UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

U.F.R. DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

THESE

présentée par

NICOLAS HECK

en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

ETUDE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS LE DEVELOPPEMENT ET LES PATHOLOGIES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL :

ROLE DES COLLAGENES FIBRILLAIRES, DE PHOSPHACAN/RPTPβ ET DE LA TENASCINE-C

Commission d'examen :

Directeur de thèse Co-directeur de thèse Rapporteur interne Rapporteur externe Rapporteur externe Président du jury Prof. Andreas FAISSNER Dr. Elisabeth GEORGES-LABOUESSE Dr. Keith LANGLEY Prof. Hans-Werner MULLER Dr. Isabelle DUSART Prof. Rémy SCHLICHTER La matrice extracellulaire est l'ensemble des molécules extracellulaires qui forment une complexe tridimensionnel qui donnent au tissu son intégrité, sa structure, et ses propriétés mécaniques, et qui participent à la régulation des fonctions cellulaires. La matrice extracellulaire (MEC) du système nerveux central (SNC) est composée d'acide hyaluronique, de protéoglycans et de glycoprotéines, mais est dépourvue de collagènes. Ces protéines régulent les différents stades du développement en interagissant avec des récepteurs neuronaux. Au cours de ma thèse, j'ai développé plusieurs axes de recherche centrés sur la matrice extracellulaire dans le système nerveux central. 1 : J'ai analysé l'expression des collagènes par les astrocytes en culture et découvert des mécanismes inhibant cette expression. Cette étude permet d'expliquer l'absence de collagène dans le SNC. 2 : J'ai étudié l'expression des protéines de la MEC dans un modèle d'épilepsie. Cette étude montre que les protéines de la MEC pourraient participer à la régulation de l'épileptogenèse. 3 : J'ai participé à l'étude des mécanismes par lesquels la tenascine-C et phosphacan régulent la croissance neuritique. J'ai en particulier contribué à l'étude de PSI, une nouvelle isoforme de phosphacan, dans le développement du cortex. L'ensemble de ces travaux apportent des informations sur la composition de la MEC du SNC et sur son rôle au cours du développement et dans le contexte de pathologies.

The extracellular matrix (ECM) is a dynamic entity, constantly being remodelled, that provides support for cells and a framework for tissues. Cell-matrix interactions play critical roles in influencing almost all aspects of cellular behaviour, including cell migration, proliferation, tissue formation, and repair. The ECM of the central nervous system (CNS) is composed of hyaluronan, proteoglycans and glycoproteins but is devoid of collagens; these components participating in the regulation of developmental steps of the CNS. During my thesis work, I developed three research projects concerning the ECM of the CNS. 1 : I analysed the expression of collagens by astrocytes and discovered inhibitory mechanisms which may explain why the ECM of the brain is devoid of collagens. 2 : I studied the expression of ECM proteins in a model of epilepsy. From this study we can develop arguments which support the idea that ECM proteins are implied in epileptogenesis. 3 : I was involved in the study of the mechanisms by which phosphacan and tenascin-C contribute to the regulation of neurite growth. More precisely, I contributed to the analysis of the role which could be played by PSI, a new isoform of phosphacan, in the development of the cortex. Taken together, these results help to understand the composition and formation of the brain ECM and its roles during development and in pathologies.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Prof. Andreas Faissner, qui m'a donné la possibilité de travailler dans son laboratoire et m'a témoigné une grande confiance.

Le Dr. Elisabeth Georges-Labouesse a accepté d'être co-directrice de ma thèse, qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie le Dr. Keith Langley, qui a accepté d'évaluer mon travail de thèse en qualité de rapporteur interne.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements au Dr. Isabelle Dusart, qui a accepté de juger mon travail en temps que rapporteur externe.

I would like to thank the Prof. Hans-Werner Müller who, as a specialist of collagens in the brain, will undoubtfully give a interesting critical point of view on my thesis work.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Prof. Rémy Schlichter pour avoir accepté d'être une dernière fois juge de mon travail d'étudiant.

Mes vifs remerciements vont au Dr. Jeremy Garwood, qui m'a suivi au cours de ma thèse, m'a montré l'efficacité dans le travail et m'a guidé dans l'apprentissage de l'écriture de publications scientifiques. Merci, Jeremy, pour les nombreuses discussions non scientifiques.

C'est grâce au Dr. Yves Larmet que j'ai pu m'intéresser à l'étude de l'épilepsie, je tiens à l'en remercier.

Je remercie également le Dr. Alexandre Dobbertin, que j'ai connu lors de mon DEA et avec qui j'ai collaboré durant mon travail de thèse.

J'ai bénéficié, pour mes travaux de culture cellulaire, des connaissances, de l'expérience et de la patience du Dr. Gérard Labourdette ; je l'en remercie.

Je remercie le Dr. Guy Roussel, qui m'a guidé dans mes premiers pas d'histologiste.

Avec toute la gentillesse qui la caractérise, Monique Miehe m'a enseigné les bases de la microscopie électronique, je lui en suis reconnaissant.

Ma gratitude va également au Dr. Jean-Luc Dupont, qui a accepté de faire une lecture critique de mon introduction de thèse.

Je tiens aussi à remercier tous les chercheurs, enseignants-chercheurs, ingénieurs ou techniciens du Centre de Neurochimie qui m'ont de près ou de loin aidé dans mon travail de thèse : le Dr. Dominique Bagnard, le Dr. Guy Furhman, le Dr. Stéphane Gaillard, le Dr. Jean de Barry, le Dr. Pierre Hubert, le Dr. Gérard Crémel, le Dr. Eliane Mohier, le Dr. Francoise Eclancher, Martine Perrault, Guy Bombarde, Marie-France Knoetgen, Anne-Marie, les souvent oubliées mais indispensables secrétaires Claudine et Martine, le personnel de la laverie et de l'animalerie Séverine, Patricia et Sonia.

Merci à Catherine, qui m'a maintes fois secouru lorsque j'étais face à un ordinateur pour élaborer un poster ou un pdf.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr. Alain Lescure, qui, après ma licence, m'a introduit au monde de la recherche lors d'un stage d'été dont je garde un excellent souvenir.

Merci à...

Julien Sutter, compagnon de route depuis l'école primaire jusque dans les tréfonds de la thèse ; depuis les LEGO jusqu'à la construction de protéines de fusion, en passant par l'Ardèche et l'Inde, en compagnie de Romain Gary...

Valérie Calco, Amar Bennasroune et Fred Bernard pour les repas à la CA et les pauses café. Valérie, reste comme tu es ! Amar, tous mes vœux de bonheur à toi et Aline, et la gloire sur la terre battue. Fred, je te souhaite un belle vie en compagnie du petit Tom.

Franck Rigato, avec qui j'ai partagé le laboratoire, quelques soirées et les angoisses souvent fugaces, parfois tenaces, de la vie de thésard.

Julien et Marie, jeune couple de thésards dynamiques.

Merci aux chimistes ! Stéphane, Nigel, Mazen, Thierry, Stéphanie, Delphine, Céline et les autres...et tout particulièrement Djalil, pour les soirées en compagnie de Fred et Alex. Spéciale dédicace à Nigel et Youssef !

Patrick, qui est un compagnon de discussions scientifiques intenses et d'observations naturaliste et astronomique.

Tous les thésards de neuroscience pour un week-end des doctorants, des repas au HK et des jeudis soirs à la Giraf. Claire, Maude, Claire, Franck, Céline, Franck, Yoann, David, Alexandra et tous les autres...

+ les fous des rythmes Jérôme, Hugues, Florent, Benjamin, Stéphanie, Nathalia, Rosy, Cathy...

+ les thésards de l'IPCB Sandra, Amyaouche, Florence, Mathias, Riad, Lauriane, Maysa...

+ les jeunes doctorants du Centre de Neurochimie, Céline, Céline, Jenny, Christian, Isabelle, Katja, Michal...

+ les anciens doctorants du Centre de Neurochimie, Peggy, Pauline, Virginie, Marc, Yann, Nathalie, Catherine...

Les DEA, particulièrement Pascal et Fanchon.

Les forces vives du CNRS, les jeunes chercheurs Fred Doussau, Stéphane Gasman, Yannick Goumon, Nicolas Vitale...

Salut à tous les grimpeurs qui s'entraînent au centre universitaire. Deux heures d'escalade sont régénératrices après une journée au laboratoire.

La bande de ploucs, Sylvain et Céline, Julien, Jacques, Jean-Michel et Fabienne, David et Séverine, Cécile, pour les séminaires du mercredi, les vacances naturalistes en Ardèche et les discussions par mail sur les différents concepts évolutionnistes...

Christophe et Anne-Catherine, Sylvie, Isabelle et Yannick, Isabelle, Thibaut, Fred, Cathy et Laurent, Elodie...pour les soirées d'anniversaire, le gâteau breton, les soirées au caveau et au bateau, les promenades dominicales....

Merci à cortex records et longue vie aux Happy Boozer ! Lol, Laurent, Licinio, Antonio, Eric, Jean et tous les autres...

Sébastien, pour the Art of Noise and the Monty Python Flying Circus !

Tous les jeunes étudiants qui sont passés par le club d'astronomie de l'Institut de physique : ARTEMIS. Salut aux anciens du club Mathieu, Fred, Christian, Joëlle, Sébastien, Marc, Arnaud, Baptiste, Guillaume...

Stéphane Fauvaud, qui m'a initié à l'astronomie amateur « sérieuse » mais surtout passionante. L'astéroïde Arsinoe 404 a une période de rotation de 8,93 heures.

Les membres de la Société Alsacienne d'Entomologie, messieurs Matter, Callot, Schott, Matt, Vogel, Brua...

