

Chimio-attraction ou chimio-répulsion axonale : rôle des nétrines et des sémaphorines

**Évelyne Bloch-Gallego
Constantino Sotelo**

A la fin de leur phase proliférative, les neurones postmitotiques migrent le long des axes gliaux, répondant à des indices positionnels qui permettent la localisation précise de leur corps cellulaire (ou soma). Après cette phase de migration, leurs axones établissent des connexions spécifiques avec les territoires cibles grâce à une structure terminale, le cône de croissance. Véritable tête chercheuse de la cellule, cette structure assure la navigation précise de l'axone au sein des tissus ; l'activité du cône de croissance est réglée par les conditions locales : matrice extracellulaire, molécules d'adhérence, facteurs de croissance extracellulaires diffusibles, ou champs électriques. De nouvelles protéines impliquées dans le guidage à distance des cônes de croissance ont été isolées et certains de leurs récepteurs récemment mis à jour. Il s'agit des molécules de la famille des nétrines et des sémaphorines.

Durant le développement embryonnaire, les neurones migrent de leur lieu de naissance dans la zone ventriculaire, jusqu'à leur position finale au sein du système nerveux. L'une de leurs extensions, l'axone, « navigue » pour entrer en contact avec la cellule cible appropriée, qui peut se trouver à une distance pouvant atteindre plus de mille fois le diamètre de son corps cellulaire. L'idée de chimio-attraction comme mécanisme de guidage pour les axones en croissance avait été proposée par Ramón y Cajal dès 1892 [1]. Il avait suggéré que les axones en croissance seraient guidés par une

série de signaux chimio-attractifs synthétisés par des cibles intermédiaires successives, segmentant ainsi le trajet que les axones doivent parcourir pour atteindre leur cible. Le cône de croissance doit explorer finement son environnement en développant des structures dites filopodes et lamellipodes, qui lui permettent d'augmenter la surface de contact au sein de l'environnement embryonnaire et de réaliser un choix stratégique pour orienter sa croissance. Les erreurs de navigation étant rares dans le système nerveux des vertébrés, l'on supposait depuis longtemps l'existence d'une combinaison de facteurs doués d'une action attrac-

ADRESSE

E. Bloch-Gallego : *chargée de recherche à l'Inserm*. C. Sotelo : *directeur de recherche au Cnrs, directeur de l'unité 106 de l'Inserm*. Inserm U. 106, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France.

tive ou répulsive dirigeant la navigation axonale avec une grande précision. Un cap a été franchi depuis 1993, grâce à l'isolement et à la caractérisation de molécules candidates et de certains de leurs récepteurs. Les molécules chimio-répulsives caractérisées à ce jour présentent une large distribution dans des tissus embryonnaires variés alors que les molécules chimio-attractives ont été principalement découvertes au niveau de la plaque du plancher du tube neural, ou *floor-plate* selon l'appellation anglo-saxonne.

**Mise en évidence
d'une activité chimio-
attractive
dans le système nerveux
central :
la ligne médiane ventrale
comme cible
intermédiaire**

Les travaux de His, en 1893, puis de Kingsbury, en 1920 [2], laissaient supposer que la plaque du plancher était impliquée dans la spécification du plan de développement de la moelle épinière. Des données plus récentes ont montré que la plaque du plancher est composée de cellules de nature épithéliale qui sont parmi les premières à être différenciées au sein du système nerveux. Leur différenciation est sous l'influence de la notochorde, structure qui se développe à partir des cellules mésodermiques de l'axe dorsal [3, 4]. En 1983, un test fonctionnel permettant l'étude des qualités chimiotactiques de différents tissus a été mis au point [5]. Dans ce test, des matrices de collagène constituent un support solide au sein desquelles sont placés, à distance les uns des autres, des fragments de tissus et des agrégats cellulaires. Le collagène permet de stabiliser les gradients de molécules diffusibles qui émanent de ces sources tissulaires ; il constitue un substrat tridimensionnel dans lequel l'observation de l'orientation de la croissance axonale, à partir d'un tissu en développement vers différents tissus cibles, est aisée. En 1988, pour la première fois, l'existence d'un phénomène de guidage chimiotropique des axones a été montrée dans le système nerveux central de rat ; cela a

été observé au moyen de ces matrices de collagène, plus particulièrement au niveau de la plaque du plancher, cible intermédiaire au cours de la croissance des axones des neurones commissuraux de la moelle épinière dans de nombreuses espèces [6]. On a ainsi montré *in vitro* que les cellules de la plaque du plancher ont la capacité, d'une part, de promouvoir la croissance des axones des neurones commissuraux dans les gels de collagène à partir des explants de moelle épinière dorsale embryonnaire et, d'autre part, d'attirer les axones de ces neurones en modifiant leur orientation au sein de ces explants [7]. *In vivo*, les cellules de la plaque du plancher fournissent des signaux de type chimiotactique qui permettent la croissance des axones des neurones pionniers vers la ligne médiane ventrale ; les axones des neurones commissuraux émettent des projections vers la partie ventrale de la moelle épinière, alors que leurs corps cellulaires sont localisés dans la partie dorsale de la moelle épinière (*figure 1*). Les signaux émis par la plaque du plancher permettent des changements de direction des axones commissuraux immédiatement après leur traversée de cette ligne, ces axones allant ensuite établir des projections ascendantes ou descendantes. On parle de décussation des fibres commissurales au niveau de la ligne médiane ventrale. Le mode de traversée de la plaque du plancher par les axones de nombreux types neuronaux est stéréotypé, adoptant une orientation parfaitement perpendiculaire à cette plaque. L'implication de la ligne médiane dans le guidage axonal a pu être généralisée, des invertébrés (drosophile et nématode) aux vertébrés.

