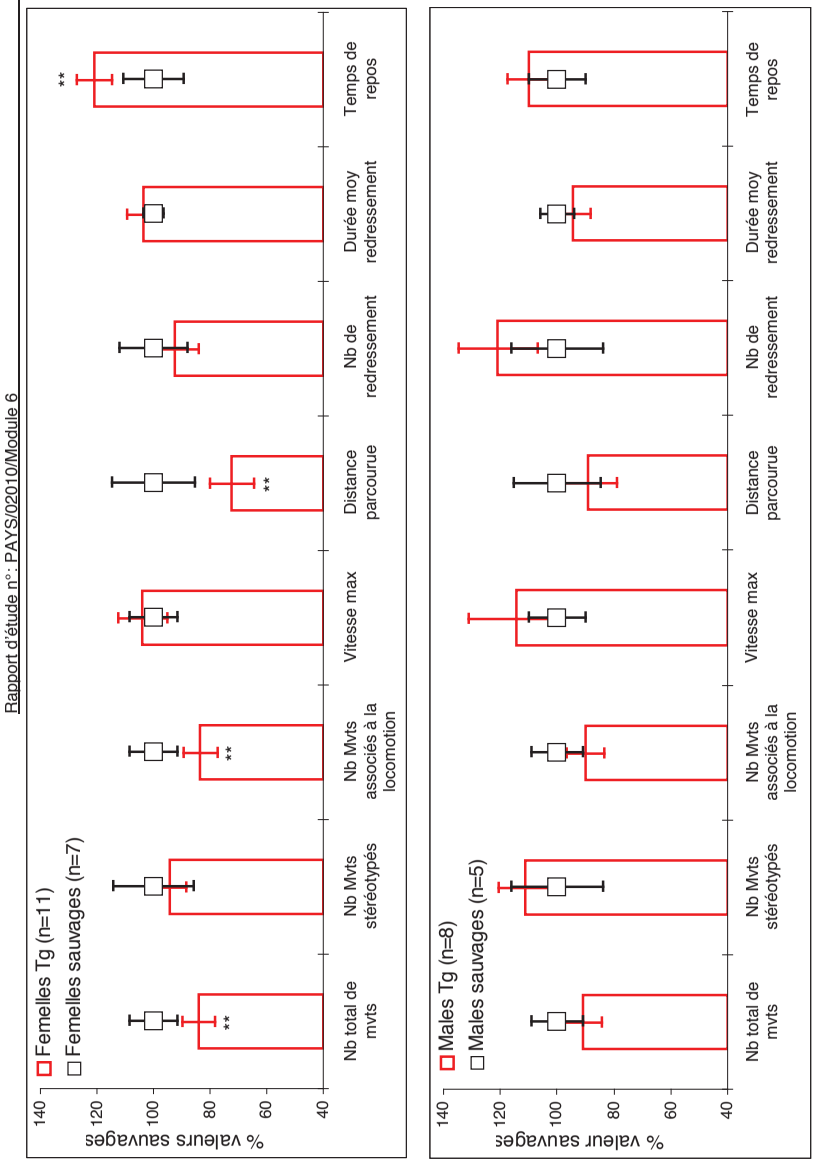


Figure 8

Comparaison souris femelles *versus* souris males

	Sauvages		Tg	
	Femelles	**Males**	**Femelles**	**Males**
Activité horizontale				
Nb total de mvts	103,1 ± 8,9	100,0 ± 9,1	**95,1 ± 6,6**	**100,0 ± 7,2**
Nb mvts stéréotypés	92,8 ± 13,1	100,0 ± 16,1	**78,6 ± 4,7§§**	**100,0 ± 8,5**
Nb mvts associés à la locomotion	103,6 ± 8,8	100,0 ± 8,9	**96,1 ± 6,8**	**100,0 ± 7,4**
Vitesse max	100,4 ± 8,4	100,0 ± 10,1	**91,3 ± 7,7**	**100,0 ± 14,8**
Distance parcourue	111,3 ± 16,2	100,0 ± 15,4	**90,4 ± 9,7**	**100,0 ± 11,1**
Activité verticale				
Nb de redressement	124,9 ± 15,1	100,0 ± 16,1	**95,5 ± 8,6**	**100,0 ± 11,5**
Durée moyenne	88,3 ± 3,0	100,0 ± 5,9	**96,8 ± 5,2**	**100,0 ± 6,8**
Temps de repos	97,2 ± 10,5	100,0 ± 9,8	**106,9 ± 5,5**	**100,0 ± 6,7**
n	*7*	*5*	***11***	***8***

Tableau et figure 9 (voir page suivante) : Analyse de paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 8 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe male du même génotype (sauvage ou trasngénique). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs. §§ indique une différence à 10 % avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg) et n représente le nombre d'animaux. Abréviations : Nb = Nombre ; mvts : mouvements.

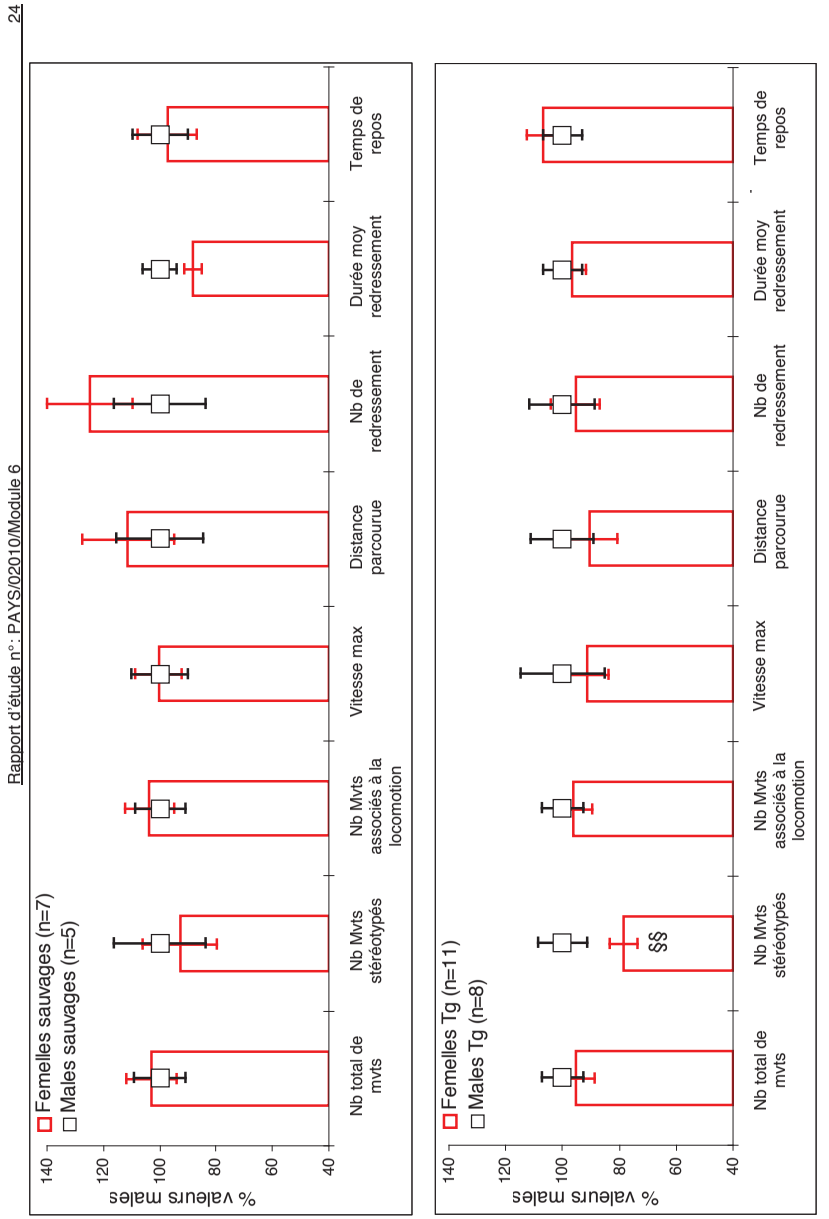


Figure 9

➢ ***Analyse de la force d'agrippement : Grip test***

Valeurs absolues

	Femelles		Males	
	Sauvages	**Tg**	**Sauvages**	**Tg**
Poids (g)	18,23 ± 0,40§	**20,42 ± 0,40 *§**	23,28 ± 0,49	**24,42 ± 0,54**
Pattes avant				
g	100,06 ± 6,43	**108,34 ± 5,61**	115,32 ± 10,57	**118,77 ± 6,41**
g/g	5,50 ± 0,37	**5,29 ± 0,22**	4,93 ± 0,36	**4,88 ± 0,29**
4 pattes				
g	155,57 ± 8,08	**165,21 ± 6,95**	169,59 ± 4,70	**169,64 ± 5,48**
g/g	8,54 ± 0,43§	**8,08 ± 0,29 §**	7,30 ± 0,26	**6,96 ± 0,22**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

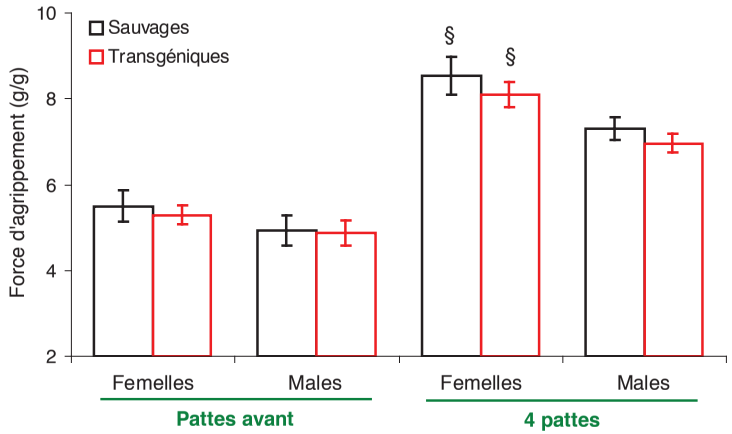


Tableau et figure 10 : Analyse du poids et des forces d'agrippement développées par les souris de 8 semaines des différents lots. Les résultats sont exprimés en valeur absolue (g ou g/g). La figure 10 représente uniquement les valeurs de force d'agrippement en g/g obtenues pour chacun des groupes. L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * indique une différence significative à 5% avec le groupe sauvage du même sexe. § indique une différence significative à 5% avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris transgéniques *versus* souris sauvages