Les joueurs de go du Cardek, Daniel, César et Myriam, Kei, Grégory...

...tous ceux avec qui j'ai partagé de très beaux moments, scientifiques ou non.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Edward Ka-Spell, Dirk Ivens, David Tibet, Christian Renou, Brian Lustmord, Andrew Lagowsky Lisa Gerrard, John Balance, cevin Key, Dan Burke, mais aussi Ken Zuckermann, Pandit Ram Narayan, Nusrat Fateh Ali Khan, et bien sûr Mano Solo, les Têtes Raides et Christophe Miossec ; qui m'ont parfois accompagné dans mon travail...

Un très grand merci à Anina, qui a été si patiente durant mon travail d'écriture...

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Mon travail de thèse a été réalisé au Centre de Neurochimie de Strasbourg sous la direction du Prof. Andreas Faissner. Ce travail s'inscrit dans le contexte de l'étude de la matrice extracellulaire dans le développement du système nerveux central et des pathologies associées.

La matrice extracellulaire du système nerveux central est formée d'un complexe moléculaire essentiellement composé d'acide hyaluronique, de protéoglycans et de glycoprotéines. C'est au travers de cette matrice que se fait la communication cellulaire. Ainsi, la diffusion de facteurs de croissance est dépendante de la composition et de la structure de la matrice. La matrice extracellulaire joue un rôle fondamental dans le développement du système nerveux central. Lors du développement, les protéines de la matrice participent notamment à la régulation de la migration cellulaire et de la croissance axonale. Il est donc important de connaître les protéines constituant la matrice, d'étudier leur localisation, de caractériser leur expression par les cellules gliales et les neurones et de comprendre comment elles participent à la régulation des différentes étapes du développement.

Pour mon travail de thèse, j'ai travaillé avec des chercheurs et des étudiants sur différents projets, ces projets ayant pour but de caractériser la composition de la matrice extracellulaire du système nerveux central, son origine cellulaire, les mécanismes de régulation de sa formation et le rôle des protéines de la matrice dans la régulation de la croissance axonale. Ces études ont été ciblé sur trois protéines : le collagène fibrillaire, le protéoglycan phosphacan/RPTP β et la glycoprotéine tenascine-C. Ces trois protéines appartiennent à trois classes de protéines de la matrice extracellulaire : les protéines fibrillaires, les protéines et les glycoprotéines.

Mon travail personnel s'est principalement axé sur l'étude de l'expression des collagènes fibrillaires par les astrocytes et les mécanismes de régulation de cette expression.

Dans les études sur phosphacan/RPTP β et tenascine-C, j'ai contribué à l'étude de la localisation des ces protéines *in vivo* par immunohistochimie et hybridation *in situ* et à la caractérisation de leur expression par les cellules gliales en culture. J'ai réalisé des études de croissance neuritique afin de caractériser le rôle de ces protéines dans la régulation de la croissance neuritique. Ces travaux permettent de corréler l'observation de l'expression des

protéines et des effets de ces protéines sur la croissance neuritique avec les phénomènes cellulaires qui se déroulent durant les étapes du développement du système nerveux central.

De nombreuses études ont mis en évidence un rôle central pour les protéines de la matrice dans différentes pathologies. Dans ce contexte, j'ai travaillé en collaboration avec le Dr. Yves Larmet pour étudier l'expression de protéines de la matrice extracellulaire dans un modèle murin de l'épilepsie du lobe temporal.

Dans leur ensemble, ces travaux concernent les différents types de protéines de la matrice. Ils apportent des informations sur leur expression et leur localisation, montrant que la matrice est composée d'un ensemble complexe de protéines qui est spécifique au système nerveux central. Ils aident à la caractérisation de leur rôle dans la régulation de la croissance axonale. Enfin, ils mettent en perspective l'implication de la matrice dans certaines pathologies du système nerveux central.

La présente thèse représente l'ensemble de mon travail. Dans une première partie, une introduction rappelle les connaissances apportées par la littérature scientifique et permet de placer mon travail dans un cadre thématique. Un chapitre de livre, à l'écriture duquel j'ai participé, complète l'introduction. Dans une deuxième partie, les résultats obtenus durant ma thèse sont présentés sous la forme d'articles scientifiques précédés d'une introduction qui énonce la question, décrit la démarche suivie et discute de la signification des résultats. L'apport de ces résultats à la connaissance et à la compréhension de la matrice extracellulaire est ensuite présenté dans la discussion. Les méthodes que j'ai utilisées pour mon travail de thèse sont présentées en annexe.

Enfin, un chapitre de livre et une revue, à l'écriture desquels j'ai participé et qui font un état de la question concernant les rôles de phosphacan/RPTP β et de la tenascine-C dans le développement et dans les pathologies du système nerveux central sont donnés en annexe.

PRESENTATION DU MANUSCRIT

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Complément à l'introduction :

manuscrit 1 « The Extracellular Matrix in Neural Development, Plasticity, and Regeneration »

ETUDE DE L'EXPRESSION DES COLLAGENES FIBRILLAIRES

Introduction

Manuscrit 2 « Astrocytes express fibrillar collagens in culture »

Manuscrit 3 « The absence of collagen fibers is a unique property of the brain extracellular matrix which depends on crosstalk between astrocytes and meningeal cells and implies the EGF pathway »

LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS L'EPILEPSIE

Introduction Manuscrit 4 « Extracellular matrix molecules are upregulated in a murine model of temporal lobe epilepsy »

ETUDE DE PSI, UNE NOUVELLE ISOFORME DE PHOSPHACAN/RPTPβ

Introduction Manuscrit 5 « Phosphacan Short Isoform, a novel non-proteoglycan variant of phosphacan/RPTP- β , that can also interact with neuronal receptors and promote neurite outgrowth » Figures supplémentaires

ETUDE DE PHOSPHACAN/RPTPβ DANS LES LESIONS

Introduction Manuscrit 6 « Regulation of RPTPß/Phosphacan expression and glycosaminoglycan epitopes in injured brain and cytokine-treated glia »

ETUDE DE LA TENASCINE-C DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'HIPPOCAMPE

Introduction

Manuscrit 7 « Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced Fibronectin Type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/Contactin »

DISCUSSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

LA TENASCINE-C ET PHOSPHACAN/RPTPβ DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA REGENERATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Manuscrit 8 : « DSD-1-proteoglycan/phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatasebeta isoforms during development and regeneration of neural tissues »

Manuscrit 9 « Tenascin glycoproteins and the complementary ligand DSD-1-PG/phosphacan - structuring the neural extracellular matrix during development and repair »

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

METHODES

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1. PRESENTATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	1
1.1. Définition générale	1
1.2. Caractéristiques de la matrice extracellulaire dans le système nerveux central	1
 1.3. Les membranes basales, la <i>glia limitans</i>. 1.3.1. Barrière hémato-encéphalique 1.3.2. La pie mère. 1.3.3. La <i>glia limitans</i>. 1.3.4. La membrane basale. 	3 4 4 5
2. COMPOSITION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	7
2.1. Protéoglycans	7
2.2. Glycoprotéines	8
3. STRUCTURE ET ORGANISATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	DU 10
 3.1. Une approche : volume, diffusion et <i>tortuosity</i>	10 10 oorte 11
 3.2. Une autre approche : le cartilage comme modèle. 3.2.1. Certaines propriétés de la matrice extracellulaire du cartilage sont communes à celles du système nerveux central. 3.2.2. Observation par microscopie électronique. 	12 12 14
3.3. Matrice péricellulaire	14
4. COLLAGENE FIBRILLAIRE, PHOPSHACAN/RPTPβ ET TENASCINE-C	16
4.1. Collagènes.4.1.1. Collagènes fibrillaires.	16 16
4.1.1.1. Présentation	16

4.1.1.2. Domaine triple hélice	.16
4.1.1.3 . Procollagène	.18
4.1.1.4. Clivage des propeptides	18
4.1.1.5. Formation des fibres	19
4.1.1.6. Récepteurs	.20
4.1.1.7. Expression dans le système nerveux central	.21
4.1.2. Autres types de collagènes dans le système nerveux central	.22
4.1.2.1. Collagène de type IV	.22
4.1.2.2. Collagène de type XIX	.23
4.1.2.3. Collagène de type VIII	.23
4.1.2.4. Collagène de type XIII	.23
4.2. Phosphacan/RPTPβ	.24
4.2.1. Présentation	.24
4.2.2. Structure	24
4.2.3. Localisation	.25
4.2.4. Expression cellulaire	27
4.3. Tenascine-C	.28
4.3.1. Présentation	.28
4.3.2. Expression	29
5. FONCTIONS ASSOCIEES AUX PROTEINES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	30
5.1. Degulation de la graiggenes avonals	21
5.1. Regulation de la croissance avonale	.31
5.1.2. Dégulation de la fassiculation	22
5.1.2. Regulation de frontières	.32
5.2. Rôle de la tenascine-C dans le développement du SNC	.33
5.3. Rôle de phosphacan/RPTPβ dans le développement du SNC	.34
5.4. Rôle des protéines de la matrice dans la formation et le maintien du nœud de Ranvier	.37
5.5. Protéines de la matrice et régulation de l'activité neuronale	.38
6. LES MECANISMES MOLECULAIRES DE LA CROISSANCE AXONALE	.40
6.1. Intégrines	40
6.2. Molécules d'adhésion cellulaire CAMs	41
6.3. Les protéines de la MEC, en interagissant avec leurs récepteurs, régulent les mouveme du cytosquelette	ents .43
6.4. Les mécanismes de la migration cellulaire	.44

6.7. Les protéines de la matrice participent-elles au contrôle de la direction de le croissance	
des axones ?	46

COMPLEMENT A L'INTRODUCTION GENERALE

manuscrit 1

« The Extracellular Matrix in Neural Development, Plasticity, and Regeneration »

RESULTATS

ETUDE DE L'EXPRESSION DES COLLAGENES FIBRILLAIRES

1. Introduction	49
2. Production de l'anticorps F1C3	50
3. Les astrocytes expriment des collagènes en culture	50
4. Caractérisation de l'antigène	51
5. Les astrocytes ne forment pas de fibres de collagène	52
6. Expression des collagènes fibrillaires in vivo	53
7. Les cellules des méninges inhibent l'expression des collagènes par les astrocytes	53
8. Mise en évidence d'une boucle autocrine inhibitrice dépendante du récepteur de l'EGF	54
8.1. L'EGF inhibe l'expression des collagènes	54
8.2. L'EGF agit sur les astrocytes par une voie autocrine	55
8.3. Les méninges inhibent l'expression l'expression des collagènes	
indépendamment de l'EGF	55
9. Conclusion	
10. Perspectives.	. 57
10.1. Inhibition par les cellules des méninges, un rôle pour SDF-1 ?	57
10.2. Existe-il une régulation de la fibrillogenése dans le SNC ?	57
10.3. Les astrocytes réactifs expriment-ils des collagènes ?	