**Conservation
phylogénétique
des mécanismes
de guidage axonal :
les nétrines et leurs
récepteurs**

Les travaux réalisés par l'équipe de Marc Tessier-Lavigne ont mené à l'isolement, en 1994, d'une famille de facteurs diffusibles appelés nétrines [8]. Les nétrines ont la capacité de reproduire les effets de la ligne médiane ventrale : elles favori-

sent la croissance des axones commissuraux en gels de collagène. Deux protéines, les nétrines 1 et 2, ont été ainsi purifiées à partir de la fraction membranaire microsomique de cerveaux de poulet à 13 jours de développement embryonnaire. La nétrine 1, d'une masse molaire de 78 kDa, est localisée exclusivement dans les cellules de la plaque du plancher, alors que le domaine d'expression de la nétrine 2, de masse molaire 75 kDa, comprend les deux-tiers ventraux de la moelle épinière [9]. Ce sont des protéines de 600 acides aminés présentant des analogies structurales avec les molécules de tailles beaucoup plus importantes que sont les laminines, molécules de la matrice extracellulaire (*figure 2*). Il est à noter que les nétrines, contrairement à la laminine, sont des molécules diffusibles, bien que l'étendue de leur diffusion puisse être modulée par leur interaction avec les éléments de la matrice extracellulaire.

Les nétrines présentent aussi des analogies structurales avec UNC-6 du nématode *C. elegans*, et on a supposé, dès leur isolement en 1994, qu'elles auraient également des analogies fonctionnelles au cours du développement embryonnaire. Les nétrines sont également présentes au niveau des cellules de la ligne médiane du système nerveux de drosophile durant le développement. Deux gènes en tandem codent pour la D-nétrineA et la D-nétrineB [10, 11] ; ces deux gènes ont, chez la drosophile, les mêmes domaines d'expression et semblent présenter une redondance fonctionnelle. Les embryons de drosophile porteurs d'une délétion de ces deux gènes développent des commissures plus fines au niveau de la ligne médiane du système nerveux central et certaines des commissures sont absentes. Cette observation traduit vraisemblablement l'identité du rôle des nétrines dans le développement de la drosophile et dans la formation des commissures des vertébrés. Les gènes des nétrines 1 et 2 ont également été clonés chez la souris [12]. La nétrine 2 n'est pas exprimée dans la moelle épinière, alors que le domaine d'expression de la nétrine 1 couvre celui des nétrines 1 et 2 de poulet. Les similitudes de structure et de fonction des nétrines, des néma-

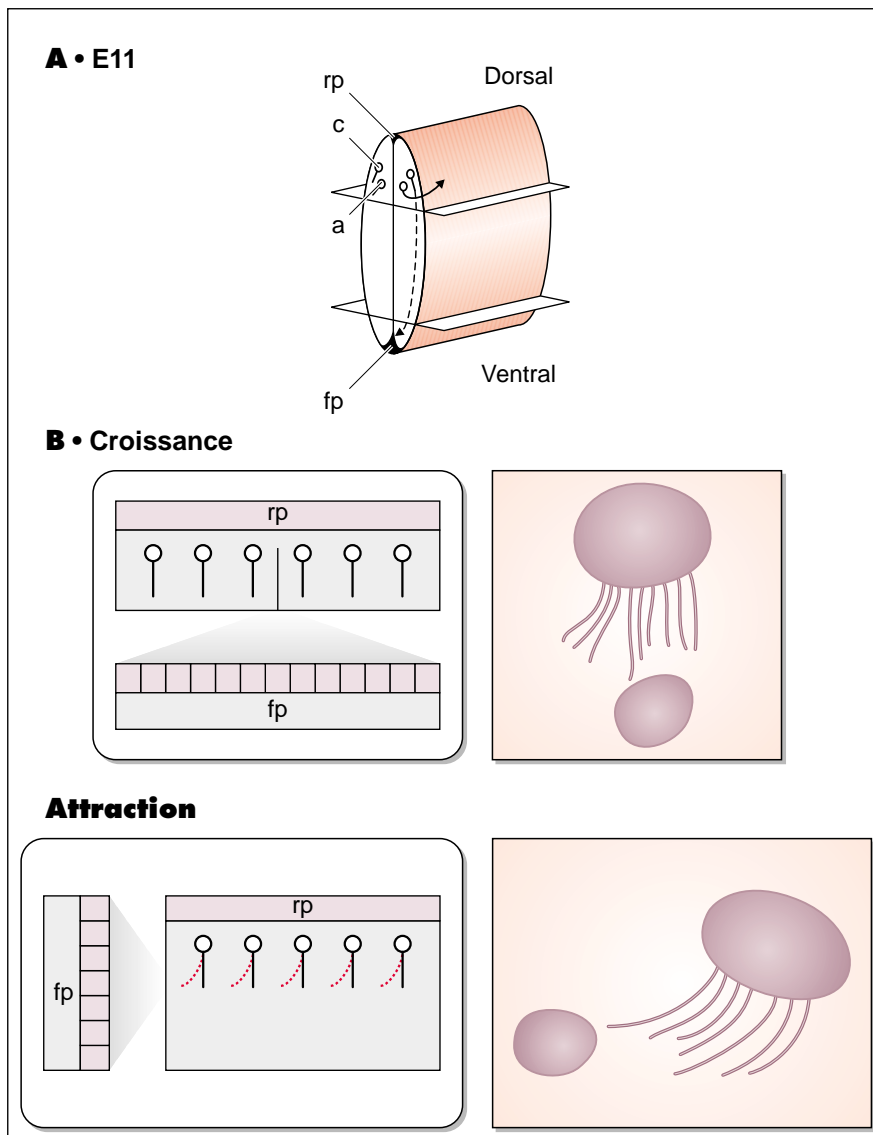


Figure 1. **Mise en évidence de l'activité chimiotactique de la plaque du plancher en gel de collagène.** **A.** Le tube est subdivisé en trois parties. La partie la plus dorsale comprend le toit du tube (rp, roof-plate), les neurones accessoires (a) et les neurones commissuraux (c). La partie la plus ventrale comprend la plaque du plancher (fp, floor-plate). **B.** Placée en face d'un explant de moelle épinière dorsale de rat à 11 jours de développement embryonnaire, la plaque du plancher entraîne la croissance des neurones commissuraux au sein du gel de collagène. Lorsque la plaque du plancher est placée à 90° par rapport à l'orientation dorso-ventrale normale au sein de la moelle épinière, les axones des neurones commissuraux tournent pour s'orienter vers la plaque du plancher. L'explant de plaque du plancher est capable d'attirer et d'orienter les axones des neurones commissuraux de la moelle épinière de rat embryonnaire. Des cellules Cos transfectées avec la nétrine 1 ont les mêmes propriétés que la plaque du plancher en gel de collagène.