	Femelles		Males	
	Sauvages	**Tg**	**Sauvages**	**Tg**
Pattes avant				
%	100,0 ± 6,7	**96,2 ± 4,0**	100,0 ± 7,3	**98,9 ± 5,8**
4 pattes				
%	100,0 ± 5,1	**94,6 ± 3,4**	100,0 ± 3,5	**95,3 ± 3,0**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

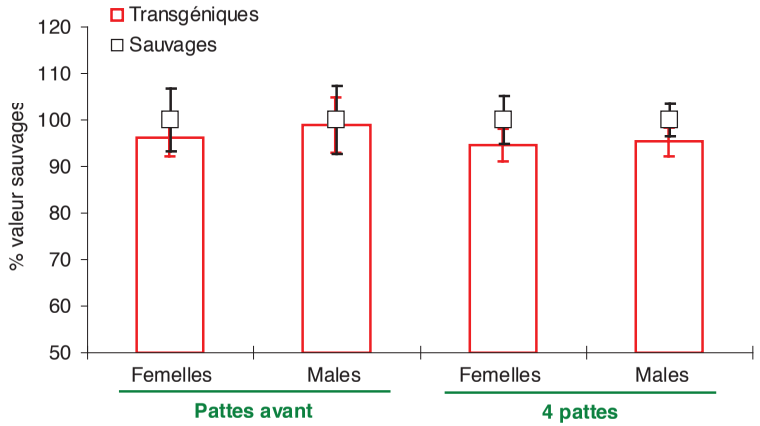


Tableau et figure 11 : Analyse des forces d'agrippement normalisées développées par les souris de 8 semaines. Les résultats sont exprimées en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs et n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris femelles *versus* souris males

	Sauvages		Tg	
	Femelles	**Males**	**Femelles**	**Males**
Pattes avant				
%	111,4 ± 7,4	100,0 ± 7,3	**108,4 ± 7,3**	**100,0 ± 5,9**
4 pattes				
%	117,0 ± 5,9 §	100,0 ± 3,5	**116,2 ± 4,2 §**	**100,0 ± 3,2**
n	*7*	*5*	***11***	***8***

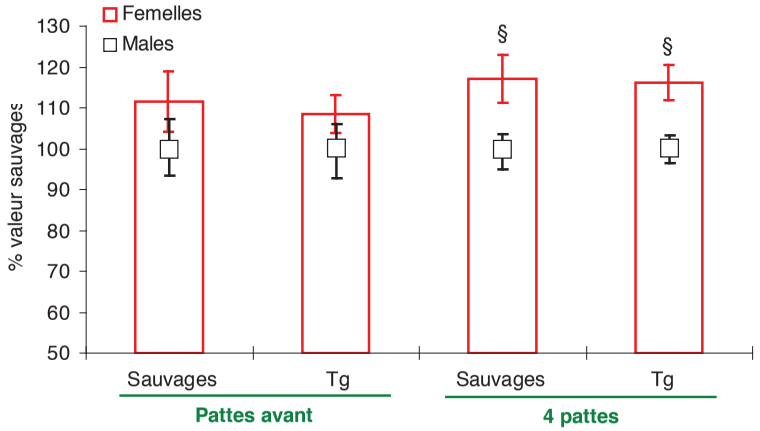


Tableau et figure 12 : Analyse des forces d'agrippement normalisées développées par les souris âgées de 8 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. § indique une différence significative à 5% avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux.

➢ ***Analyse de la force et de la résistance à la fatigue : Wire test***

Valeurs absolues

	Femelles		Males	
	Sauvages	**Tg**	**Sauvages**	**Tg**
Score	3,7 ± 0,5	**3,5 ± 0,3**	3,8 ± 0,4	**3,8 ± 0,5**
Temps max (sec)	196,1 ± 27,6	**255,5 ± 13,9****	251,0 ± 32,5	**237,0 ± 32,2**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

Tableau 13 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) déterminés pour des animaux de 8 semaines au cours du Wire Test. Les résultats sont exprimés en valeur absolue. L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs. ** indique une différence significative à 10 % avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle) et n représente le nombre d'animaux.

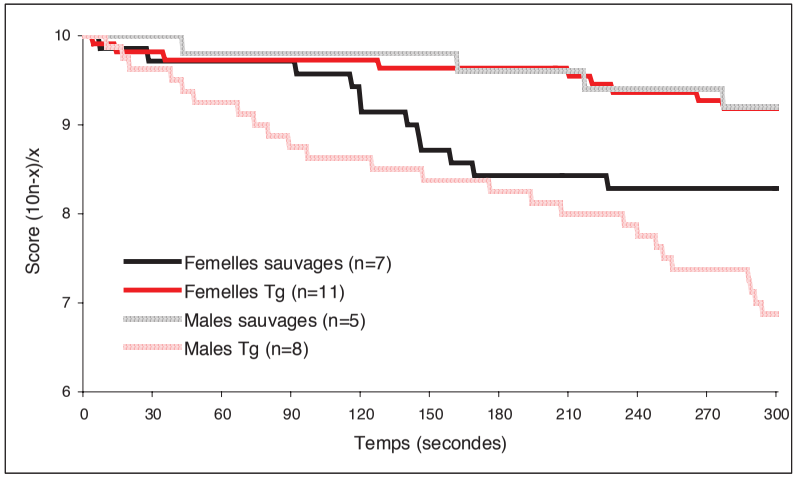


Figure 13 : Evolution du score lors de l'analyse de la répartition des chutes au cours des 300 secondes de test pour des animaux de 8 semaines. n représente le nombre d'animaux.

	Femelles		Males	
Temps (sec)	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
60	9,7 ± 0,2	9,7 ± 0,1	9,8 ± 0,2	9,3 ± 0,3
120	9,1 ± 0,5	9,7 ± 0,1	9,8 ± 0,2	8,6 ± 0,8
180	8,4 ± 0,6	9,6 ± 0,2	9,6 ± 0,2	8,3 ± 1,0
240	8,3 ± 0,6	9,4 ± 0,2	9,4 ± 0,4	7,8 ± 1,3
300	8,3 ± 0,6	9,2 ± 0,2 §	9,2 ± 0,5	6,9 ± 1,5 **
n	*7*	*11*	*5*	*8*

Tableau et figure 14 (voir page suivante) : Evolution de la moyenne des scores calculée toutes les minutes au cours des 300 secondes du test pour des animaux de 8 semaines. les résultats sont exprimés en valeur absolue. L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à mesures répétées à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. ** indique une différence significative à 10 % avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). § indique une différence significative à 5 % avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg), et n représente le nombre d'animaux.

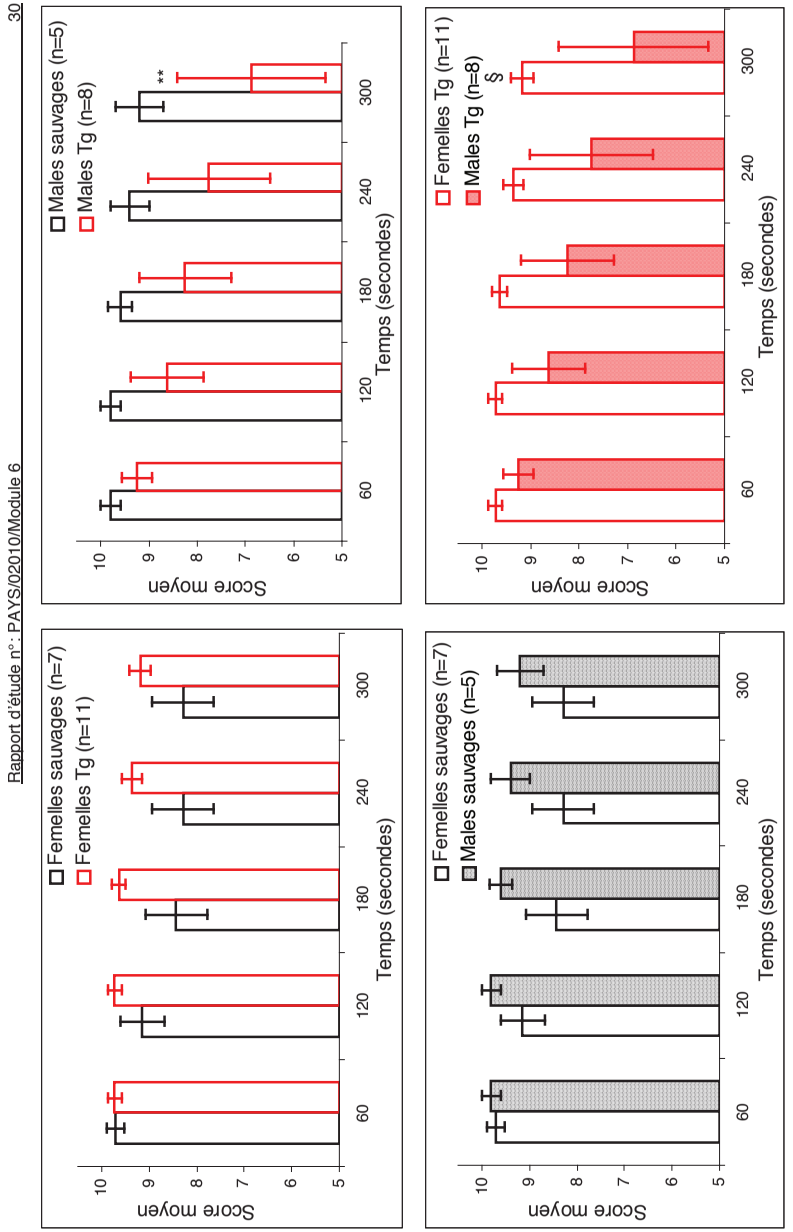


Figure 14

Comparaison souris transgéniques *versus* souris sauvages

	Femelles		Males	
	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
Score (%)	100 ± 14	**93 ± 9**	100 ± 11	**99 ± 13**
Temps max (%)	100 ± 14	**130 ± 7****	100 ± 13	**94 ± 13**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