Manuscrits 2 et 3

« Astrocytes express fibrillar collagens in culture »

« The absence of collagen fibers is a unique property of the brain extracellular matrix which depends on crosstalk between astrocytes and meningeal cells and implies the EGF pathway »

LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS L'EPILEPSIE

1. Epilepsie : définition générale	59
2. Epilespie mésiale du lobe temporale	59
3. Description du modèle	60
4. Etude de la matrice extracellulaire dans l'épilepsie	61
5. La matrice extracellulaire dans les modèles d'épilepsie	62
6. Méthodologie	62
7. Résultats	62
8. Discussion.	63
9. Perspectives	63

Manuscrit 4

« Extracellular matrix molecules are upregulated in a murine model of temporal lobe epilepsy »

ETUDE DE PSI, UNE NOUVELLE ISOFORME DE PHOSPHACAN/RPTPβ

1. Introduction	65
2. Mise en évidence d'une nouvelle isoforme de phosphacan/RPTPβ : PSI	65
3. Caractérisation de la nouvelle isoforme	66
4. PSI interagit avec F3 et L1 et régule la croissance neuritique	66
5. PSI est exprimée par les neurones corticaux	67
5.1 Méthodologie	67
5.2. Expression dans le cortex	68
5.3. Expression dans le cervelet	70
5.4.PSI est exprimée par les neurones en maturation	71
6. PSI régule négativement l'effet promoteur de phosphacan	71
6.1. PSI présente dans le milieu de culture bloque les effets de phosphacan	
sur la croissance neuritique	71
6.2. Problèmes soulevés	73
6.2.1. Interaction homophilique entre PSI et phosphacan	73
6.2.2. Quel récepteur est impliqué ?	74
6.2.3. Expression neuronale de PSI en culture	74
7. Proposition d'un modèle expliquant les fonctions de PSI dans le cortex postnatal	75
7.1. Durant le développement embryonnaire, phosphacan participe à	
la régulation de la croissance axonale	75
7.2. Durant la période postnatale, les neurones bloquent l'action de phosphacan	
en exprimant PSI	75
7.3. Mécanismes moléculaires potentiels	75
8. Conclusions et perspectives	
8.1. Les neurones en maturation bloquent l'action de phosphacan en secrétant PSI.	
8.2. PSI pourrait participer a la regulation de la myelinisation	//

Manuscrit 5

« Phosphacan Short Isoform, a novel non-proteoglycan variant of phosphacan/RPTP- β , that can also interact with neuronal receptors and promote neurite outgrowth »

ETUDE DE PHOSPHACAN/RPTPβ DANS LES LESIONS

1. Introduction		79
2. But de l'étude	3	80
3. Résultats		80
4. Conclusions		81
4. Conclusions		81

Manuscrit 6

« Regulation of RPTPß/Phosphacan expression and glycosaminoglycan epitopes in injured brain and cytokine-treated glia »

ETUDE DE LA TENASCINE-C DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'HIPPOCAMPE

1. Introduction	
2. But de l'étude	
3. Résultats	
4. Conclusions	83

Manuscrit 7

« Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced Fibronectin Type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/Contactin »

DISCUSSION

1. Résumé des résultats	85
2. Composition et formation de la matrice extracellulaire	86
2.1. Formation de la matrice extracellulaire	86
2.2. La composition de la matrice extracellulaire correspond à	
des propriétés biophysiques particulières	88
3. La tenascine-C et phosphacan participent à la régulation de la croissance axonale	89
3.1. Les arguments en faveur	89

3.1.1. La tenascine-C et phosphacan sont localisés dans les structures où	
se fait la mise place des voies nerveuses	89
3.1.2. La tenascine-C et phosphacan modifient la croissance	
neuritique en culture	89
3.1.3. La tenascine-C et phosphacan sont des ligands pour	
les molécules d'adhésion cellulaire	90
3.2. Mécanismes moléculaires de la régulation de la croissance	
neuritique par phosphacan/RPTPβ	90
3.3. Conclusions et perspectives	91
3.3.1. Pluralité des récepteurs et pluralité des ligands	92
3.3.2. Régulation par les sucres.	92
3.3.3. Interactions des protéines de la matrice extracellulaire	93
4. Expression des protéines de la matrice extracellulaire dans les pathologies	93
4.1. Les molécules de la MEC sont exprimées dans un contexte de pathologies	93
4.2. Y a-t-il réapparition des processus développementaux chez l'adulte ?	94

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

LA TENASCINE-C ET PHOSPHACAN/RPTPβ DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA REGENERATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Manuscrit 8 : « DSD-1-proteoglycan/phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatasebeta isoforms during development and regeneration of neural tissues »

Manuscrit 9 : « Tenascin glycoproteins and the complementary ligand DSD-1-PG/phosphacan - structuring the neural extracellular matrix during development and repair »

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

METHODES

1. Immunohistochimie	
1.1. Préparation des tissus et obtention des coupes	112
1.1.1. Préparation du tissu	112

1.1.2. Préparation de coupes cryostats	113
1.1.3. Préparation de coupes vibratomes	113
1.2. Immunohistochimie	.113
2. Immunohistochimie avec l'anticorps F1C3	114
2.1. Préparation de coupes paraffine	115
2.2. Méthodes de préparation de tissu	115
2.2.1. Immunohistochimie sur tissu non fixé	115
2.2.2. Immunohistochimie sur tissu postfixé	.116
2.2.3. Immunohistochimie sur tissu fixé par les sels de zinc	.116
2.2.4. Immunohistochimie sur tissu postfixé à l'acétone	.116
2.3. Restauration de l'antigène	117
2.3.1. Technique classique de restauration de l'antigène	117
2.3.2. Technique de digestion enzymatique	117
2.3.3. Technique de dénaturation sur coupe	117
3. Hybridation <i>in situ</i>	.118
3.1. Protocole	118
3.2. Paramètres à cosidérer dans l'élaboration du protocole	119
3.3. Contrôle de la spécificité des signaux	120
3.4. Utilisation de la sonde PSI	120
3.5. Tampons utilisés	121
3.6. Préparation des sondes	121
4. Test de croissance neuritique	122
5. Culture cellulaire	124
5.1. Préparation du support de culture	124
5.2. Culture d'astrocytes	124
5.3. Culture de cellules des méninges	124
5.4. Coculture astrocytes – cellules des méninges	125
5.5. Culture de neurones corticaux	.125
5.6. Traitement des cultures	.125
5.7. Immunocytochimie	126
6. Techniques de biochimie et de biologie moléculaire	.126
6.1. Préparation de lysat cellulaire et de milieu conditionné	126
6.2. Traitement des lysats cellulaires	127
6.3. Western blot	.127
6.4. Technique de la PCR	128
Annexe : liste des anticorps, amorces et sondes	129

INTRODUCTION



Figure 1. Représentation schématique de la matrice extracellulaire et des mécanismes d'adhésion cellulaire dans les différents tissus des mammifères

La matrice extracellulaire correspond au réseau moléculaire formé dans l'espace extracellulaire. Elle est formée de fibres (collagènes, fibronectine), d'acide hyaluronique, de protéoglycans portant des chaînes glycosaminoglycans, de glycoprotéines. Ces molécules interagissent avec des récepteurs liés au cytosquelette (intégrines, molécules d'adhésion cellulaire CAMs). Des CAMs peuvent aussi interagir de manière homophilique.

INTRODUCTION

1. PRESENTATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

1.1. Définition générale

D'une manière générale, sans considérer les spécificités des différents tissus de l'organisme, on peut définir la matrice extracellulaire (MEC) comme un réseau de macromolécules sécrétées par les cellules et qui remplit l'espace extracellulaire (Figure 1). On peut distinguer deux types de composants de la MEC : les éléments fibrillaires comme les collagènes et la fibronectine, et les éléments non fibrillaires. Les éléments non fibrillaires sont l'acide hyaluronique, les protéoglycans et certaines glycoprotéines. Ces molécules interagissent entre elles pour former un réseau moléculaire dans l'espace extracellulaire ; c'est dans ce réseau que s'organise la communication intercellulaire. L'organisation en réseau de la matrice extracellulaire permet le maintien de l'intégrité du tissu et lui donne ses propriétés biomécaniques. Les protéines de la matrice extracellulaire et la migration cellulaire, mais des études récentes ont montré que les protéines de la MEC participent aussi à la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire. Enfin, l'ensemble de ces mécanismes est régulé par des protéases spécifiques qui modulent la matrice extracellulaire ; celle-ci n'est donc pas un ensemble figé de molécules, mais plutôt un complexe dynamique.