todes aux mammifères, suggèrent une conservation phylogénétique des mécanismes de guidage axonal. Chez les souris mutées déficientes pour l'expression de la nétrine 1, on observe des défauts au niveau des

structures constituant le siège d'importantes voies axonales suggérant une implication des nétrines dans la formation de ces structures [12]: la commissure hippocampique ainsi que le corps calleux sont

absents et la commissure ventrale de la moelle épinière est diminuée. Ces mutants présentent, notamment, des anomalies de navigation axonale des neurones commissuraux de la moelle épinière, peu de leurs axones atteignant la plaque du plancher (figure 3).

Pour que les nétrines aient une réalité physiologique, ces facteurs ou ligands doivent se lier à un récepteur dont la spécificité d'expression doit pouvoir, à son tour, engendrer une spécificité de réponse cellulaire. En 1996, deux gènes codant pour des récepteurs des nétrines ont été identifiés chez les vertébrés [13]; il s'agit du gène codant pour la néogénine et du gène codant pour DCC (*deleted in colorectal cancer*), gène dont l'expression est fréquemment affectée chez les individus présentant un cancer colo-rectal mais dont l'implication dans cette maladie est difficilement explicable (*m/s n° 2, vol. 13, p. 245*) [14-16]. L'inactivation par recombinaison homologue de DCC chez la souris n'engendre aucune augmentation du nombre de tumeurs développées. Elle n'affecte ni la prolifération des cellules épithéliales intestinales, ni leur différenciation; la morphogenèse et la physiologie globale de l'épithélium intestinal murin [17] sont normales. La néogénine et DCC forment un sous-groupe de protéines transmembranaires de la superfamille des immunoglobulines [13]. Le gène DCC code pour un groupe de protéines de masse molaire 175 à 190 kDa comportant quatre domaines immunoglobuline et six motifs fibronectine de type III répétés dans le domaine extracellulaire. La qualité de récepteur de DCC a été déterminée en transfectant des cellules avec le gène codant pour cette molécule et en analysant leur liaison du ligand, la nétrine. La protéine DCC apparaît constituer le récepteur de forte affinité de la nétrine 1 chez le rat. De grandes quantités d'ARN messager sont synthétisées dans les corps cellulaires des neurones commissuraux et la protéine DCC est fortement exprimée au niveau de leurs axones lorsqu'ils se projettent vers la plaque du plancher. L'implication de DCC dans le guidage des axones des neurones commissuraux de moelle épinière de rat est, en outre, confortée par le fait que l'inactivation du gène DCC chez la souris entraîne un phé-