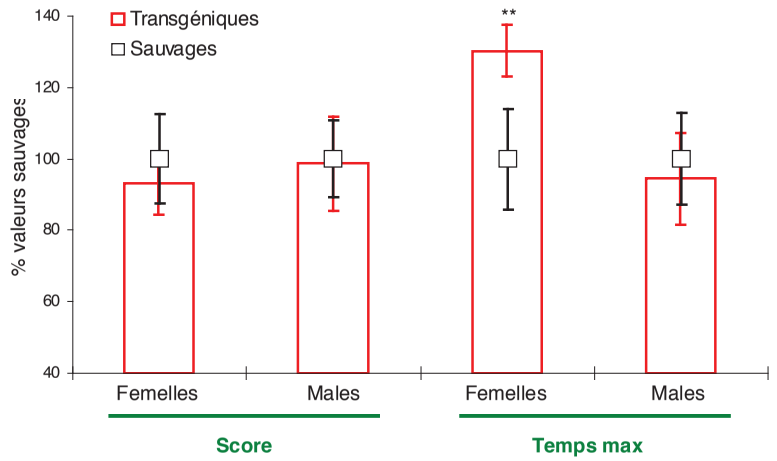


Tableau et figure 15 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) observée pour des animaux de 8 semaines au cours du Wire Test. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs. ** indique une différence significative à 10% avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle) et n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris femelles *versus* souris males

	Sauvages		Tg	
	Femelles	Males	Femelles	Males
Score (%)	98 ± 12	100 ± 11	**92 ± 9**	**100 ± 13**
Temps max (%)	78 ± 11	100 ± 13	**108 ± 6**	**100 ± 14**
n	*7*	*5*	***11***	***8***

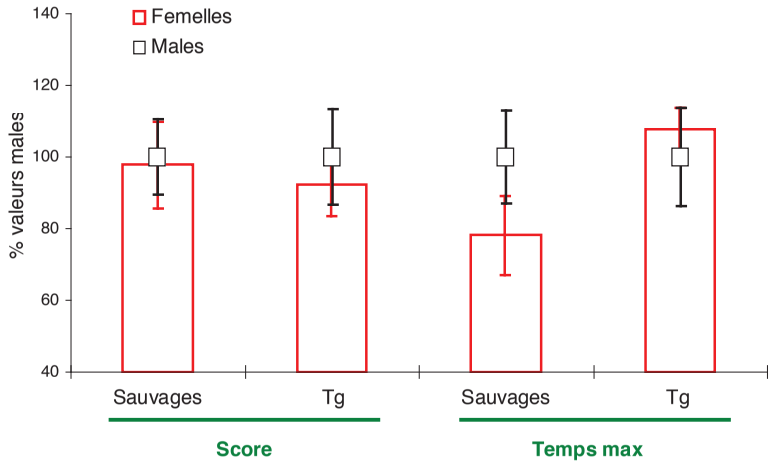


Tableau et figure 16 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) observés pour des animaux de 8 semaines au cours du Wire test. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs et n représente le nombre d'animaux.

b) Exploration fonctionnelle au deuxième stade de développement : 24 semaines d'age

➢ ***Analyse de la coordination motrice et résistance à la fatigue : Rotarod, vitesse croissante de 4 à 40 RPM***

Valeurs absolues

	Femelles		Males	
	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
Temps max (sec)	69 ± 11	**62 ± 5**	57 ± 9	**55 ± 4**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

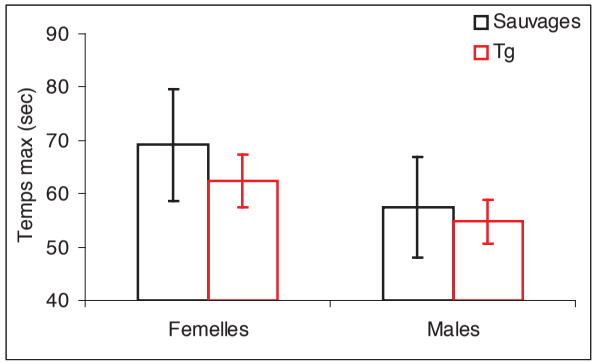


Tableau et figure 17 : Temps de maintien sur la barre en rotation observé pour le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en valeurs absolue (secondes). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs et n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris transgéniques *versus* souris sauvages

	Femelles		Males	
	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
Temps (% sauvages)	100,0 ± 15,2	**90,3 ± 7,1**	100,0 ± 16,4	**95,4 ± 7,4**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

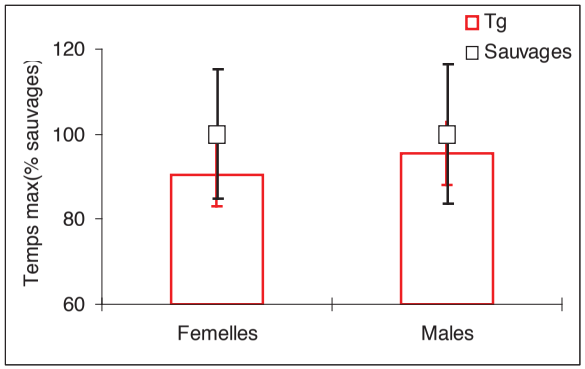


Tableau et figure 18 : Temps de maintien sur la barre en rotation observés sur le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs et n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris femelles *versus* souris males

	Sauvages		Tg	
	Femelles	**Males**	**Femelles**	**Males**
Temps (% males)	120,5 ± 18,3	100,0 ± 16,4	**114,1 ± 9,0**	**100,0 ± 7,7**
n	*7*	*5*	***11***	***8***

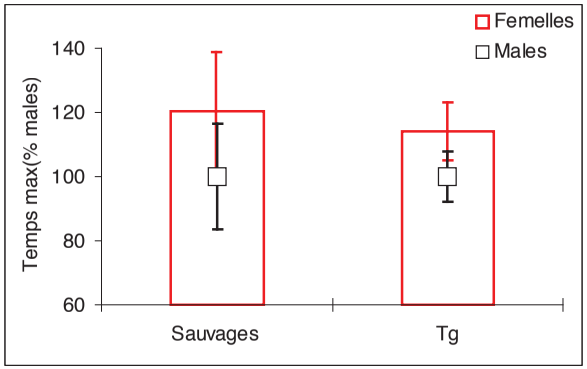


Tableau et figure 19 : Temps de maintien sur la barre en rotation observés sur le Rotarod en mode accéléré pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs et n représente le nombre d'animaux.

➢ ***Analyse de l'activité locomotrice horizontale et verticale : actimètre IR***

Valeurs absolues

	Femelles		Males	
	Sauvages	**Tg**	**Sauvages**	**Tg**
Activité horizontale				
Nb total de mvts	2730,1 ± 289,1	**2098,9 ± 173,5 ***	2530,4 ± 168,9	**2236,5 ± 218,7**
Nb mvts stéréotypés	125,3 ± 13,5	**92,0 ± 9,7 ***	137,2 ± 16,5	**109,3 ± 7,6**
Nb mvts liés à la locomotion	2604,9 ± 275,9	**2006,9 ± 166,1 ***	2393,2 ± 155,8	**2127,3 ± 214,8**
Vitesse max (cm/sec)	15,4 ± 1,6	**14,8 ± 0,8**	16,1 ± 1,8	**15,9 ± 1,7**
Distance parcourue (cm)	1695,3 ± 278,6	**1074,0 ± 119,7 ***	1409,3 ± 155,4	**1259,0 ± 196,2**
Activité verticale				
Nb de redressement	66,9 ± 14,0	**62,7 ± 7,7**	77,2 ± 10,2	**82,9 ± 11,0**
Durée moyenne (sec)	1,0 ± 0,0	**1,0 ± 0,0**	1,1 ± 0,0	**1,1 ± 0,0**
Temps de repos (%)	55,3 ± 5,7	**69,4 ± 2,9 ***	59,6 ± 3,2	**64,8 ± 4,2**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

Tableau 20 : Analyse de paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimée en valeur absolue. L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * indique une différence significative à 5% avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). n représente le nombre d'animaux. Abréviations : Nb = Nombre ; mvts : mouvements.

	Femelles		Males	
Temps (min)	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	213,0 ± 25,7	171,5 ± 21,5	217,8 ± 23,1	192,4 ± 12,8
2	377,0 ± 49,8	286,6 ± 34,8	325,2 ± 44,6	287,9 ± 29,8
3	518,4 ± 70,3	384,5 ± 48,6	450,4 ± 58,1	410,9 ± 38,4
4	672,0 ± 86,0	484,4 ± 60,4	582,4 ± 70,3	512,6 ± 56,3
5	836,7 ± 108,3	605,2 ± 68,2	740,6 ± 91,2	615,6 ± 67,5
6	996,6 ± 130,5	730,3 ± 77,3	909,2 ± 100,4	764,8 ± 73,4
7	1177,9 ± 151,9	859,9 ± 86,9	1052,8 ± 99,2	883,3 ± 95,7
8	1369,3 ± 170,4	1000,5 ± 98,5 **	1208,8 ± 99,8	1041,9 ± 116,3
9	1522,6 ± 185,1	1153,5 ± 107,4 **	1377,6 ± 114,6	1191,3 ± 134,3
10	1687,3 ± 200,7	1297,5 ± 118,1 *	1542,4 ± 134,7	1336,4 ± 149,9
11	1860,6 ± 222,4	1432,3 ± 126,2 *	1728,8 ± 136,0	1510,3 ± 158,0
12	2021,6 ± 234,6	1571,1 ± 141,4 *	1887,2 ± 129,4	1682,6 ± 171,5
13	2200,7 ± 239,0	1717,9 ± 147,7 *	2036,6 ± 144,0	1841,5 ± 183,3
14	2414,3 ± 251,0	1847,3 ± 156,0 *	2221,8 ± 146,8	1996,5 ± 197,9
15	2604,9 ± 275,9	2006,9 ± 166,1 *	2393,2 ± 155,8	2127,3 ± 214,8
n	*7*	*11*	*5*	*8*

Tableau et figure 21 (voir page suivante) : Evolution de nombre de mouvements associés à la locomotion horizontale déterminés au cours d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en valeurs absolue. L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à mesures répétées à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * et ** indiquent une différence significative à 5 et 10 % respectivement avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). n représente le nombre d'animaux.