1.2. Caractéristiques de la matrice extracellulaire dans le système nerveux central

D'une manière générale, la matrice extracellulaire (MEC) des tissus des mammifères est composée de fibres (collagènes, fibronectine) associées à un réseau formé de protéoglycans, de glycoprotéines et d'un polysaccharide, l'acide hyaluronique. Cependant, la MEC de chaque tissu présente des caractéristiques spécifiques. Le système nerveux central (SNC), comme tous les autres tissus de l'organisme, présente une MEC, mais celle-ci a une composition unique qui lui donne des propriétés spécifiques.

D'un point de vue historique, le SNC a d'abord commencé par être considéré comme un tissu dépourvu de MEC. En effet, la matrice extracellulaire a tout d'abord été définie comme « la structure extracellulaire observable en microscopie électronique » (cette définition est dépendante de la technique d'observation et correspond aux fibres de collagènes et à la membrane basale), et les premières études du SNC par microscopie électronique ne donnaient pas ces structures à l'observation. Les techniques classiques de fixation provoquent un retrécissement de l'espace extracellulaire et seules des techniques de fixation spécifiques permettent d'observer un espace extracellulaire entre les cellules du SNC (Figure 2) (Van Harreveld and Steiner, 1970a, b; Bignami et al., 1993). De plus, les jonctions de type GAP qui lient les astrocytes font que l'espace extracellulaire est très réduit dans le SNC. Cependant, des extractions montrent la présence de l'acide hyaluronique et de protéoglycans de type chondroitine sulfate (Margolis et al., 1975), qui sont des molécules typiques des MEC d'autres tissus. S'il est juste de dire que le SNC apparaît comme un tissu dépourvu d'une MEC dont l'organisation est directement observable, l'existence de celle-ci n'est pas contestable. Bien que les astrocytes soient liés par des jonctions de type gap, avec pour conséquence la réduction de l'espace extracellulaire, certains auteurs estiment que l'espace extracellulaire représenterait 20% du volume total du cerveau (Nicholson, 1995).

La MEC du SNC présente une propriété unique : elle ne contient pas d'éléments fibrillaires. Les fibres de collagènes sont absentes du SNC, et la fibronectine, qui est exprimée dans la période embryonnaire, ne semble pas former de fibres. On observe de plus que la majorité des protéines de la MEC peuvent être extraites du SNC en l'absence de détergents, ce qui indique une grande solubilité. Dans les autres tissus, l'extraction des protéines de la MEC nécessite l'utilisation de détergents.

C'est l'absence d'éléments fibreux et la fragilité du complexe moléculaire (illustrée par sa grande solubilité) qui font que la MEC du SNC est différente de toutes les autres matrices chez les mammifères (Hockfield, 1996). C'est aussi pour cette raison qu'une image particulière de cette matrice est souvent donnée :

« ...these spaces...in three dimensions...resemble the water phase of a foam. » S.W. Kuffler et D.D. Potter (in Journal of Neurophysiology, vol 27 : 224-257, 1964).



Figure 2. Observation de l'espace extracellulaire dans le système nerveux central

Le cortex de rat observé par la technique de microscopie électronique permet de visualiser l'espace extracellulaire, ici coloré en rouge.

En réalité, l'observation de l'espace extracellulaire du SNC est dépendante des techniques de fixation. Seules des techniques de fixation spécifiques permettent de conserver le volume extracellulaire du tissu, qui représente 20% du volume total du cerveau chez le rongeur.

P : élément présynaptique ; S : élément postsynaptique ; Barre=1µm

in Nicholson et Sykova 1998 TINS 21:207

Cette description a été reprise par C. Nicholson et E. Sykova (in Trends in Neurosciences, vol 21 : 20-215, 1998) :

« The neurons and glial cells of the brain are mingled together in an opaque mass with the consistance of soft jelly ».

Malgré cela, la MEC du SNC présente une grande variété de protéines (cf. chapitre 2) qui forment un réseau moléculaire (cf. chapitre 3) et participent à la régulation de nombreuses fonctions cellulaires, particulièrement lors du développement (cf. chapitre 5).

Si la MEC du SNC est unique, on note cependant qu'une MEC spécialisée présente dans de nombreux autres tissus, la membrane basale, est présente en des localisations précises du SNC : sous les méninges et aux pôles basaux des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. La présentation des membranes basales du SNC est importante pour introduire les travaux de ma thèse concernant l'expression des collagènes fibrillaires (manuscrits 2 et 3).

1.3. Les membranes basales, la glia limitans

Le SNC est séparé du système vasculaire par la barrière hémato-encéphalique ; et du liquide cérébrospinal par l'épendyme sur sa surface interne et par la pie mère sur sa surface externe. L'isolement du SNC est assuré par une couche cellulaire spécialisée – la *glia limitans* - associée à une MEC spécialisée - la membrane basale. Plus particulièrement, on trouve une membrane basale sous-jacente aux cellules des méninges dans la pie mère ; et une lame basale sous-jacente aux cellules endothéliales autour des vaisseaux sanguins pénétrant le SNC. Ainsi, une MEC spécialisée sépare le SNC des autres tissus et des spécialisations morphologiques astrocytaires sont associées à cette MEC.

1.3.1. Barrière hémato-encéphalique

Les vaisseaux sanguins qui pénètrent dans le SNC sont entourés de cellules endothéliales et de péricytes. La diffusion de molécules au travers de l'endothélium est très limitée, cette restriction s'explique par la présence de jonctions serrées (*tight junctions*) entre les cellules endothéliales. Une lame basale est présente au pôle apical des cellules endothéliales et des pieds astrocytaires sont placés contre la lame basale de l'endothélium (Figures 3 et 4) (Keep, 2002).

1.3.2. La pie mère

A la surface externe du SNC se trouve un ensemble cellulaire complexe. En partant du SNC, on trouve la pie mère, la subarachnoïde où circule le liquide cérébrospinal, l'arachnoïde et enfin la dure mère (Figure 5). Une membrane basale est localisée entre le tissu nerveux et la pie mère. La formation de la pie mère commence aux jours 13-14 chez la souris et 14-16 chez le rat, avec la mise en place des cellules des méninges. La pie mère est mature au 21^{ème} jour postnatal. Les cellules des méninges sont de type mésenchymateuse, elles sont proches de fibroblastes. Sous les cellules des méninges se trouve la *lamina fibroreticularis* formée des fibres de collagènes (Figure 8), puis une lame basale classique (Figure 6 et 7). Sous la lame basale se place la *glia limitans*.

1.3.3. La glia limitans

Le contact du tissu nerveux avec la membrane basale placée sous la pie mère est établi par les pieds astrocytaires qui forment une *glia limitans* (Bigio, 2002).

La *glia limitans* est composée par des astrocytes qui projettent des pieds astrocytaires contre la membrane basale. Les pieds astrocytaires sont enchevêtrés en couches, ces processus cellulaires se placent de façon parallèle à l'extérieur du SNC. L'épaisseur de cette couche varie de 1 à 20 microns, selon la localisation dans le tissu et selon les espèces considérées. Les pieds astrocytaires ont un cytosquelette riche en filaments intermédiaires, dont la *Gliary Filament Associated Protein* (GFAP). Les pieds astrocytaires sont associés par des jonctions de type gap principalement composées de la connexine-43. De plus des protéines de contact cellulaire de la famille des cadherines sont exprimées. Enfin, les pieds astrocytaires sont associés à la membrane basale par des hemidesmosomes – c'est à dire des cadherines associées au filaments intermédiaires.

La formation de la *glia limitans* débute avec la projection des prolongements cellulaires de la glie radiaire, qui rejoignent le pôle apicale (correspondant à la zone ventriculaire) et le pôle basal du neuroépithélium. Le pôle basal, qui est la jonction entre le neuroépithélium et les autres tissus de l'embryon, présente une membrane basale dès le jour



Figure 3. Les pieds astrocytaires enveloppent les vaisseaux sanguins

L'astrocyte projette un « pied » et enveloppe le vaisseau sanguin. La membrane de l'astrocyte est surlignée en noir afin de faciliter la visualisation.

Observation du tissu nerveux par microscopie électronique.

A : astrocyte ; C : vaisseau sanguin ; barre=4µm ; néocortex de lapin.

In www. synapses.bu.edu/atlas



Figure 4. Une lame basale est présente sous les pieds astrocytaires

Schéma montrant les pieds astrocytaires entourant un vaisseau sanguin. Une lame basale est présente sous les pieds astrocytaires.

E : cellule endothéliale ; P : péricyte ; A : astrocyte ; BM : lame basale

Allt et Lawrenson 1997 BrResRev 24:67



Figure 5. Organisation du tissu entourant le système nerveux central

Coupe histologique montrant l'organisation des tissus entourant le système nerveux central. Le tissu nerveux est entouré, dans l'ordre, de la pie mère, de l'arachnoïde et de la dure mère. Entre la pie mère et l'arachnoïde se trouve la subarachnoïde où circule le liquide cérebrospinal. Une membrane basale est présente entre le tissu nerveux et la pie mère. (bv=vaisseau sanguin).

In ww.views.vcu.edu/ana





Figure 6. Une lame basale est présente entre la glia limitans et les méninges

La lame basale à la surface du cortex est indiquée par les flèches en a et b. La lame basale est visualisée par la présence de laminine (a) et de dystrophine (e), une protéine cytosolique interagissant avec dystroglycan.