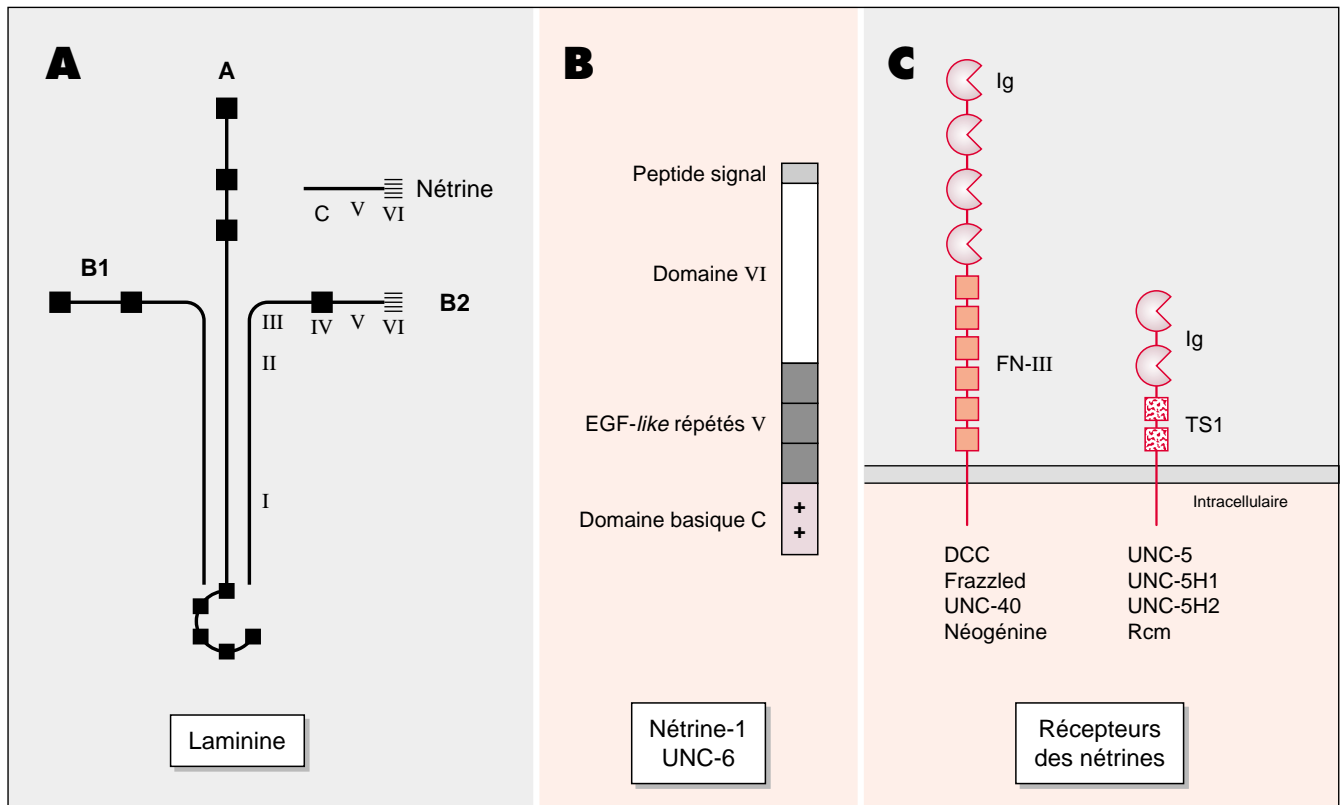


Figure 2. **Analogie structurale des nétrines (Net1/2, UNC-6 et D-NetA/B) et de la laminine. Schématisation des récepteurs des nétrines.** **A.** La laminine, molécule de la matrice extracellulaire est composée de trois chaînes A, B1 et B2 disposées en croix. **B.** Les nétrines sont plus courtes que les laminines et portent les chaînes V (trois motifs EGF) et VI de la laminine côté amino-terminal. Elles présentent également un domaine basique côté carboxy-terminal (domaine C) et un peptide signal côté amino-terminal permettant leur libération extracellulaire. **C.** Les récepteurs DCC, Frazzled et UNC-40 interviennent dans les phénomènes d'attraction par les nétrines. Ils sont composés de domaines répétés d'immunoglobuline (Ig) et de fibronectine de type III (FnIII). Ils sont très conservés chez les vertébrés (DCC, néogénine), les insectes (Frazzled) et les nématodes (UNC-40). Les récepteurs du type UNC-5 participant à l'effet répulsif des nétrines sont plus courts, composés de deux domaines immunoglobuline et de deux domaines thrombospondine de type I (TS1). Les protéines analogues des vertébrés [UNC-5H1, UNC-5H2 et Rcm (rostral cerebellar malformation)] présentent également de fortes ressemblances avec UNC-5 du nématode.

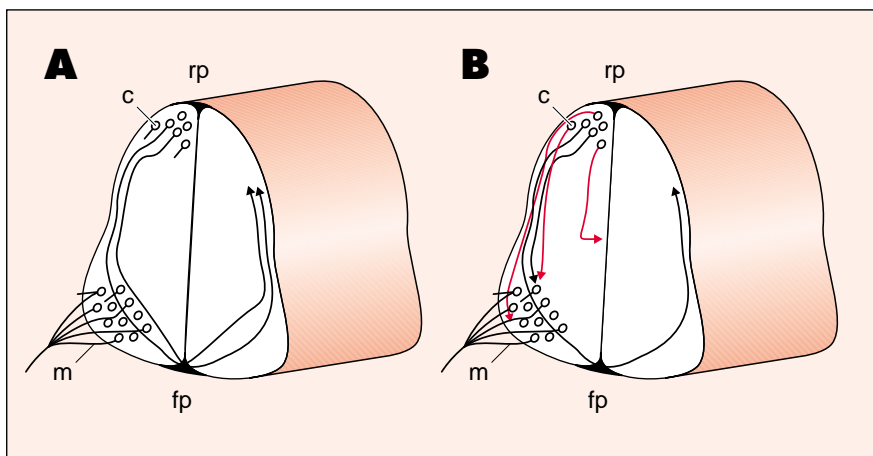


Figure 3. **Représentation schématique des trajectoires dorso-ventrales des axones des neurones commissuraux dans la moelle épinière.** Souris normale (**A**) et souris dont la nétrine 1 est mutée, présentant des anomalies de navigation des axones des neurones commissuraux (en rouge) (**B**). rp: toit du tube (roof-plate), fp: plaque du plancher (floor-plate); c: neurones commissuraux; m: motoneurones.

notype presque identique à celui de l'inactivation du gène codant pour la nétrine 1. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle DCC représente un composant du récepteur de la nétrine 1 *in vivo*. Néanmoins, certains axones commissuraux parviennent à atteindre la plaque du plancher chez les souris n'exprimant plus DCC, suggérant que la nétrine 1 pourrait agir indépendamment de ce seul élément DCC ou encore qu'il existerait un autre mécanisme de guidage des axones commissuraux indépendant de la nétrine 1. La fonction de la néogénine est moins claire. Elle est également capable de lier la nétrine 1 mais elle semble impliquée préférentiellement dans le guidage des axones rétiniens. Au niveau de la moelle épinière, elle pourrait agir comme une protéine de liaison passive, stabilisant le gradient de nétrine 1.

Chez la drosophile, Frazzled [18] serait l'homologue de DCC. Au niveau de la ligne médiane, le phénotype du mutant pour le « candidat récepteur » Frazzled est identique à celui du double mutant « ligand » D-nétrineA/B [10]. Chez le nématode, deux récepteurs pour UNC-6 (homologue des nétrines de poulet) ont été caractérisés: UNC-40 et UNC-5. La protéine UNC-6 se lie au récepteur UNC-40 et assurerait une fonction attractive; ce serait notamment le cas pour l'attraction des neurones ventraux, alors que sa liaison à un second récepteur, UNC-5 permettrait la répulsion des neurones dorsaux (*m/s n° 11, vol. 9, p. 1264*) [19-21]. Comme leurs ligands, les récepteurs des nétrines ont été conservés tout au long de l'évolution puisque DCC, Frazzled [18] et UNC-40 présentent d'importantes similitudes de structure et de fonction.