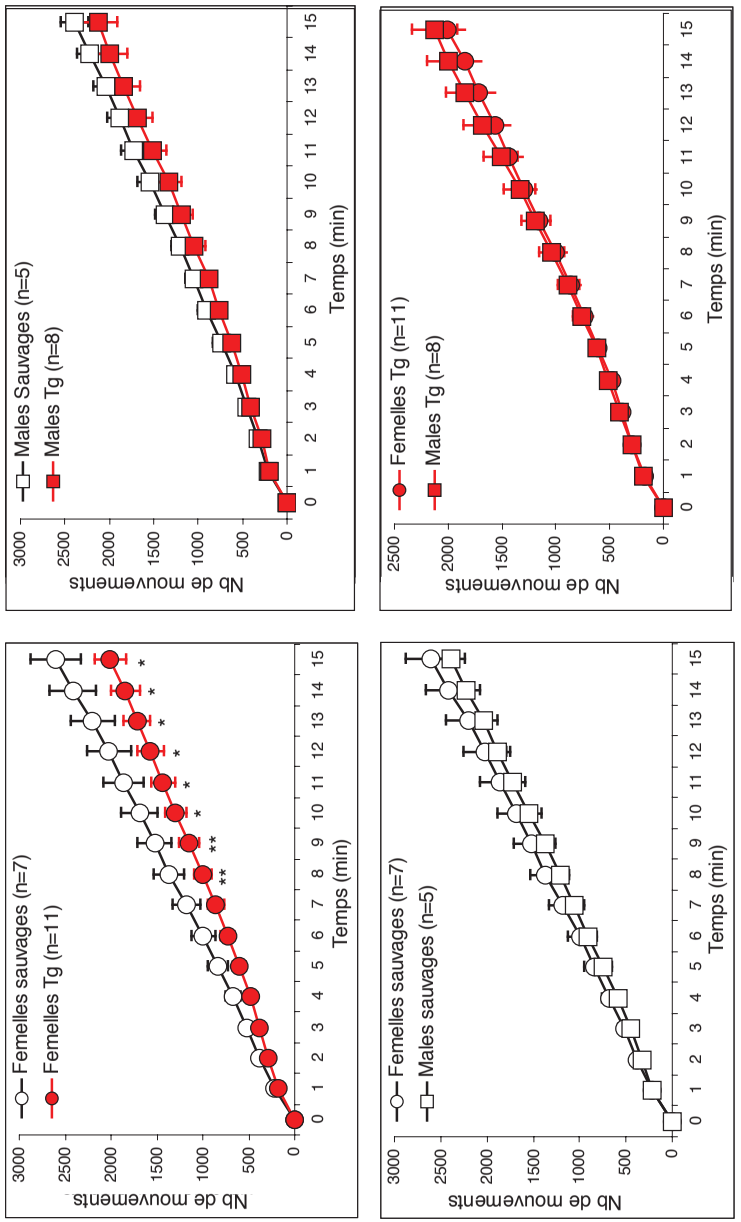
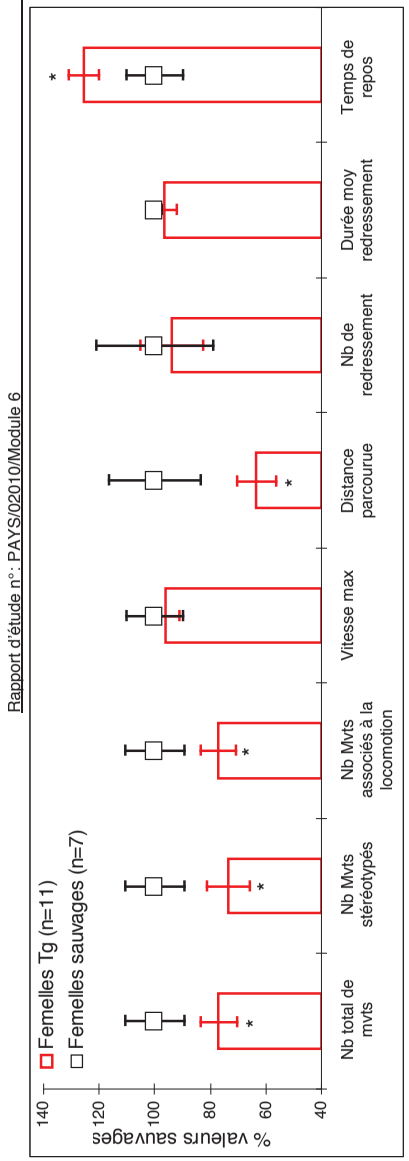


Figure 21

Comparaison souris transgéniques *versus* souris sauvages

	Femelles		Males	
	Sauvages	**Tg**	**Sauvages**	**Tg**
Activité horizontale				
Nb total de mvts	100,0 ± 10,6	**76,9 ± 6,4 ***	100,0 ± 6,7	**88,4 ± 8,6**
Nb mvts stéréotypés	100,0 ± 10,8	**73,4 ± 7,7 ***	100,0 ± 12,1	**79,6 ± 5,5**
Nb mvts associés à la locomotion	100,0 ± 10,6	**77,0 ± 6,4 ***	100,0 ± 6,5	**88,9 ± 9,0**
Vitesse max de déplacement	100,0 ± 10,2	**96,2 ± 4,9**	100,0 ± 10,9	**98,3 ± 10,5**
Distance parcourue	100,0 ± 16,4	**63,4 ± 7,1 ***	100,0 ± 11,0	**89,3 ± 13,9**
Activité verticale				
Nb de redressement	100,0 ± 20,9	**93,8 ± 11,5**	100,0 ± 13,2	**107,4 ± 14,3**
Durée moyenne	100,0 ± 2,8	**96,4 ± 4,2**	100,0 ± 2,8	**97,9 ± 3,4**
Temps de repos	100,0 ± 10,2	**125,5 ± 5,3 ***	100,0 ± 5,3	**108,7 ± 7,1**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

Tableau et figure 22 (voir page suivante) : Analyse des paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * indique une différence significative à 5 % avec le groupe sauvage du même sexe (femelle ou male). représente le nombre d'animaux. Abréviations : Nb = Nombre ; mvts : mouvements.



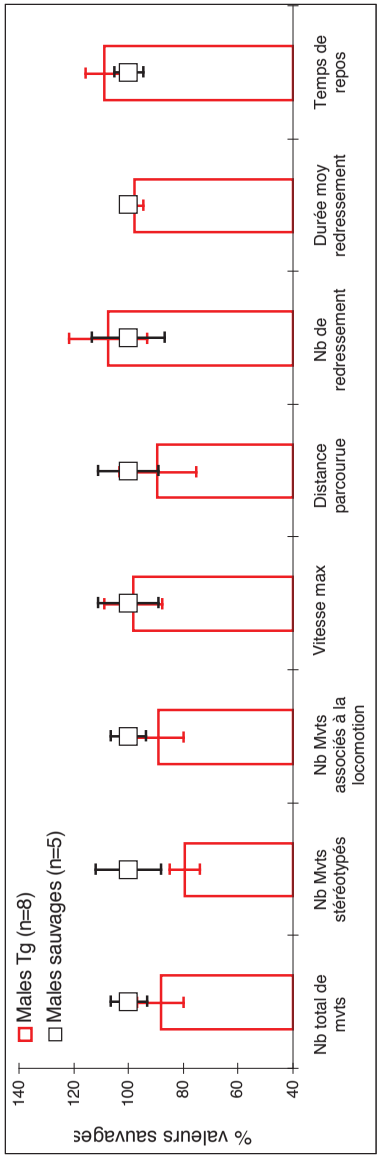


Figure 22

Comparaison souris femelles *versus* souris males

	Sauvages		Tg	
	Femelles	**Males**	**Femelles**	**Males**
Activité horizontale				
Nb total de mvts	107,9 ± 11,4	100,0 ± 6,7	**93,8 ± 7,8**	**100,0 ± 9,8**
Nb mvts stéréotypés	91,3 ± 9,8	100,0 ± 12,1	**84,2 ± 8,9**	**100,0 ± 7,0**
Nb mvts associés à la locomotion	108,8 ± 11,5	100,0 ± 6,5	**94,3 ± 7,8**	**100,0 ± 10,1**
Vitesse max de déplacement	95,3 ± 9,7	100,0 ± 10,9	**93,3 ± 4,8**	**100,0 ± 10,6**
Distance parcourue	120,3 ± 19,8	100,0 ± 11,0	**85,3 ± 9,5**	**100,0 ± 15,6**
Activité verticale				
Nb de redressement	86,6 ± 18,1	100,0 ± 13,2	**75,7 ± 9,2**	**100,0 ± 13,3**
Durée moyenne	91,9 ± 2,5	100,0 ± 2,8	**90,5 ± 3,9 §§**	**100,0 ± 3,5**
Temps de repos	92,7 ± 9,5	100,0 ± 5,3	**107,1 ± 4,5**	**100,0 ± 6,5**
n	*7*	*5*	***11***	***8***

Tableau et figure 23 (voir page suivante) : Analyse des paramètres de l'activité horizontale et verticale déterminés au terme d'une séance de 15 minutes d'enregistrement pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. §§ indique une différence significative à 10 % avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux. Abréviations : Nb = Nombre ; mvts : mouvements.