La glia limitans correspond a un alignement des pieds astrocytaires sous la lame basale. Cette glia limitans est visualisée par une expression de GFAP (b).

La laminine (a) et la dystrophine (indiquée par une flèche en e) sont aussi présentes au niveau des vaisseaux sanguins. Cela montre qu'une lame basale est aussi présente au niveau des vaisseaux sanguins.

In Moore et al. 2002 Nature 418:422



Figure 7. Ultrastructure de la glia limitans et des cellules des méninges

Une lame basale (indiquée par la flèche) est présente contre les pieds astrocytaires de la *glia limitans* (A), sous les cellules des méninges de la pie mère (N). La lame basale est une matrice spécialisée qui est visible en microscopie électronique car elle est opaque aux électrons.

Observation par microscopie électronique ; barre=0,5µm ; néocortex de lapin

In www.synapses.bu.edu/atlas



Figure 8. Des fibres de collagènes sont présentes au niveau des méninges

Cellule des méninges observée en microscopie électronique. On observe des fibres de collagènes

indiquées par les flèches. On observe donc une membrane basale complète (composée d'une lame basale et de fibres de collagènes) au niveau des méninges. Pie mère entourant le cortex du rat au 7ème jour postnatal.

Observation personnelle

embryonnaire 10 chez la souris, 12 chez le rat et à la sixième semaine chez l'homme. La glie radiaire forme une *glia limitans* contre cette membrane basale, avec l'apparition de la GFAP dans les terminaisons gliales au jour 14 chez la souris et le rat. Au jour 16, la protéine S100, caractéristique des terminaisons des prolongements gliaux, est présente. Dans la période postnatale, la glie radiaire se transforme en astrocytes et de nouveaux astrocytes sont générés dans la zone ventriculaire, ils vont migrer pour se positionner dans l'ensemble du tissu nerveux (Hatten, 1999). La mise en place de jonctions de type gap entre les astrocytes se fait dans la période postnatale.

1.3.4. La membrane basale

On définit la membrane basale comme la MEC spécialisée qui se trouve entre un épithélium et des cellules du mésenchyme. La membrane basale est constituée d'une lame basale (*lamina densa, basal lamina*), produite par les cellules épithéliales, et d'une *lamina fibroreticularis (reticular lamina*), produite par les cellules du mésenchyme. En l'absence de cellules mésenchymateuses, les cellules épithéliales produisent seulement une lame basale. Les termes de membrane basale et lame basale sont parfois utilisés comme synonymes, mais cela ne devrait être le cas que lorsque la *lamina fibroreticularis* est absente de la membrane basale. Les membranes basales du SNC semblent identiques à celles observées dans d'autres tissus, qui ont été étudiés en plus de détail.

La lame basale est composée d'un grand nombre de protéines, parmi lesquelles le collagène de type IV et la laminine, ces deux molécules formant indépendamment deux types de polymères typiques de la lame basale (Figure 9) (Yurchenco and Schittny, 1990).

Les autres composants de la membrane basale sont les protéoglycans perlecan, bamacan, agrin, les protéines nidogen/entactine, fibuline ou encore le *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein* (SPARC) (Timpl and Brown, 1996). L'entactine joue un rôle fondamental dans la mise en place de la structure de la lame basale. La laminine interagit avec l'entactine pour former un complexe stable ; l'entactine présente aussi une forte affinité pour le collagène de type IV. L'entactine va être le lien entre les polymères de laminine et les polymères de collagène IV, donnant à la membrane basale une structure spécifique. L'entactine interagit aussi avec perlecan et la fibuline, elle est donc la protéine qui réunit les principales molécules de la lame basale en un réseau (Figure 10) (Yurchenco and O'Rear, 1994). Perlecan est un élément essentiel des membranes basales. Ce protéoglycan de type heparan sulfate, d'abord considéré comme absent du SNC, a été localisé au niveau des plexus choroïde et de la lame basale des cellules endothéliales (Hartmann and Maurer, 2001). Perlecan interagit avec les protéines entactine, laminine et fibronectine et collagène IV en plus de s'auto-agréger (Knudson and Knudson, 2001). L'observation de souris déficientes pour le gène codant perlecan a montré que ce protéoglycans est nécessaire au développement. Ces souris développent une exencéphalie et des ectopies neuronales (Costell et al., 1999). La lame basale est liée aux cellules par des récepteurs transmembranaires qui interagissent avec le cytosquelette (Figure 9 et 10). Les récepteurs impliqués sont dystroglycan et les protéines de la famille des intégrines. L'ancrage des cellules sur la basal lamina semble nécessaire au maintien de la structure extracellulaire puisque les souris *knock-out* de dystroglycan et β 1 intégrine présentent des lame basales déficientes (Colognato and Yurchenco, 2000).

La *lamina fibroreticularis* est produite par les cellules du mésenchyme. Elle est principalement constituée de fibres de collagènes. Les collagènes présents appartiennent à la familles de collagènes fibrillaires (cf. chapitre 4.1.).



Figure 9. Les protéines de la lame basale

Les molécules qui forment la lame basale sont : la laminine, le collagène de type IV, perlecan et l'entactine. Dystroglycan est un récepteur pour la laminine, les intégrines interagissent avec la laminine, le collagène et perlecan. « Anchor » représente des autres récepteurs dont l'identification est encore incomplète.

In www.orion.umdnj.edu ; Yurchenco PD



Figure 10. Représentation du complexe moléculaire formant la lame basale

La lame basale est un réseau moléculaire organisé. Les protéines de la lame basale qui forment des polymères sont la laminine et le collagène de type IV. Ces polymères sont liés par l'entactine. De plus ils interagissent avec le protéoglycan perlecan. A la surface des cellules, les récepteurs interagissent avec les molécules pour stabiliser le complexe.

In <u>www.orion.umdnj.edu</u>; Yurchenco PD

2. COMPOSITION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

La membrane basale des méninges et la lame basale des vaisseaux sanguins sont des matrices extracellulaires spécialisées, composées d'un réseau moléculaire organisé et relativement bien connu (cf. chapitre 1.3.). Mais les membranes basales ont une localisation très restreinte et la MEC du SNC qui englobe les neurones et les cellules gliales présente une composition différente. Contrairement aux autres tissus, le SNC ne contient pas de fibres de collagènes. La MEC du SNC est composée d'acide hyaluronique, de protéoglycans et de glycoprotéines. Dans ce chapitre, les principales caractéristiques de ces types de protéines sont présentées.

2.1. Proteoglycans

Les protéoglycans (PGs) sont des protéines portant des chaînes glycosaminoglycans (GAGs). Les GAGs sont des polysaccharides sulfatés composés d'un motif disaccharidique répété 40 à 100 fois en moyenne (Ruoslahti, 1988; Kjellen and Lindahl, 1991). Un motif disaccharidique a un poids moléculaire moyen de 440 kD. On distingue quatre types de GAGS : chondroitine/dermatan sulfate ; heparan sulfate/heparine et keratan sulfate. Chaque type correspond à un dimère différent :

Chondroitin : acide glucuronique - N acétylgalactosamine

Heparan : acide glucuronique - N acétylglucosamine

Keratan : galactose - N acétylglucosamine

Les GAGs sont susceptibles de subir des modifications telles des sulfatations ou acétylations. Des isomérisations sont aussi possibles, l'acide glucuronique des chondroitine sulfate peut être changé en acide iduronique, donnant un motif de type dermatan sulfate.

L'acide hyaluronique est aussi un glycosaminoglycan, mais il n'est pas attaché à un corps protéique. C'est un polysaccharide qui est très abondant dans le SNC. Contrairement aux autres GAGs, il est synthétisé à la surface externe de la membrane plasmique et ne porte pas de groupements sulfates. Il peut interagir avec les astrocytes par le récepteur CD44 (Lee and Spicer, 2000; Sherman et al., 2002).



Figure 11. Les protéoglycans sont des protéines portant des chaînes glycosaminoglycans

Les protéoglycans présentent un corps protéique modifié par l'addition de sucres. Les chaînes glycosaminoglycans sont linéaires, ce qui implique l'occupation d'un volume important. Des modifications de type N et O-glycosylations peuvent aussi intervenir. Le protéoglycan présenté ici est phosphacan.



Figure 12. Les chaînes glycosaminoglycans sont des disaccharides répétés

Les chaînes glycosaminoglycans sont liées au corps protéique sur un résidu serine. Les chaînes commencent toujours avec un motif trisaccharidique constant (coloré en rose). La chaîne glycosaminoglycan est composée de la répétition d'un disaccharide (noté A et B), répété n fois (n=40 à 100).

De par la présence de groupements acides, les GAGs sont hydrophiles, et les groupements sulfates qui sont chargés négativement renforcent cette propriété. Ce caractère hydrophile est important car il implique que les GAGs ont un rapport poids/volume très faible. Ainsi, les GAGs vont occuper un espace important dans la MEC. Cela est d'autant plus vrai que les GAGs sont des structures linéaires (Figure 11).

Dans tous les cas, les chaînes GAGs sont attachées sur un résidu serine sur la protéine. Sur ce résidu, des transférases vont lier dans l'ordre, un xylose, deux galactose puis la chaîne GAG (Figure 12). Deux questions concernant la biosynthèse des PGs restent en suspens : Quelles sont les séquences consensus sur le corps protéique qui autorisent la liaison d'une chaîne GAG, et quel mécanisme discrimine la liaison des différents types de GAGs ? (Hileman et al., 1998)

Des études biochimiques ont montré la présence de chondoritine sulfate dans l'espace extracellulaire du SNC (Margolis et al., 1975). En 1991, Herdnon et Landner proposaient que la MEC du SNC contienne 25 corps protéiques différents correspondant à des protéoglycans (Herndon and Lander, 1990). La production d'anticorps monoclonaux (6B4, CAT301, 473HD etc.) à partir d'extraits bruts a permis d'isoler des protéoglycans et de cloner les séquences codant les corps protéiques (Lander, 1993; Hartmann and Maurer, 2001).