Des facteurs mono- ou bifonctionnels

Chez le nématode, la notion de nétrine comme facteur bifonctionnel, c'est-à-dire potentiellement attractif ou répulsif, est corroborée à la fois par les manipulations embryonnaires et par la mise en évidence de deux récepteurs pour le ligand UNC-6. En effet, chez le mutant *unc-5*, le patron dorsal est affecté alors que le mutant *unc-40* présente des défauts sévères au niveau des migrations ventrales [22,

23]. En outre, l'expression ectopique de *unc-5* dans certains neurones peut modifier la trajectoire initiale des axones en les éloignant de la source de nétrine [22]. Chez les vertébrés, les nétrines sont attractives pour les axones de différents types de neurones à migration circonférentielle [24], mais la nétrine 1 exerce une activité répulsive, *in vitro*, sur les axones des neurones moteurs trochléaires de rat qui, dans le pont embryonnaire, poussent dorsalement à partir de la ligne médiane [25]. De même, les axones moteurs crâniens à projection dorsale, notamment ceux des noyaux trigéminaux, faciaux et glossopharyngiens, sont repoussés par la nétrine 1 [26]. L'activité répulsive des nétrines pour les neurones trochléaires n'a pas été confirmée à ce jour par l'analyse de mutants ayant des anomalies d'expression de la nétrine 1 [12]. L'ambiguïté observée entre les expériences menées *in vitro* et les analyses *in vivo* soulevait plusieurs hypothèses: il pouvait, d'une part, exister d'autres facteurs pour assurer la fonction de répulsion des axones dorsaux *in vivo*; d'autre part, la situation critique artificielle pouvait entraîner une adaptation par mise en place d'une molécule-relais répulsive chez les animaux porteurs d'allèles hypomorphiques du gène murin de la nétrine 1. Récemment, plusieurs homologues de UNC-5 ont été identifiés chez les vertébrés. Il s'agit de UNC-5H1, UNC-5H2 [27] et Rcm (*rostral cerebellar malformation*) [28]. Ces trois protéines définissent une nouvelle sous-famille de la super-famille des immunoglobulines, et présentent plus de 50 % d'identité entre elles. Elles sont capables de se lier à des cellules exprimant la nétrine 1. La protéine UNC-5H1 est synthétisée par les motoneurons spinaux et trochléaires. Au cours du développement, les deux gènes *Unc-5h1* et *Unc-5h2* sont exprimés dans des régions à forte axonogenèse au cours de la différenciation neuronale. La présence de UNC-5H1 pourrait expliquer la répulsion des neurones moteurs trochléaires et spinaux par la plaque du plancher et la nétrine 1. Les protéines UNC-5H1 et UNC-5H2 sont co-exprimées avec le récepteur DCC au niveau de la moelle ventrale et dorsale, de la rétine dorsale, du cervelet et des gan-

glions sensoriels. Les homologues UNC-5 pourraient interagir avec DCC pour transformer le récepteur à fonction attractive de la nétrine 1 en un complexe-récepteur de cette même protéine à fonction répulsive, comme cela a été proposé chez le nématode.

L'idée de chimio-répulsion des axones par des molécules diffusibles a été largement étayée par la découverte d'une autre nouvelle famille de protéines que l'on désigne sous le terme de sémaphorines. Les sémaphorines constituent une grande famille de protéines d'une longueur moyenne de 750 acides aminés. Il existe des sémaphorines sécrétées et des sémaphorines transmembranaires, toutes deux pouvant agir comme inhibitrices de croissance axonale, par contact ou, à distance, par chimiorépulsion (*figure 4*). Cette famille se caractérise par un domaine extracellulaire conservé de 500 acides aminés contenant un site d'amino-glycosylation et 13 résidus cystéine disposés selon un motif précis [29]. La première molécule chimiorépulsive a été identifiée chez le criquet. Désignée sous le terme de fascicline IV, elle fut ensuite nommée sémaphorine I. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire. Durant l'embryogenèse, elle est impliquée dans le guidage des neurones sensoriels au sein du système nerveux périphérique [30]. Des travaux récents viennent de montrer que la sémaphorine 1 peut avoir une fonction alternativement attractrice et répulsive sur les cônes de croissance axonaux dans le bourgeon de membre de la larve de criquet [31]. Les sémaphorines ont ensuite été isolées et leurs ADNc clonés dans diverses espèces. La collapsine-1, première molécule chimiorépulsive dont l'ADNc a été cloné chez les vertébrés [32], a été purifiée à partir du cerveau de poulet. Il s'agit d'une glycoprotéine de 100 kDa qui pourrait jouer un rôle dans les phénomènes de chimio-répulsion des projections sensorielles primaires dans la moelle épinière; elle est capable d'induire la disparition (ou *collapse*) des cônes de croissance et la paralysie des neurones sensoriels en culture [32]. La SémaIII (encore appelée SémaD) est l'analogue murin de la collapsine 1. Chez la souris, la sémaphorine III/D

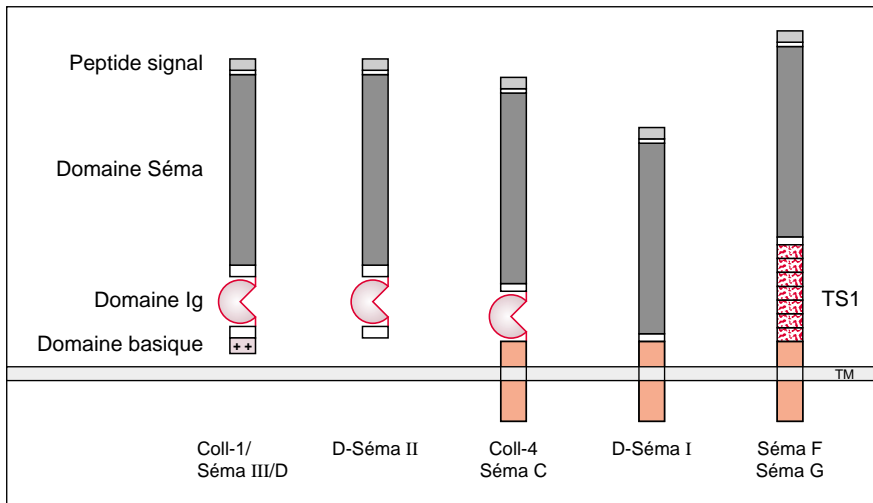


Figure 4. Les sémaphorines constituent une famille de protéines sécrétées ou transmembranaires. Le domaine sémaphorine (Séma) comprend 500 acides aminés très conservés entre les différents membres. La D-Séma II et la collapsine I (Coll-1)/Séma III sont sécrétées mais le domaine basique côté carboxy-terminal est absent de la D-Séma II. La Séma I et la Séma C ont un domaine transmembranaire, mais la Séma I ne contient pas de domaine Ig. La Séma F, également transmembranaire, se distingue des autres membres de cette famille par sa longueur qui atteint 1000 acides aminés alors que Séma I, Séma II, Séma III et Séma C ont une longueur moyenne de 700 acides aminés ; son domaine Séma est suivi de domaines thrombospondine de type I (TS1).