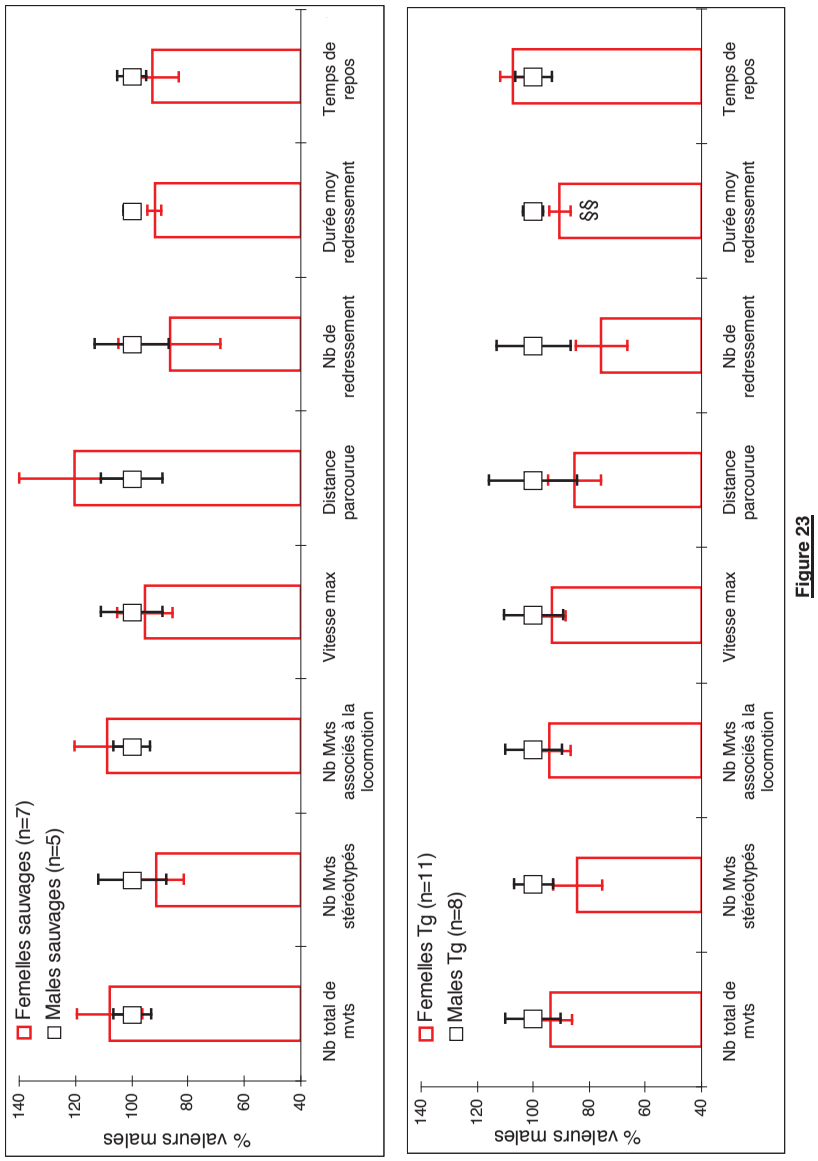


Figure 23

➢ ***Analyse de la force d'agrippement : Grip test***

Valeurs absolues

	Femelles		Males	
	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
Poids (g)	23,79 ± 1,47 §	**25,27 ± 0,58 §**	31,56 ± 0,84	**30,76 ± 1,60**
Pattes avant				
g	103,13 ± 2,94 §	**120,11 ± 5,08 ***	123,49 ± 5,53	**120,15 ± 7,12**
g/g	4,43 ± 0,30	**4,74 ± 0,14 §**	3,92 ± 0,16	**4,01 ± 0,37**
4 pattes				
g	188,52 ± 5,05 §	**199,14 ± 9,21**	223,46 ± 7,30	**208,70 ± 9,03**
g/g	8,03 ± 0,34	**7,90 ± 0,35 §**	7,09 ± 0,22	**6,89 ± 0,41**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

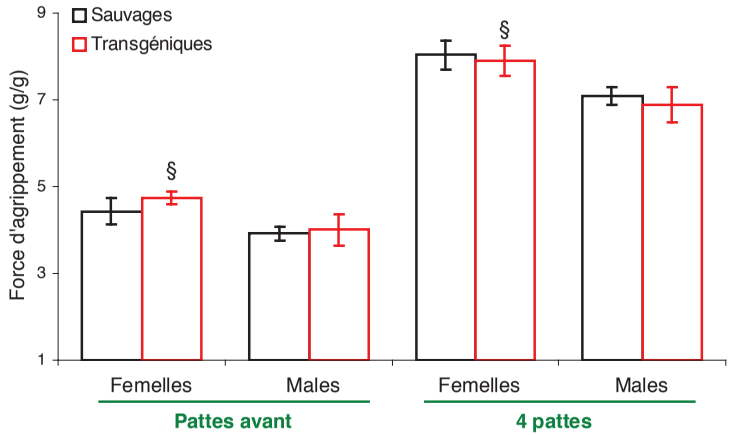


Tableau et figure 24 : Analyse du poids et des forces d'agrippement développées par les souris de 24 semaines des différents lots. Les résultats sont exprimés en valeur absolue (g ou g/g). La figure 26 représente uniquement les valeurs de force d'agrippement en g/g obtenues pour chacun des groupes. L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * indique une différence significative à 5% avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle), § indique une différence significative à 5% avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris transgéniques *versus* souris sauvages

	Femelles		Males	
	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
Pattes avant				
%	100,0 ± 6,7	**107,0 ± 3,2**	100,0 ± 4,1	**102,3 ± 9,4**
4 pattes				
%	100,0 ± 4,2	**98,3 ± 4,4**	100,0 ± 3,0	**97,2 ± 5,8**
n	*7*	***11***	*5*	***8***

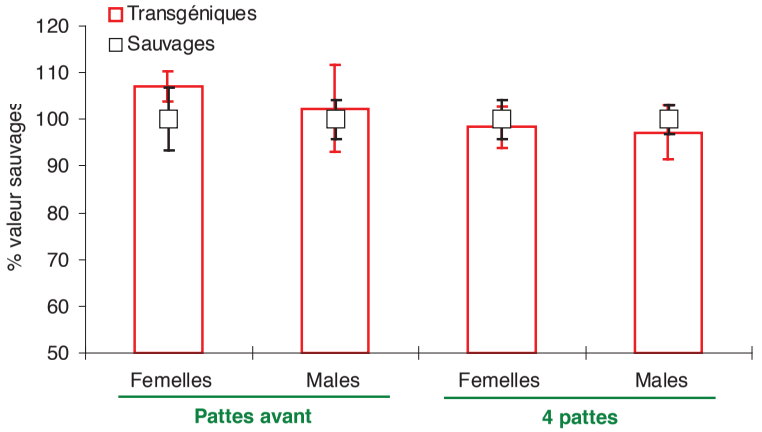


Tableau et figure 25 : Analyse des forces d'agrippement normalisées développées par les souris de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs et n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris femelles *versus* souris males

	Sauvages		Tg	
	Femelles	**Males**	**Femelles**	**Males**
Pattes avant				
%	113,2 ± 7,6	100,0 ± 4,1	**118,4 ± 3,6 §**	**100,0 ± 9,2**
4 pattes				
%	113,3 ± 4,7	100,0 ± 3,0	**114,7 ± 5,1 §**	**100,0 ± 6,0**
n	*7*	*5*	***11***	***8***

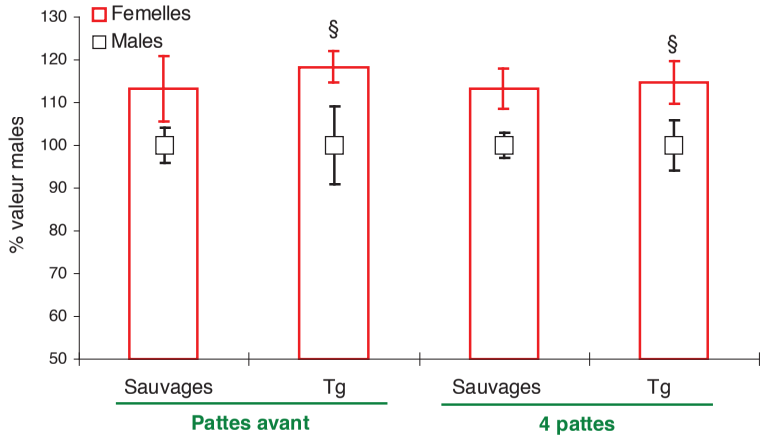


Tableau et figure 26 : Analyse des forces d'agrippement normalisées développées par les souris âgées de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe male du même génotype (sauvage ou Tgs). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. § indique une différence significative à 5% avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux.

➢ ***Analyse de la force et de la résistance à la fatigue : Wire test***

Valeurs absolues

	Femelles		Males	
	Sauvages	**Tg**	**Sauvages**	**Tg**
Score	2,4 ± 0,5	**2,0 ± 0,3 §**	1,9 ± 0,3	**3,4 ± 0,5 ***
Temps max (sec)	140,3 ± 34,3	**134,5 ± 21**	70,0 ± 24,3	**128,3 ± 21,9 ***
n	*7*	***11***	*5*	***8***

Tableau 27 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) déterminés pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en valeur absolue. L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * indique une différence significative à 5% avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle) et § indique une différence significative à 5% avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux.