Dans le SNC, on distingue différentes familles de protéoglycans : les lecticans (aggrecan, versican, neurocan, brevican) ; les *Small Leucin Rich Proteoglycans* (biglycan, decorin) ; NG2 ; phosphacan ; testican ; appican. Neuroglycan-C et les familles des syndecans et glypicans correspondent à des protéoglycans transmembranaires (Iozzo and Murdoch, 1996; Dow and Wang, 1998; Iozzo, 1999; Oohira et al., 2000). Ces protéoglycans du SNC sont présentés dans le chapitre « The Extracellular Matrix in Neural Development, Plasticity, and Regeneration » (manuscrit 1). Le protéoglycan phosphacan/RPTP β est présenté en plus de détail dans le chapitre 4 puisqu'il a fait l'objet de travaux (cf. manuscrits 5 et 6).

2.2. Glycoprotéines

Les protéines de la MEC peuvent être classées en différents types. On peut distinguer les protéines participant à la formation du réseau moléculaire définissant la matrice extracellulaire, et les protéines instructrices de type facteur de croissance. Les protéines de la première catégorie sont souvent citées comme « glycoprotéines » car elles sont susceptibles d'être fortement glycosylées. Les glycoprotéines sont des protéines ayant subi une modification post-traductionnelle consistant en une glycosylation. On distingue les O-glycosylations, qui lient un sucre sur un résidu serine ou thréonine ; et les N-glycosylations, qui lient un sucre sur un résidu asparagine. Dans le SNC, ces glycoprotéines sont la fibronectine, la laminine, la tenascine, la thrombospondine, la spondine et la matriline.

Une autre définition a récemment été proposée. Les protéines de la matrice extracellulaire ne formant pas de fibres ou n'étant pas agencées en structure spécialisées comme la lame basale sont nommées « protéines matricellulaires » (*matricellular proteins*) (Bornstein and Sage, 2002). Les protéines matricellulaires du SNC sont la tenascine, la thrombospondine, la spondine et la matriline.

Toutes ces protéines ont la particularité d'être constituées de domaines répétés. La présence de ces domaines homologues répétés donne aux protéines de la MEC des caractéristiques dites modulaires. On suppose que ce type d'organisation est apparu par duplication, les exons dupliqués ayant évolué indépendamment, générant une grande diversité (Doolittle, 1995). Les principaux domaines sont les domaines fibronectine (FN), les domaines laminine G (LG) et les domaines *epidermal growth factor* (EGF) (Hohenester and Engel, 2002). Des études utilisants des peptides correspondants à des séquences de différents domaines montrent que de courtes séquences peptidiques (parfois 3 aminoacides) suffisent à l'activation de réponses cellulaires (Yamada and Kleinman, 1992). Une glycoprotéine pourrait donc porter des fonctions distinctes véhiculées par différents domaines. Mais la très forte homologie entre les domaines portés par différentes protéines oblige à considérer une possible redondance.

Il a été montré que le clivage des glycoprotéines par des protéases extracellulaires n'aboutit pas à une absence d'effets sur les cellules. Le clivage peut libèrer des domaines fonctionnels (Shapiro, 1998), et peut aussi révéler des domaines qui sont inactifs dans la protéine non clivée (*cryptic fragments*) (Hocking and Kowalski, 2002).

Les glycoprotéines du SNC sont la laminine et la fibronectine, qui sont exprimées dans le neuroépithélium embryonnaire ; les tenascines, thrombospondine ou encore la reeline. Ces protéines sont présentées dans le chapitre « The Extracellular Matrix in Neural Development, Plasticity, and Regeneration » (manuscrit 1). La tenascine-C est présentée en plus de détail dans le chapitre 4 puisqu'elle a fait l'objet de travaux (cf. manuscrit 7).
3. STRUCTURE ET ORGANISATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Un des problèmes posé dans l'étude de la MEC est celui de sa structure (Mosher et al., 1992). La MEC est un réseau moléculaire formé dans l'espace extracellulaire. L'étude de la structure de la MEC est en général possible par l'observation de fibres, et la mise en évidence d'interactions entre protéines par des techniques biochimiques. Ce type d'étude est important pour comprendre comment la MEC régule la distribution de molécules telles les facteurs de croissance, et comment elle module la morphologie et le croissance cellulaire. La composition unique de la MEC du SNC oblige à adopter des approches différentes de celles utilisées dans l'étude d'autres tissus.

3.1. Une approche : volume, diffusion et *tortuosity*

La communication intercellulaire dans le SNC se fait au niveau des synapses chimiques et électriques, des jonctions de type gap liant les astrocytes, et par diffusion de facteurs dans l'espace extracellulaire. Ce dernier mode de transmission d'un signal est nommée « *volume transmission* » (Agnati et al., 1995), et dépend de la capacité de diffusion des protéines dans la MEC. L'étude de la diffusion des molécules dans la MEC est importante si l'on veut comprendre les effets des facteurs de croissance, des molécules de guidance de la croissance axonale et de la migration qui forment des gradients.

3.1.1. Modélisation de la diffusion des molécules dans la MEC

Nicholson et al. ont proposé de modéliser l'espace extracellulaire comme un milieu poreux homogène (Nicholson et al., 1979). La diffusion d'une molécule dans le milieu extracellulaire peut être alors considérée selon la loi de Fick, et ne dépendre que de deux paramètres : un volume relatif alpha et la *tortuosity* λ . La *tortuosity* est le rapport entre la diffusion d'une molécule dans l'espace extracellulaire et la diffusion dans l'eau. Cette approche s'appuie donc sur l'idée que la majorité des molécules migrent dans la MEC par

diffusion dans un milieu poreux homogène. Cette analyse prétend donc pouvoir ignorer la géométrie du complexe moléculaire qui compose la MEC.

En réalité, la diffusion d'une molécule dans l'espace extracellulaire doit dépendre de plusieurs paramètres :

* la diffusion passive dans l'espace extracellulaire

* la présence de cellules et de molécules faisant obstacle

* l'interaction avec d'autres molécules présentes dans l'espace extracellulaire ou à la surface des membranes cellulaires

* la recapture par des transporteurs

* la dégradation, non spécifique ou spécifique (action de protéases)

Le modèle stipule que la *tortuosity* rend compte de l'ensemble de ces facteurs. Cependant, ces facteurs vont agir différemment selon les molécules (les interactions protéines-protéines sont spécifiques, de même que la recapture – qui dépend de la présence des transporteurs -, et la dégradation par des protéases). Aussi, on peut considérer que si les mesures observées et les modélisations dérivées de la loi de Fick sont une estimation solide du comportement des ions calcium, potassium ou du glutamate dans l'espace extracellulaire, il est difficile d'extrapoler ces données pour comprendre la diffusion de protéines.

3.1.2. L'observation de la diffusion de molécules dans l'espace extracellulaire apporte des informations sur les propriétés de la matrice extracellulaire dans laquelle elles évoluent

Selon Sykova et Nicholson (Nicholson and Sykova, 1998), la structure de la MEC du SNC peut être caractérisée en analysant la diffusion des molécules au sein de l'espace extracellulaire. Après leur secrétion, les molécules diffusent en réalisant des avancées aléatoires (*random walks*). On peut déduire la structure de la MEC en observant le profil de ces avancées (Figure 13). La diffusion de la molécule d'eau ou de celle du cation TMA+ ont été observées dans différents endroits du SNC, à différents âges et dans le contexte de modèles de pathologie.

Ces études ont permis d'estimer le volume occupé par l'espace extracellualire dans le SNC. Chez le rongeur adulte, 20% du volume total du cerveau correspond à l'espace extracellulaire. Il a de plus été observé que différentes parties du SNC ne présentent pas les mêmes propriétés de diffusion, ce qui pourrait impliquer une différence dans l'architecture



Figure 13. L'observation de la diffusion d'un cation dans l'espace extracellulaire apporte des informations sur les caractéristiques structurales de la matrice extracellulaire.

Le suivi de la diffusion d'un cation (TMA+) dans l'espace extracellulaire par micro-électrode permet la mesure de la *tortuosity* et du volume de l'espace extracellulaire dans un tissu.

A : Le TMA diffuse dans l'espace extracellulaire en fonction de la *tortuosity* lambda et de la recapture k (notée par les points rouge).

B : Courbes correspondant à la diffusion du TMA+ au cours du temps, observé dans l'agar et le cerveau, donné pour différentes valeurs de k.

In Nicholson et Sykova 1998 TINS 21:207

moléculaire de la matrice, mais pourrait aussi simplement correspondre à une différence de densité cellulaire.

Il est intéressant de noter que que le volume extracellulaire est deux fois plus important chez le rat nouveau-né que chez le rat adulte, mais que la *tortuosity* est la même à tous les stades, ce qui indique que les propriétés diffusives de la MEC restent constantes (Lehmenkuhler et al., 1993). La diminution de l'espace extracellulaire est observée pendant que se font la gliogenèse et à la myélinisation.

D'autre part, des mesures montrent que la souris *knock-out* pour la tenascine-C présente une volume extracellulaire inférieur à celui d'une souris sauvage (Chvatal A. communication orale, FENS). Il paraît difficile d'imaginer que le volume manquant soit simplement dû à l'absence de la protéine. Une hypothèse plus plausible serait que la tenascine-C participe à l'élaboration d'un complexe moléculaire qui forme la matrice extracellulaire, et que l'absence de cette protéine change ce complexe. Ces données indiquerait que les protéines de la MEC du SNC sont organisées en un réseau.