favorise l'établissement des projections des neurones des ganglions rachidiens dans la moelle épinière. Il a été possible d'établir une corrélation entre le type de réponse de ces neurones à la SémaIII et leur sensibilité à des facteurs neurotrophiques (NGF pour *nerve growth factor*, NT-3 pour neurotrophine-3) [33]. Dans les matrices de collagène, la SémaIII exerce un effet inhibiteur sélectif sur les afférences sensorielles primaires sensibles au NGF alors que les afférences sensorielles primaires sensibles à la neurotrophine 3 sont moins fortement inhibées [34]. Le domaine d'expression de la SémaIII dans l'embryon normal est compatible avec cette observation réalisée en culture : *in vivo*, la sémaphorine III est fortement exprimée dans la partie ventrale de la moelle épinière (figure 5) au moment où s'exerce la chimio-répulsion sélective sur les afférences sensorielles primaires sensibles au NGF [35]. Les premiers récepteurs des sémaphorines viennent d'être caractérisés. Ils appartiennent à la famille des neuropi-

lines et sont exprimés de manière différentielle dans le système nerveux des mammifères en développement [36]. La sémaphorine III se lie avec une forte affinité à une de ces glycoprotéines transmembranaires axonales, la neuropiline, que dorénavant nous pouvons appeler neuropiline 1 [37, 38]. Les anticorps qui bloquent la neuropiline 1 inhibent la répulsion, par la sémaphorine III, des afférences sensorielles primaires sensibles au NGF. Néanmoins, comme la neuropiline 1 est capable de lier toutes les sémaphorines sécrétées, il est probable que d'autres protéines interagissent avec elle pour conférer une spécificité de liaison et d'action des différentes sémaphorines *in vivo* à leurs récepteurs. La neuropiline 2 a été identifiée ; elle constitue un récepteur de forte affinité pour les sémaphorines sécrétées E et IV, alors qu'elle n'a pas la capacité de lier la sémaphorine III [39]. Il est à prévoir que d'autres composants des récepteurs des sémaphorines seront découverts dans un avenir proche.

Autres implications des nétrines et des sémaphorines durant les phases d'embryogenèse précoces (migration neuronale) ou tardives (synaptogenèse)

Il a récemment été proposé que les nétrines puissent jouer un rôle dans les phénomènes de migration cellulaire. Chez le nématode, UNC-6 semble moduler à la fois la migration des cellules et la navigation de leurs axones [19]. L'homologie de structure entre UNC-6 et les nétrines est en faveur d'un rôle des nétrines dans la migration neuronale chez les vertébrés. En outre, chez le mutant porteur du gène inactivé de la nétrine 1, les noyaux propres du pont sont absents. Or les cellules postmitotiques de l'ensemble des noyaux pré-cérébelleux migrent en empruntant un long trajet circonferentiel ; cette observation suggère une implication chimio-attractrice de la nétrine 1 pour les cellules en migration [12]. De plus, l'étude de souris mutantes pour le gène *Rcm* (*rostral cerebellar malformation*) qui code pour une protéine apparentée au récepteur UNC-5 de nématode a montré d'importantes malformations au niveau du cervelet et du mésencéphale. Ces défauts sont la conséquence d'anomalies de migration neuronale, notamment des cellules des grains et des cellules de Purkinje [28]. La protéine *Rcm* est capable de lier la nétrine 1 *in vitro* [27] et le complexe ligand-récepteur jouerait un rôle déterminant *in vivo* durant les étapes de prolifération et de migration cellulaire du développement cérébelleux, plus particulièrement pour la foliation et la lamination du cervelet. Les domaines d'expression de *Rcm*, au sein du cervelet notamment, peuvent être chevauchants avec ceux des protéines UNC-5H1 et UNC-5H2. Ainsi, les protéines apparentées à UNC-5 pourraient intervenir dans le processus de guidage des migrations cellulaires par les nétrines chez les invertébrés et chez les vertébrés.

Les nétrines, comme les sémaphorines, pourraient être impliquées dans la spécification des connexions neuromusculaires. Chez la drosophile

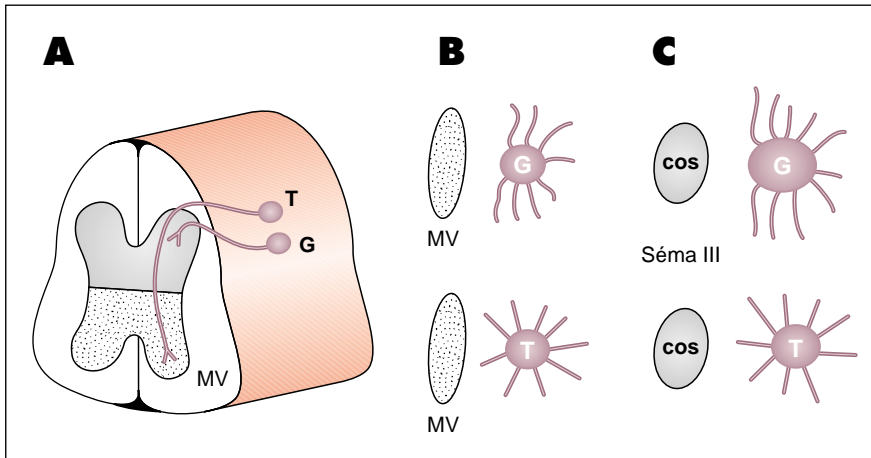


Figure 5. **La sémaphorine III possède une activité chimio-répulsive pour les afférences sensorielles primaires de la moelle épinière sensibles au NGF.** **A.** La sémaphorine III est synthétisée dans la partie ventrale de la moelle épinière (MV) chez le rat à partir du jour embryonnaire 14 (E14). A ce moment, les afférences sensorielles primaires sensibles à la NT-3 (T) qui projettent dans la moelle épinière ventrale entrent par la moelle épinière dorsale. Peu après, à 16 jours de développement embryonnaire, la population sensible au NGF (G) parvient à la corne dorsale. **B.** La moelle épinière ventrale de E14 sécrète un facteur qui repousse les afférences sensorielles primaires mais qui est sans effet sur les afférences sensibles au NT-3. **C.** La sémaphorine III sécrétée par les cellules Cos agit comme élément répulsif pour les afférences sensorielles sensibles au NGF et non pour celles sensibles au NT-3.