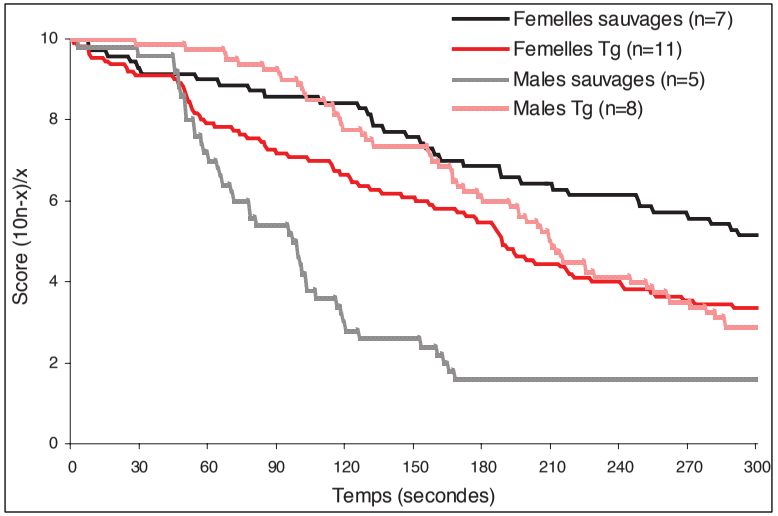


Figure 27 : Evolution du score lors de l'analyse de la répartition des chutes au cours des 300 secondes de test pour des animaux de 24 semaines. n représente le nombre d'animaux.

	Femelles		Males	
Temps (sec)	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
60	9,0 ± 0,5	7,9 ± 0,8	7,0 ± 0,7	9,8 ± 0,2
120	8,4 ± 0,9 §	6,6 ± 1,0	2,8 ± 1,7	7,8 ± 0,7 *
180	6,9 ± 1,2 §	5,5 ± 1,1	1,6 ± 1,6	6,0 ± 1,2 *
240	6,1 ± 1,1 §	4,0 ± 1,2	1,6 ± 1,6	4,1 ± 1,2
300	5,1 ± 1,2	3,4 ± 1,1	1,6 ± 1,6	2,9 ± 1,0
n	*7*	*11*	*5*	*8*

Tableau et figure 28 (voir page suivante) : Evolution de la moyenne des scores calculée toutes les minutes au cours des 300 secondes du test pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en valeur absolue. L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à mesures répétées à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * indique une différence significative à 5 % avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). § indique une différence significative à 5 % avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux.

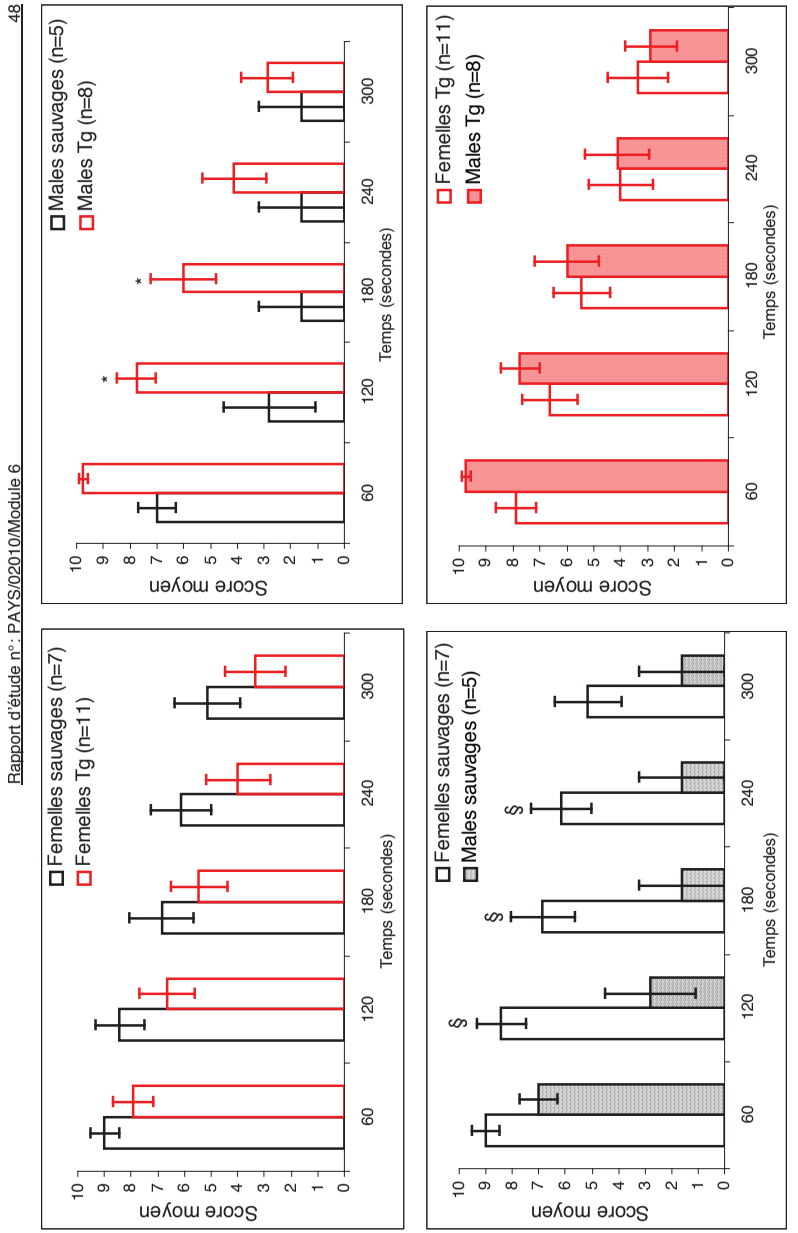


Figure 28

Comparaison souris transgéniques *versus* souris sauvages

	Femelles		Males	
	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
Score (%)	100 ± 22	**82 ± 14**	100 ± 15	**178 ± 25 ***
Temps max (%)	100 ± 24	**96 ± 15**	100 ± 35	**183 ± 31 ***
n	*7*	***11***	*5*	***8***

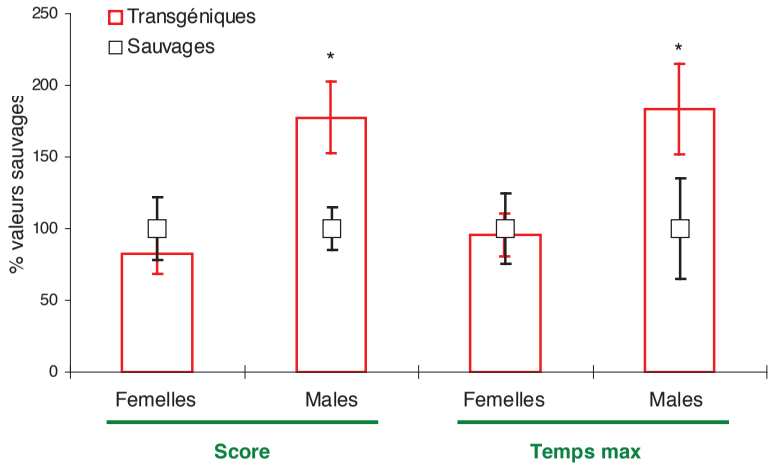


Tableau et figure 29 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) déterminés pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * indique une différence significative à 5% avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle) et n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris femelles *versus* souris males

	Sauvages		Tg	
	Femelles	Males	Femelles	Males
Score (%)	128 ± 28	100 ± 15	**59 ± 10 §**	**100 ± 14**
Temps max (%)	200 ± 49 §	100 ± 35	**105 ± 16**	**100 ± 17**
n	*7*	*5*	***11***	***8***

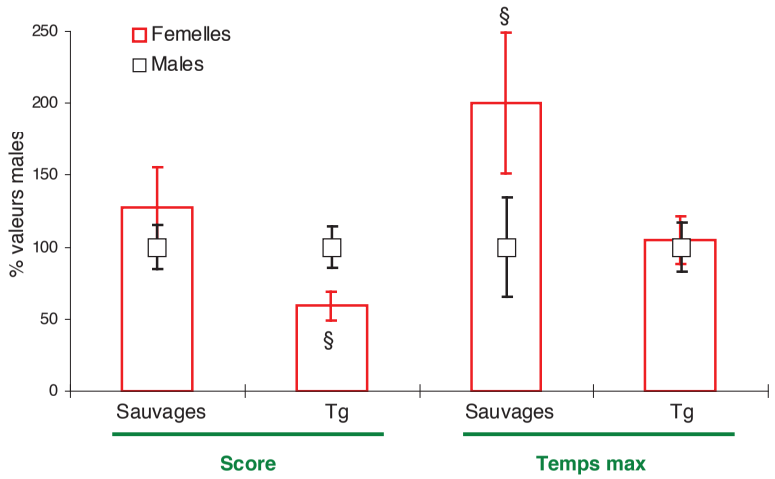


Tableau et figure 30 : Analyse de l'indice de comportement (Score) et du temps maximal de suspension à la barre (Temps max) déterminés pour des animaux de 24 semaines. Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. § indique une différence significative à 5 % avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux.

3 -Analyse du poids des organes et des muscles lors du sacrifice (24/25 semaines d'age)

	Femelles		Males	
	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
Poids souris (g)	23,85 ± 1,46 §	25,84 ± 0,49 §	31,00 ± 1,28	32,48 ± 3,03
Poids organes				
Foie				
mg	985,97 ± 55,88 §§	1019,54 ± 69,80 §§	1224,50 ± 103,95	1251,65 ± 104,49
mg/g	41,82 ± 2,80	39,59 ± 2,73	39,44 ± 2,81	38,69 ± 1,52
Rein				
mg	113,74 ± 4,15 §	139,85 ± 3,35 *§	173,82 ± 10,94	172,55 ± 15,20
mg/g	4,81 ± 0,17 §	5,42 ± 0,11 *	5,60 ± 0,20	5,33 ± 0,17
Poids muscles				
Cœur				
mg	105,44 ± 2,93 §	127,48 ± 3,14 *§	158,28 ± 17,66	162,78 ± 10,92
mg/g	4,47 ± 0,15	4,96 ± 0,19	5,10 ± 0,51	5,08 ± 0,35
Diaphragme				
mg	65,03 ± 4,71 §§	81,02 ± 2,73 *	78,06 ± 4,63	91,58 ± 6,93 **
mg/g	2,73 ± 0,12	3,13 ± 0,07 *§	2,52 ± 0,10	2,84 ± 0,11 *
TA				
mg	47,20 ± 1,84 §	50,22 ± 1,25 §	65,46 ± 1,72	67,04 ± 3,75
mg/g	2,00 ± 0,09	1,95 ± 0,05	2,12 ± 0,09	2,09 ± 0,10
Edl				
mg	11,36 ± 0,59 §	12,06 ± 0,41 §	15,00 ± 0,38	14,57 ± 1,26
mg/g	0,48 ± 0,03	0,47 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,45 ± 0,01
Soléaire				
mg	9,22 ± 0,50 §	9,94 ± 0,32 §	13,79 ± 0,40	13,71 ± 1,11
mg/g	0,39 ± 0,01 §	0,38 ± 0,01 §	0,45 ± 0,02	0,42 ± 0,01
n	*6*	*8*	*4*	*4*

Tableau 31 : Poids des animaux, organes et muscles déterminés lors du sacrifice des animaux (24/25 semaines d'age). Les poids des muscles et organes sont exprimés en mg puis normalisés par rapport aux poids des animaux (mg/g). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * et ** indiquent une différence significative à 5 et 10% respectivement avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle), § et §§ indiquent une différence significative à 5 et 10% avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux.