3.2. Une autre approche : le cartilage comme modèle

Si la structure de la MEC du SNC n'est pas connue, il a été proposée qu'elle soit proche de celle du cartilage (Bignami et al., 1993; Rauch, 1997). La MEC du cartilage est composée de fibres de collagènes d'une part et d'agrégats de hyaluronan et de protéoglycans d'autre part. L'abondance de hyaluronan et la formation d'agrégats avec les lecticans est l'élément commun aux MEC du cartilage et du SNC.

3.2.1. Certaines propriétés de la matrice extracellulaire du cartilage sont communes à celles du système nerveux central

Un élément critique de la MEC du cartilage et du SNC est l'acide hyaluronique. Il est présent dans presque toutes les MEC des tissus de l'organisme, et est un polysaccharide très conservé dans l'évolution. Ce polysaccharide est composé d'un motif disaccharidique (acide glucuronique et N-acétyl-D-glucosamine) répété, avec un poids moléculaire allant de 200 à 10.000 kD (Sherman et al., 2002).

Une propriété essentielle de hyaluronan et des GAGs est leur capacité à interagir avec les molécules d'eau, pour former des macromolécules hydratées dont le rapport poids/volume

est très faible. En effet, ces molécules, à cause de leur densité de charge très élevée, interagissent avec les molécules d'eau et occupent un volume important dans l'espace extracellulaire. Dans le cas du cartilage, les GAGs provoquent ainsi une pression osmotique qui donne au tissu ses propriétés biomécaniques. De plus, les GAGs et HA sont des structures linéaires. Avec une longueur de 1 nm par disaccharide, et 40 à 100 motifs en moyenne, une chaîne GAG d'un protéoglycan peut donc mesurer 100 nm.

Une autre point commun de la MEC du SNC avec celle du cartilage serait les agrégats formés de hyaluronan et de protéoglycans de type lectican (majoritairement aggrecan dans le cartilage), ce complexe étant stabilisé par une protéine de liaison : la link protein. Les protéines interagissent avec hyaluronan via un HA-binding domain, nommé Proteoglycan Tandem Repeat pour les lecticans et link module pour la link protein. Par ailleurs, la link protein peut se lier aux lecticans sur leur domaine G1. L'interaction de la *link protein* avec hyaluronan et aggrecan est nécessaire à la formation des structures qui composent la MEC du cartilage (Morgelin et al., 1988). Cette petite protéine (40 kD) semble essentielle à la stabilisation du complexe hyaluronan-aggrecan qui donne au tissu ses propriétés biomécaniques (Lee and Spicer, 2000). Des mutations dans le gène codant la link protein provoque chez la majorité des souris une mort dans la période post-natale, sinon un nanisme pour les souris survivantes (Watanabe and Yamada, 1999). La link protein est donc un exemple d'une protéine qui, de par ses capacités d'interactions avec d'autres protéines, est nécessaire à l'établissement d'une matrice extracellulaire organisée ; cette structure étant nécessaire pour que la matrice puisse remplir ses fonctions de support tissulaire. La structure de la *link protein* a été étudiée par spectroscopie NMR et il a pu être montré que le *link* module (équivalent du HA-binding domain) avait une structure similaire au domaine lectine de type C (C-type lectin domain) (Kohda et al., 1996).

Des extractions faites avec un tampon Tris sans détergent permettent de purifier hyaluronan associé à des protéoglycans et une protéine reconnue par l'anticorps 8A4 qui reconnaît un épitope porté par la *link protein*. La *link protein* serait donc présente dans le SNC (Marks et al., 1990). Plus récemment, une protéine ayant les caractéristiques de la *link protein* a été découverte dans le SNC et clonée. Cette protéine, nommée Bral1, est spécifique du SNC. Elle est exprimée par les neurones et se trouve principalement dans la matière blanche chez la souris adulte ; elle colocalisée avec hyaluronan et la forme V2 de versican au niveau des noeuds de Ranvier (Oohashi et al., 2002). Ainsi, on peut supposer que dans la MEC du SNC, comme dans le cartilage, des lecticans se lient sur HA via une protéine de lien.

3.2.2. Observation par microscopie électronique

Il est possible d'observer des protéines purifiées en microscopie électronique par technique d'ombrage (*rotary shadowing*) (Sherratt et al., 2000).

Le complexe formé par hyaluronan et les lecticans dans le cartilage a été observé par microscopie électronique (Figure 14) (Morgelin et al., 1988; Morgelin et al., 1994). Des lecticans se lient à hyaluronan pour former une structure en brosse de taille remarquable. Les lecticans interagissent avec hyaluronan par leur extrémité N-terminale, et avec les tenascine-C et R par leur extrémité C-terminale. Par conséquent, on peut supposer qu'une structure supra-moléculaire existe dans l'espace extracellulaire. Cette structure pourrait être la base du réseau moléculaire qu'est la matrice extracellulaire dans le SNC.

Ce type d'étude n'a pas été réalisé pour le SNC, mais des molécules purifiées ont été observées. Il a ainsi été montré que la tenascine-C forme un héxamère (*hexabrachion*) (Figure 15) (Lochter et al., 1991). Neurocan, observé en microscopie électronique, se présente comme une monomère linéaire. Ses deux extrémités sont globulaires, séparées par une partie centrale de 60 à 90 nm qui porte des sucres. Cette partie centrale semble être plus compacte que celle d'aggrecan (Retzler et al., 1996). Si neurocan est linéaire, il pourrait donc s'associer à hyaluronan de la même façon qu'aggrecan dans le cartilage, et former un complexe moléculaire similaire.

3.3. Matrice péricellulaire

La formation initiale de la MEC se fait à proximité des cellules qui secrétent les protéines et les sucres qui vont s'assembler en un complexe moléculaire. De plus, les molécules de la MEC qui sont à proximité des surfaces des cellules interagissent avec des récepteurs qui font un lien entre la MEC et le cytosquelette. La MEC entourant les cellules est qualifiée de matrice péricellulaire (*cell-associated matrix* ou *pericellular matrix*).

Les astrocytes en culture produisent une matrice péricellulaire. Cette matrice est totalement détruite par la hyaluronidase, bien qu'elle soit constituée d'autres protéines. L'apport exogène de hyaluronan et d'aggrecan permet la formation d'un matrice péricellulaire – ces deux protéines étant nécessaires, la matrice peut donc être construite par une cellule à partir de molécules synthétisées par une autre cellule. La formation d'une matrice pericellulaire dépendante de hyaluronan et d'aggrecan est observée de la même

manière avec les chondrocytes en culture (Figure 16). Il n'y a pas formation d'une matrice fibreuse comme c'est le cas avec les fibroblastes et les cellules des méninges (Maleski and Hockfield, 1997). Dans le cas des fibroblastes, il a été montré que les molécules de la matrice extracellulaire sont organisées. L'acide hyaluronique – associé au récepteur CD44 -, la tenascine et versican sont colocalisés tandis que la fibronectine et perlecan sont associés à des intégrines pour former complexes d'adhésions focaux (Yamagata et al., 1993).

Il a été remarqué que les molécules de la MEC du SNC peuvent être extraites sans détergent, mais que l'extraction d'une proportion de ces protéines nécessite l'utilisation de détergents (cf. manuscrit 5). Il est possible qu'une partie des protéines nécessitant un détergent sont issues du reticulum endoplasmique ; ces protéines en cours de synthèse seraient ainsi associée à la fraction membranaire. Mais il est fort probable que cette fraction corresponde aussi à la matrice péricellulaire. La matrice péricellulaire serait moins soluble puisque les protéines interagissent avec des récepteurs et des glycosphingolipides. De plus, il a été proposé que les tenascine-C et R soient associées à des lipid rafts (Kappler et al., 2002). Les perineuronal nets sont un exemple particulier de matrice péricellulaire dans le SNC (Figure17). Observés par Golgi, les perineuronal nets sont des matrices péricellulaires très épaisses entourant les neurones. Il est possible de les colorer par des techniques hisotlogiques spécifiques et on peut les observer à l'aide d'anticorps dirigés contre des molécules de la MEC (Figure 18). Les perineuronal nets sont présents sur des interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine mais ils ont été localisés sur d'autres types neuronaux. Les perineuronal nets contiennent du hyaluronan, phosphacan (Wintergerst et al., 1996a), neurocan, tenascin-C et R (Haunso et al., 2000). Les perineuronals nets apparaissent à la fin du développement postnatal. Leur rôle reste inconnu (Celio and Blumcke, 1994; Celio et al., 1998).



Figure 14. L'acide hyaluronique et les lecticans s'organisent en un réseau moléculaire

Les lecticans comme aggrecan interagissent avec l'acide hyaluronique. Cette interaction est stabilisée par la *link protein*. De nombreuses molécules de lecticans peuvent interagir sur l'acide hyaluronique. Il y a donc formation d'un complexe moléculaire de grande taille. Ce complexe peut être observé en microscopie électronique.

Le complexe observé ici correspond à une purification à partir du tissu cartilagineux.



Figure 15. La tenascine-C forme un hexamère

La Tenascine-C purifiée forme un hexabrachion, observé en microscopie électronique.

In Chiquet-Ehrismann 1988 Cell 53:383



Figure 16. Modèle d'organisation de la matrice péricellulaire

La matrice pericellulaire pourrait correspondre à l'agrégation de complexe acide hyaluroniquelectican à la surface cellulaire par liaison avec des récepteurs. Un récepteur potentiel est CD44 qui interagit avec l'acide hyaluronique.