phile, les nétrines sont synthétisées dans des sous-groupes de muscles. Le développement des projections motrices est perturbé si l'on fait exprimer de façon ectopique le gène de la nétrine dans l'ensemble des muscles [10]. De même, la topographie de ces projections se développe de manière aberrante dans le mutant des nétrines ou de leur récepteur Frazzled. Chez les insectes les sémaphorines sont impliquées dans l'inhibition du branchement axonal et de la formation des arborisations terminales présynaptiques. Récemment, la production et l'analyse des mutants de sémaphorine III a permis de montrer que la molécule SémaIII est impliquée dans la croissance de certains nerfs (croissance des axones sensoriels cutanés, et de la moelle épinière) mais aussi dans le développement de différents organes, notamment des structures cartilagineuses et osseuses (fusions vertébrales), et cardiaques [40].

Conclusion et perspectives

Les processus de migration neuronale et de guidage axonal impliquent

probablement une séquence complexe d'action de différents facteurs. De fait, il devrait sans doute apparaître que l'axone, pour atteindre sa cible, a besoin de l'action successive ou coordonnée de molécules (et de récepteurs) dont beaucoup restent à découvrir. La plaque du plancher et plus particulièrement les facteurs diffusibles tels que les nétrines jouent un rôle déterminant dans le guidage axonal chez les invertébrés (drosophile et nématode) et chez les vertébrés. Néanmoins, lorsque l'on abolit génétiquement l'expression des nétrines ou de leurs récepteurs, certains axones commissuraux parviennent toujours à atteindre la ligne médiane, chez les nématodes, la drosophile ou les vertébrés. La pénétrance phénotypique de ces mutations n'est que partielle, traduisant vraisemblablement une redondance de facteurs, ligands ou récepteurs; chez la drosophile, il est aujourd'hui clair que les deux molécules de nétrines A et B fournissent des signaux de guidage totalement redondants. Il pourrait également exister des sources-relais de molécules sécrétées, par la plaque du plancher notamment, et susceptibles

d'agir en combinaison ou de façon redondante avec les nétrines ou autres molécules diffusibles pour assurer le guidage des axones. A titre d'exemple, des manipulations *in ovo* utilisant des anticorps bloquants pour différents facteurs de contact ont montré que les interactions entre les cônes de croissance et l'axonine 1, et des cellules de la plaque du plancher avec la NrCAM, sont nécessaires à la traversée de la ligne médiane par les axones des neurones commissuraux [41, 42]. Les deux hypothèses, dépendance d'un contact ou chimiotactisme, pourraient ainsi être élégamment mêlées: les molécules chimio-attractives constitueraient les facteurs responsables de l'étape précoce d'attraction des axones à distance, alors que le passage à travers la ligne médiane pourrait être dû à des molécules de contact présentes au niveau de la ligne médiane ventrale. Le clonage des facteurs chimio-tactiques étant très récent, peu de données sont disponibles à ce jour quant à la régulation génique de ces molécules durant le développement. Une caractérisation moléculaire plus complète de ces deux mécanismes de guidage permettra sans doute de lier ces deux types d'hypothèses et d'aboutir à une compréhension à la fois plus physiologique et plus précise du guidage axonal. De même, les recherches ultérieures permettront sans doute de préciser les voies de signalisation intracellulaires par lesquelles les nétrines et les sémaphorines transmettent les informations au cône de croissance ■

TIRÉS À PART

E. Bloch-Gallego.

**Communiqué
aux lecteurs
non abonnés**

**VENTE AU NUMÉRO
140 F**

Contactez Florence Goulet,
médecine/sciences, Éditions Masson,
120, boulevard Saint-Germain,
75006 Paris, France