Comparaison souris transgéniques *versus* souris sauvages

	Femelles		Males	
	Sauvages	Tg	Sauvages	Tg
Poids souris	100,0 ± 6,1	108,3 ± 2,1	100,0 ± 4,1	104,7 ± 9,8
Poids organes				
Foie	100,0 ± 6,7	94,7 ± 6,5	100,0 ± 7,1	98,1 ± 3,8
Rein	100,0 ± 3,5	112,6 ± 2,2 *	100,0 ± 3,5	95,1 ± 3,0
Poids muscles				
Cœur	100,0 ± 3,5	111,0 ± 4,4	100,0 ± 10,0	99,5 ± 6,8
Diaphragme	100,0 ± 4,2	114,8 ± 2,6 *	100,0 ± 4,0	112,7 ± 4,3 *
TA	100,0 ± 4,4	97,4 ± 2,6	100,0 ± 4,2	98,4 ± 4,7
Edl	100,0 ± 5,4	97,1 ± 2,7	100,0 ± 3,5	92,5 ± 1,5
Soléaire	100,0 ± 2,6	99,3 ± 2,5	100,0 ± 3,7	94,9 ± 1,8
n	*6*	*8*	*4*	*4*

Tableau et figure 32 (voir page suivante) : Poids des animaux et poids normalisés des organes et muscles exprimés déterminés lors du sacrifice des animaux (24/25 semaines d'age). Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. * indique une différence significative à 5 % avec le groupe sauvage du même sexe (male ou femelle). n représente le nombre d'animaux.

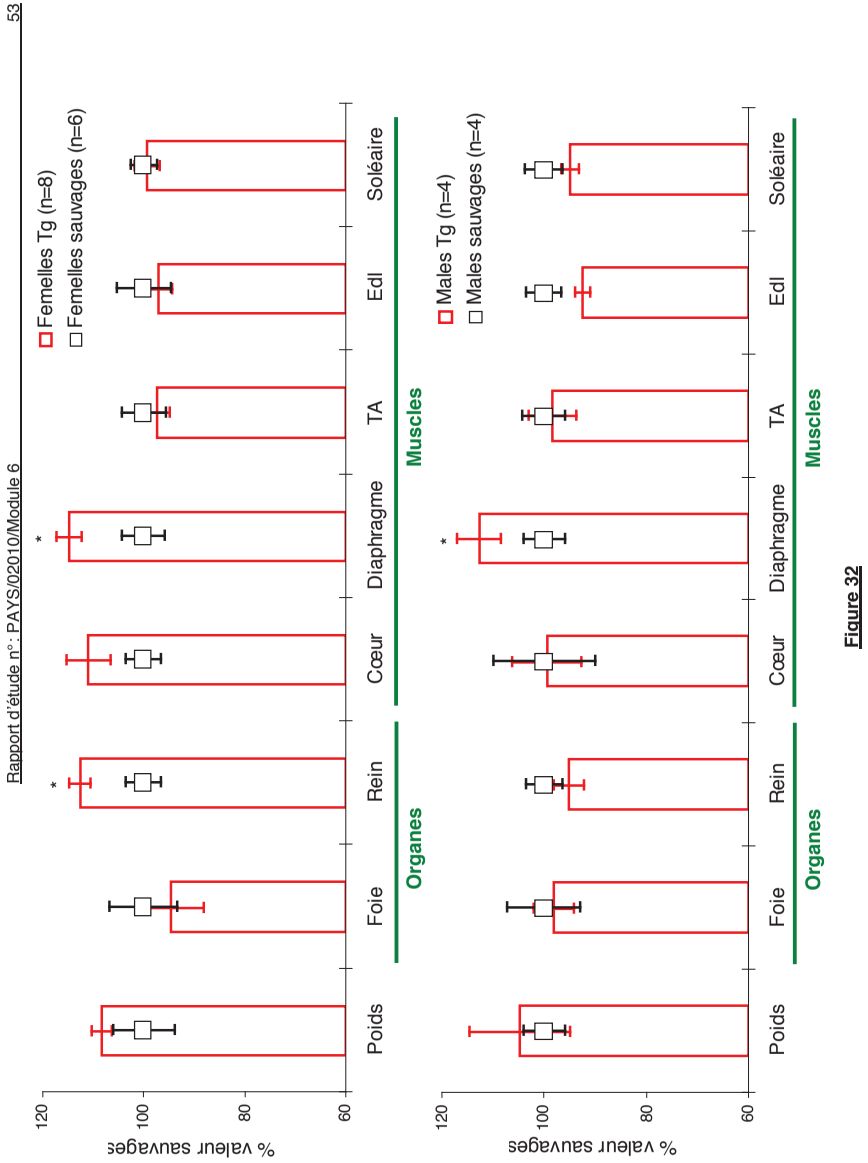


Figure 32

Comparaison souris femelles *versus* souris males

	Sauvages		Tg	
	Femelles	**Males**	**Femelles**	**Males**
Poids souris	76,9 ± 4,7 §	100,0 ± 4,1	**79,6 ± 1,5 §**	**100,0 ± 9,3**
Poids organes				
Foie	106,0 ± 7,1	100,0 ± 7,1	**102,3 ± 7,1**	**100,0 ± 3,9**
Rein	85,9 ± 3,0 §	100,0 ± 3,5	**101,7 ± 2,0**	**100,0 ± 3,1**
Poids muscles				
Cœur	87,5 ± 3,0	100,0 ± 10,0	**97,6 ± 3,8**	**100,0 ± 6,8**
Diaphragme	108,4 ± 4,6	100,0 ± 4,0	**110,4 ± 2,5 §§**	**100,0 ± 3,8**
TA	94,3 ± 4,2	100,0 ± 4,2	**93,3 ± 2,5**	**100,0 ± 4,7**
Edl	99,0 ± 5,4	100,0 ± 3,5	**103,9 ± 2,9**	**100,0 ± 1,6**
Soléaire	86,9 ± 2,2 §	100,0 ± 3,7	**90,8 ± 2,3 §**	**100,0 ± 1,9**
n	*6*	*4*	***8***	***4***

Tableau et figure 33 (voir page suivante) : Poids des animaux et poids normalisés des organes et muscles exprimés déterminés lors du sacrifice des animaux (24/25 semaines d'age). Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs obtenues pour le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). L'analyse statistique est réalisée par une analyse de variance à deux facteurs suivie du test post-hoc Holm-Sidack. § et §§ indiquent une différence significative à 5 et 10% respectivement avec le groupe male du même génotype (sauvage ou Tg). n représente le nombre d'animaux.

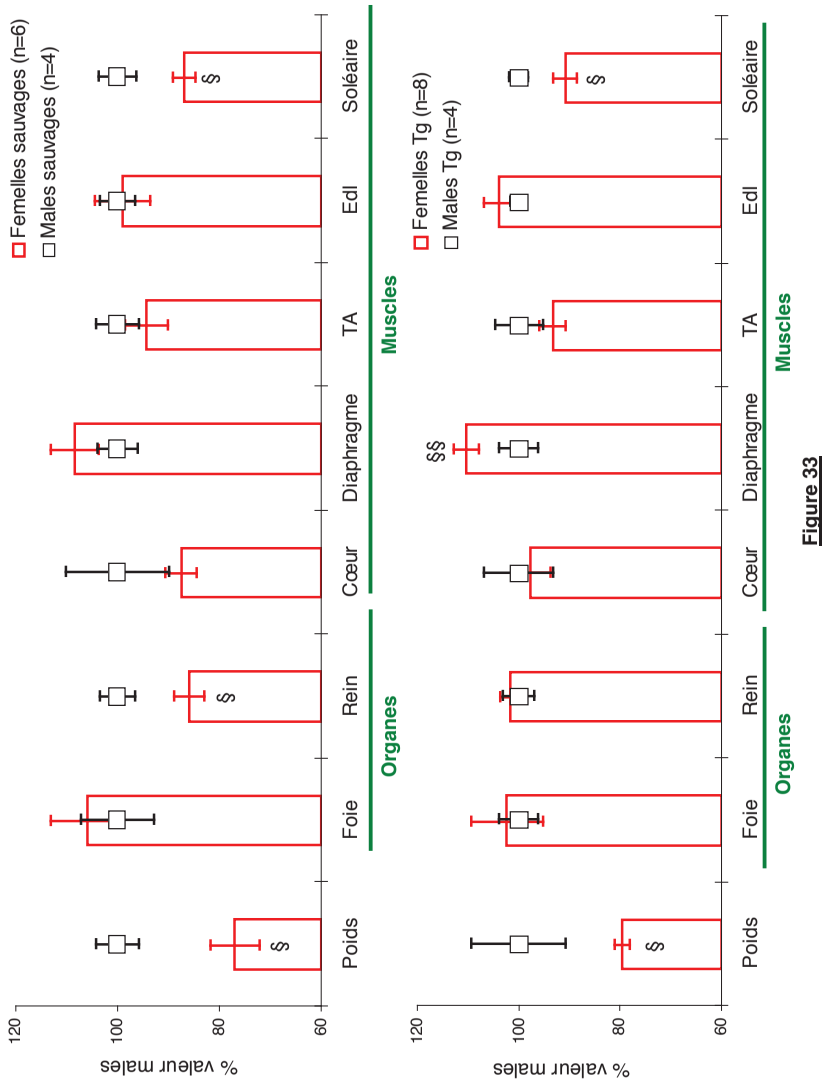


Figure 33

D - Analyse des résultats

1 – Evolution du poids des animaux au cours du temps

Tableau 1 & Figure 1; Tableau 2 & Figure 2

Les résultats montrent que pour les groupes sauvages et transgéniques, les males ont un poids significativement plus important que les femelles et ce pour tous les ages analysés, de 7 à 24 semaines.

En ce qui concerne les différences au sein des souris de même sexe (comparaison transgénique *versus* sauvage), aucune différence n'est observée pour les males. Par contre, on note une augmentation significative du poids chez les femelles transgéniques par rapport aux femelles sauvages (+10% environ).

La prise de poids au cours du temps est cependant identique pour tous les groupes confondus, males et/ou femelles, sauvages et/ou transgéniques.

2 -Exploration fonctionnelle de la motricité : tests moteurs

a) Exploration fonctionnelle au premier stade de développement : 8 semaines d'age

Analyse de la coordination motrice et résistance à la fatigue : Rotarod, vitesse croissante de 4 à 40 rpm

Tableau 3 & Figure 3; Tableau 4 & Figure 4; Tableau 5 & Figure 5

De manière générale, les résultats obtenus pour ce test ne montrent pas de différence significative entre les différents groupes. On note cependant que le temps de maintien sur la barre en rotation est augmenté pour les souris transgéniques par rapport aux souris sauvages de même sexe, de +11% pour les femelles et de +19% pour les males.

Analyse de l'activité locomotrice horizontale et verticale : actimètre IR

Tableau 6 & Figure 6; Tableau 7 & Figure 7; Tableau 8 & Figure 8;Tableau 9 & Figure 9

Comme l'illustre le tableau 6, ce test permet de mettre en évidence une diminution globale de l'activité locomotrice des souris transgéniques par rapport aux souris sauvages du même sexe, variation significative pour les femelles. On note ainsi, chez les

femelles transgéniques par rapport aux femelles sauvages : 1) une diminution du nombre total de mouvement (-16%) essentiellement liée à une diminution du nombre de mouvements associée à la locomotion (-17%) ; 2) une diminution de la distance parcourue (-28%) ; 3) une augmentation du temps de repos (+21%). Le même type de variations est observé pour les males transgéniques par rapport aux sauvages (nombre total de mouvement : -9%, nombre de mouvements associés à la locomotion : -10% ; temps de repos : +10%) mais ces variations ne sont pas statistiquement significatives.

Analyse de la force d'agrippement : Grip test

Tableau 10 & Figure 10; Tableau 11 & Figure 11; Tableau 12 & Figure 12

De façon générale, comme le montre les résultats du Tableau et de la Figure 10, aucune variation de la force développée n'est observée lors de la comparaison des souris transgéniques *versus* souris sauvages. On note cependant que pour les deux génotypes (sauvage ou transgénique), les femelles développent une force d'agrippement supérieure aux males (groupe sauvage : +17% ; groupe transgénique : +16%).

Analyse de la force et de la résistance à la fatigue : Wire test

Tableau 13 & Figure 13; Tableau 14 & Figure 14; Tableau 15 & Figure 15;Tableau 16 & Figure 16

Les résultats montrent que les indices de comportement obtenus pour les 4 groupes sont similaires. Ce test permet cependant de mettre en évidence que les souris femelles transgéniques sont plus performantes par rapport aux femelles sauvages, avec entre autre une augmentation du temps maximal de suspension (+30%). Lors de l'analyse de la répartition des chutes au cours du temps, les males transgéniques sont les moins performants, avec un score final de 6.9±1.5 contre 9.2±0.5 pour les males sauvages ($p<0.10$) et de 9.2±0.2 pour les femelles transgéniques ($p<0.05$).

b) Exploration fonctionnelle au deuxième stade de développement : 24 semaines d'age

Analyse de la coordination motrice et résistance à la fatigue : Rotarod, vitesse croissante de 4 à 40 rpm

Tableau 17 & Figure 17; Tableau 18 & Figure 18; Tableau 19 & Figure 19

Les résultats montrent que les temps de maintien sur la barre en rotation déterminés pour les 4 groupes ne sont pas significativement différents. On note cependant une diminution de ce paramètre entre les males sauvages et transgéniques (-5%) et de la même manière pour les femelles (-10%). Des variations inverses étant observées à 8 semaines de développement, à savoir une augmentation du temps de maintien des souris transgéniques par rapports aux sauvages, ces résultats suggèrent une atteinte de la coordination motrice chez les souris transgéniques âgées de 24 semaines. Concernant la comparaison entres les souris de sexe différent et de même génotype, les femelles sont plus performantes que les males (+20% pour les sauvages, +14% pour les transgéniques).

Analyse de l'activité locomotrice horizontale et verticale : actimètre IR

Tableau 20 & Figure 20; Tableau 21 & Figure 21; Tableau 22 & Figure 22;Tableau 23 & Figure 23

De façon générale, comme le montre le Tableau 20, on note une diminution de l'activité locomotrice globale chez les souris transgéniques par comparaison aux souris sauvages. Cette variation est à nouveau plus importante pour les femelles, avec : 1) une diminution significative du nombre total de mouvements (-23%), liée à une réduction du nombre de mouvements stéréotypés (-27%) et des mouvements associés à la locomotion (-23%) ; 2) une diminution de la distance parcourue (-37%) ; 3) une augmentation du temps de repos (+25%). Ces variations sont plus importantes que celles observées à 8 semaines d'age. Aussi, la diminution du nombre de mouvements associés à la locomotion est significative dès la 8^{eme} minute dans l'actimètre. Les males transgéniques présente également une légère diminution des différents paramètres analysés, mais ces variations ne sont pas significatives et de la même ampleur que celles observées à 8 semaines d'age. Comparées aux males de même génotype, les femelles sauvages sont légèrement plus actives, alors que les femelles transgéniques le sont moins.

Analyse de la force d'agrippement : Grip test

Tableau 24 & Figure 24; Tableau 25 & Figure 25; Tableau 26 & Figure 26

De façon générale, les résultats du Tableau et de la Figure 24 ne montrent pas de modification de la force relative développée lors de la comparaison transgéniques *versus* sauvages (males ou femelle). Par contre, les forces développées par les souris femelles sont supérieures à celles développées par les souris males du même génotype et ce de façon significative pour les femelles transgéniques (pattes antérieures : +18% ; 4 pattes : +15%).

Analyse de la force et de la résistance à la fatigue : Wire test

Tableau 27 & Figure 27; Tableau 28 & Figure 28; Tableau 29 & Figure 29;Tableau 30 & Figure 30

En ce qui concerne ce test, les souris femelles transgéniques sont globalement moins performantes que les femelles sauvages, avec une diminution de l'indice de comportement (-18%), du temps maximal de suspension à la barre (-4%) et des chutes plus fréquentes au cours du temps. Pour les males, l'observation est inverse. En effet, les souris transgéniques sont plus performantes que les souris sauvages pour ce test, avec une augmentation d'environ 80% de l'indice de comportement et du temps maximal de suspension à la barre.

3 -Analyse du poids des organes et des muscles lors du sacrifice (24/25 semaines d'age)

Tableau 31 & Figure 31; Tableau 32 & Figure 32;Tableau 33 & Figure 33

Les résultats montrent pour les males transgéniques, par comparaison aux males sauvages, une augmentation significative du poids (en mg/g) du diaphragme (+13%). Chez les femelles transgéniques par comparaison aux femelles sauvages une augmentation significative du poids (mg/g) de plusieurs organes est notée : les reins (+13%) et le diaphragme (+15%). Bien que non significatif, le poids du cœur est également augmenté (+11%) chez les femelles transgéniques par rapport aux souris sauvages.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'analyse de la fonction motrice a été conduite sur des souris transgéniques des deux sexes et comparées aux souris sauvages. Le résultat majeur de cette étude montre de façon globale une modification des performances locomotrices des souris femelles transgéniques.

Ainsi, chez ces souris, on note une diminution de l'activité de déplacement, significative dès 8 semaines de développement et accentuée à 24 semaines. A 24 semaines de développement, à l'aide du test du rotarod, une altération de la coordination a également été mise en évidence pour les souris femelles transgéniques. Ces altérations de l'activité locomotrice ne sont pas associées à une diminution de la force développée au grip test. De plus, l'analyse du poids des muscles impliqués dans la locomotion (edl, soléaire et *tibialis anterior*) ne montre aucun signe d'hypertrophie ou d'atrophie musculaire. De façon remarquable, il est à noter une augmentation significative du poids de certains organes tels que les reins et le diaphragme mais aussi une augmentation du poids du cœur. L'ensemble de ces observations chez les souris femelles transgéniques laissent à penser que les perturbations de l'activité locomotrice ne sont pas liées à la fonction musculaire squelettique. On ne peut cependant écarter l'hypothèse d'une modification intrinsèque des propriétés contractiles des muscles squelettiques, en particulier au cours d'un processus de fatigue ce qui pourrait expliquer la diminution de l'activité globale au cours du temps. De plus, l'augmentation du poids du cœur et du diaphragme pourrait suggérer une possible implication du système cardio-respiratoire dans cette altération de l'activité locomotrice.

En ce qui concerne les males transgéniques, la même tendance est observé avec notamment une diminution de l'activité locomotrice et augmentation du poids du diaphragme, ces variations étant cependant moins prononcées que pour les femelles.