Tél. : 01 40 46 62 79

Fax : 01 40 46 62 01

RÉFÉRENCES

1. Ramón y Cajal S. La rétine des vertébrés. *La cellule* 1892; 9: 121-255.
2. Kingsbury BF. The extent of the floor-plate of His and its significance. *J Comp Neurol* 1920; 32: 113-35.
3. Spemann H. *Embryonic development and induction*. New Haven: Yale University Press, 1938.
4. Placzek M, Tessier-Lavigne M, Yamada T, Jessel T, Dodd J. Mesodermal control of neural cell identity: floor-plate induction by the notochord. *Science* 1990; 250: 985-8.
5. Lumsden AGS, Davies AM. Earliest sensory nerve fibres are guided to their peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* 1983; 306: 786-8.
6. Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AG, Dodd J, Jessel TM. Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 1988; 336: 775-8.
7. Placzek M, Tessier-Lavigne M, Jessel T, Dodd J. Orientation of commissural axons *in vitro* in response to a floor plate-derived chemoattractant. *Development* 1990; 110: 19-30.
8. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessel TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 1994; 78: 409-24.
9. Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 1994; 78: 425-35.
10. Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ. Genetic analysis of netrin genes in *Drosophila*: netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 1996; 17: 203-15.
11. Harris R, Sabatelli LM, Seeger MA. Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* 1996; 17: 217-28.
12. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, et al. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 1996; 87: 1001-14.
13. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. *Deleted in colorectal cancer (DCC)* encodes a netrin receptor. *Cell* 1996; 87: 175-85.
14. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56.
15. Cho KR, Fearon ER. DCC: linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 72-8.
16. Thomas G. Dix ans de recherche sur les prédispositions génétiques au développement de tumeurs. *Med Sci* 1995; 11: 336-48.
17. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JL, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA. Phenotype of mice lacking functional *deleted in colorectal cancer (DCC)* gene. *Nature* 1997; 386: 796-804.
18. Kolodziej PA, Timpe LC, Mitchell KJ, et al. *Frazzled* encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 1996; 87: 197-204.
19. Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. 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* 1990; 4: 61-85.
20. Labouesse M. *C. elegans*, les promesses d'un petit animal intelligent: « small is beautiful ». *Med Sci* 1994; 10: 337-41.
21. Chan SS-Y, Zheng H, Su MW, et al. UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (deleted in colorectal cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 1996; 87: 187-95.
22. Hamelin M, Zhou Y, Su MW, Scott IM, Culotti JG. Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally. *Nature* 1993; 364: 327-30.
23. Wadsworth WG, Bhatt H, Hedgecock EM. Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local netrin cues for guiding migrations in *C. elegans*. *Neuron* 1996; 16: 35-46.
24. Shirazaki R, Mirzayan C, Tessier-Lavigne M, Murakami F. Guidance of circumferentially growing axons by netrin-dependent and -independent floor-plate chemotropism in the vertebrate brain. *Neuron* 1996; 17: 1079-88.
25. Colamarino SA, Tessier-Lavigne M. The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 1995; 81: 621-9.
26. Varela-Echavarría A, Tucker A, Püschel AW, Guthrie S. Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 1997; 18: 193-207.
27. Leonardo EH, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 1997; 386: 833-8.
28. Ackerman SL, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB. The mouse *rostral cerebellar malformation* gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* 1997; 386: 838-42.
29. Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993; 75: 1389-99.
30. Kolodkin AL, Matthes DJ, O'Connor TP, et al. Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 1992; 9: 831-45.
31. Wong JTW, Yu WTC, O'Connor TP. Transmembrane grasshopper Semaphorin I promotes axon outgrowth *in vivo*. *Development* 1997; 124: 3597-607.
32. Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 1993; 75: 217-27.
33. Püschel AW, Adams RH, Betz H. The sensory innervation of the mouse spinal cord may be patterned by differential expression of and differential responsiveness to semaphorins. *Mol Cell Neurosci* 1996; 419-31.
34. Messersmith EK, Leonardo DE, Shatz CJ, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Kolodkin AL. Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 1995; 14: 949-59.
35. Fitzgerald M, Kwiat GC, Middleton J, Pini A. Ventral spinal cord inhibition of neurite outgrowth from embryonic rat dorsal root ganglia. *Development* 1993; 117: 1377-84.
36. Kawakami A, Kitsukawa T, Takagi S, Fujisawa H. Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J Neurobiol* 1996; 29: 1-17.
37. Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. Neuropilin is a Semaphorin III receptor. *Cell* 1997; 90: 753-62.
38. He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; 90: 739-51.
39. Chen H, Chédotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. Identification of a new member of the neuropilin family, neuropilin-2, as a selective high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 1997; 19: 547-59.
40. Behar O, Golden JA, Mashimo H, Schoen FJ, Fishman MC. Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 1996; 383: 525-31.
41. Stoeckli ET, Landmesser LT. Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the *in vivo* guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 1995; 14: 1165-79.
42. Stoeckli ET, Sonderegger P, Pollerberg GE, Landmesser LT. Interference with axonin-1 and NrCAM interactions unmasks a floor-plate activity inhibitory for commissural axons. *Neuron* 1997; 18: 209-21.

Summary

Chemoattraction or chemorepulsion in orienting axonal outgrowth: role of netrins and semaphorins

In the developing nervous system, migrating cells and axons are guided to their targets by cues present in the cellular environment. At the end of last century, Cajal proposed the neurotropic hypothesis as a mechanism of axonal pathfinding during development but some of the molecules implicated in axonal guidance and their receptors have been only recently characterized. Two families of chemotropic molecules implicated in axonal pathfinding, neuronal migration and neuro-muscular connections will be considered: netrins and semaphorins. Netrins, the first characterized, are responsible of the chemoattractive activity of the floor-plate for circumferentially growing axons. They define a family of guidance cues that can function as diffusible attractants but also as diffusible repellents for different classes of cells and axons. There is a remarkable phylogenetic conservation in function of netrin proteins in guiding axons from the nervous system of nematodes and flies to higher vertebrates, and a similarly conserved role for components of the netrin receptor: the DCC subfamily defines one of these receptors involved in attractive properties during axonal guidance. Recent identification of vertebrate homologues of UNC-5 and the evidence that they are netrin-binding proteins, raises the possibility that the signaling mechanisms through which netrins elicit repulsive responses are also conserved, either for axonal pathfinding or for neuronal migrations. Finally, semaphorins define a family of chemorepulsive molecules which receptors remain to be characterized. Sema 1 is involved in collapsing of growth cones of sensory neurons and SemaIII/D affects specific subpopulations of dorsal root ganglia. Gathering together all these results, it is possible to conclude that axonal pathfinding is a complex process in which chemoattraction and chemorepulsion, mediated by phylogenetically conserved ligand-receptor systems, act simultaneously in a coordinated manner.

5^e NAT (Nantes/Actualités/Transplantation) 11-12 juin 1998 - Nantes (France)
Gene Transfer in Transplantation

TROISIÈME CONFÉRENCE ANNUELLE
PHARMACIE
Jeudi 5 février 1998

DISPONIBLE EN VIDÉOCASSETTE

La journée Jean-Claude DREYFUS

RÉCEPTEURS ET MALADIES

Paris le 19 septembre 1997

sur deux vidéocassettes VHS

Nombreux autres congrès, liste sur demande

Pour information, contacter :

Professeur Gérard MELKI

Tél. : 02 99 33 69 64 - Fax : 02 99 33 68 78

E-MAIL : gérard.melki@univ-rennes1.fr