Une autre hypothèse consiste à considérer le maintien sur la surface cellulaire de l'acide hyaluronique et des lecticans par l'interaction des GAGs des protéoglycans avec des récepteurs membranaires.

In www.glycoforum.gr.jp/science/ hyaluronan



Figure 17. Le perineuronal net est une matrice péricellulaire entourant certains neurones

Reconstruction en trois dimensions d'un perineuronal net marqué avec une lectine couplé à un fluorochrome (barre=1 μ m)

In Celio et al. 1998 TINS 21:510



Figure 18. Observation de *perineuronal nets*

Les *perineuronal nets* peuvent être observés par immunomarquage. Ici, un anticorps dirigé contre Phosphacan/RPTPβ permet de visualiser les *perineuronal nets*.

A : Immunohistochimie avec l'anticorps KAF13 dans le cortex de souris adulte (x20).

B : Immunohistochimie avec l'anticorps KAF13 dans l'hippocampe (CA1) de souris adulte (x40)

Observation personnelle.

4. COLLAGENES FIBRILLAIRES, PHOSPHACAN/RPTPβ ET TENASCINE-C

Afin de faciliter la compréhension des résultats et de l'analyse présentés dans les publications scientifiques qui forment le corps de ma thèse, il est nécessaire de rassembler les données bibliographiques sur les protéines étudiées. Un état de la question concernant les collagènes fibrillaires, phosphacan/RPTP β et la tenascine-C est donc présenté dans ce chapitre.

4.1. Collagènes

Les collagènes sont les principales protéines constituant la MEC des tissus de l'organisme. Ils sont très conservés dans l'évolution puisque les spongiaires synthétisent des protéines collagènes très similaires à celles des mammifères, où ils représentent près de 30% de la synthèse protéique totale pour un organisme (Exposito et al., 2000). Les collagènes sont groupées en différentes familles (figure 19), classées selon leur conformation et localisation dans l'espace extracellulaire (Vuorio and de Crombrugghe, 1990; Hay, 1991; Linsenmayer, 1991; J F Bateman, 1996).

4.1.1. Collagènes fibrillaires

4.1.1.1. Présentation

Le collagènes fibrillaires (types I, II, III, V et XI) sont des homotrimères ou hétérotrimères de chaînes α assemblées en triple hélices. Les triples hélices se lient dans l'espace extracellulaire pour former des fibres (Figure 20 et 21) (Bornstein and Sage, 1980; Linsenmayer, 1991; Olsen, 1991; J F Bateman, 1996; Nimni, 1997; Myllyharju and Kivirikko, 2001).

4.1.1.2. Domaine triple hélice

Les collagènes sont constitués de trois chaînes α qui s'assemblent en une triple hélice stabilisée par des liaisons hydrogène (Figure 20 et 22). Chaque chaîne α est composée de



Figure 19. Présentation des différentes familles de collagènes

Les collagènes de type I, II, III, V et XI forment des fibres. Ceux sont les collagènes fibrillaires.

Les collagènes de type IX, XII et XIV appartiennent à la famille des *Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices (FACIT collagens)* qui sont formés de triples hélices interrompues par de courtes séquences peptidiques non hélicoïdales. Ils ne forment pas de fibres mais interagissent avec les fibres de collagènes I ou II et projettent leur partie N terminales libres dans la MEC. Les *FACIT collagens* sont susceptibles de porter des GAGs de type chondroitine sulfate. Cette famille comporte aussi les types XVI et XIX.

Le collagène de type IV est exclusivement localisé dans les lames basales des membranes basales, où il forme des polymères. Le collagène IV est composé d'une partie terminale notée NC2, d'une triple hélice et d'une extrémité C terminale notée NC1 ; contrairement aux collagènes fibrillaires, les propeptides ne sont pas clivés. Les molécules de collagène IV se lient au niveau du domaine globulaire NC1 ; un résidu cystéine permet de former des ponts disulfure qui lient deux collagènes. Les parties N terminales (NC2) lient quatre molécules, deux en orientations parallèles et deux en orientations antiparallèles ; cette interaction se fait grâce à des ponts disulfures faits par les cystéines de la région 7S du domaine NC2.

Le collagène de type VI forme des microfilaments dans les tissus connectifs.

Le collagène de type VII forme les fibres des plaques d'ancrage (anchoring fibrils) dans le derme.

Les collagènes de type VIII et X forment un réseau moléculaire hexagonal (*hexagonal lattice*). Le collagène de type VIII est le principal composant de la *Descemet's membrane*, formée par les cellules endothéliales de la cornée.

Le collagène de type XIII comporte un domaine transmembranaire et est exprimé dans le SNC.

Le collagène de type XVII est un composant des hémidesmosomes.

Les séquences génomiques des collagènes de types XV et XVIII ont été identifiées, mais les protéines restent mal caractérisées.

In Bateman et al. « Collagen superfamily » from Comper WD « Extracellular matrix vol2 » 1996

près de 1000 aminoacides pour un poids moléculaire moyen de 100 kD. Cette structure rend les collagènes insensibles à des protéases comme la pepsine ; seules des protéases spécifiques – les collagénases - sont capables de cliver les triple hélices.

La séquence primaire des chaînes alpha est une répétition d'un triplet glycine-X-Y. Les gènes des collagènes sont constitués de plus de 50 exons. La formation de la triple hélice dépend de la conformation de chacune des chaînes alpha, qui, de par la présence d'un résidu glycine tous les trois aminoacides, présente une structure hélicale. L'importance de la répétition de résidus glycines est illustrée par le fait qu'une mutation ponctuelle substituant un résidu glycine peut suffire à empêcher la formation de la triple hélice.

Le résidu Y est souvent une proline transformée en hydroxyproline. La présence d'hydroxyproline est importante pour la stabilité de la triple hélice. Cette stabilité peut être estimée par la mesure de la température de dénaturation du collagène. Cent résidus hydroxyproline par chaînes alpha seraient nécessaires à la stabilité de la triple hélice. La lysine est un autre acide aminé fortement présent et qui est susceptible de subir des modifications.

La proline est transformée en hydroxyproline par la prolyl hydroxylase. L'activité de cette enzyme nécessite la présence de cofacteurs : l'ion fer et l'acide ascorbique. Ce dernier est l'élément limitant, principalement en culture cellulaire. L'hydroxylation des résidus a pour conséquence l'établissement de liaisons hydrogènes entre les chaînes α , ce qui stabilise la triple hélice.

La lysine, présente sur la position Y du triplet Gly-X-Y, peut être transformée en hydroxylysine par la lysyl hydroxylase qui utilise les mêmes cofacteurs que la prolyl hydroxylase. On notera enfin que des O-glycosylations ont pu être observées sur les collagènes, mais les fonctions qui leur sont associées restent inconnues.

L'hydroxylation des résidus proline et lysine se fait dans le reticulum endoplasmique, avant que les chaînes α ne s'agencent en triple hélice. L'agencement en triple hélice commence toujours au niveau de la partie C-terminale et continue jusqu'à la partie Nterminale (Hulmes, 2002).

La formation de la triple hélice s'effectue dans le reticulum endoplasmique, puis des agrégats cylindriques de triple hélice sont formés dans les granules de secrétion sortant de l'appareil de Golgi.

4.1.1.3. Procollagène

Les collagènes sont synthétisés sous la forme de précurseurs : les procollagènes. Les procollagènes sont constitués d'une chaîne alpha encadrée d'un propeptide globulaire à leur partie N et C terminale et chaque propeptide a un poids moléculaire moyen de 30 à 35 kD (Figure 22).

Le propeptide associé à la partie N terminale est constitué d'un peptide signal suivi de trois domaines : un domaine globulaire riche en résidus cystéines, une courte triple hélice et un peptide liant la triple hélice à la chaîne α .

Le propeptide associé à la partie C terminale consiste en un peptide de structure globulaire contenant des résidus cystéines. Un mannose et un N-acétylglucosamine sont en outre attachés à ce propeptide. Bien que la séquence consensus d'attachement pour ces sucres soit retrouvée dans la majorité des séquences des collagènes, leur fonction n'est pas connue.

La présence de cystéines dans les séquences des propeptides permet la formation de ponts disulfure intermoléculaires – entre les trois peptides du procollagène – et intramoléculaires – au sein d'un propeptide d'une chaîne alpha. Au niveau du propeptide N terminal, seuls des ponts disulfures intrachaînes sont formés. Des liaisons intra et interchaînes se font par contre au niveau du propeptide C-terminale. La formation de la triple hélice est initiée à l'extrémité C terminale par la formation des ponts disulfures interchaînes, et des mutations au niveau de ce propeptide empêchent la formation de la triple hélice. La formation de ponts disulfures intrachaînes, qui confère au C-propeptide sa conformation de la triple hélice se fassent.

4.1.1.4. Clivage des propeptides

Les procollagènes, une fois secrétés, subissent un clivage (Figure 23). L'action des enzymes clivant les propeptides dépend de la conformation du procollagène et une délétion dans la chaîne alpha entraînant un mauvais alignement des propeptides empêchera l'action des enzymes. Le clivage du propeptide C terminal est nécessaire pour que les triples hélices de collagènes s'associent pour former des fibres. Les propeptides N-terminal et C-terminal sont clivés par des enzymes de la classe des *Procollagen N-proteinases* (PNP) et *Procollagen C-proteinases* (PCP), respectivement.

La PCP a été caractérisée comme appartenant à la famille des ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin repeats) (Colige et al., 1997). ADAMTS-2 clive les collagènes de type I et II, ADAMTS-3 le collagène de type II et ADAMTS-14 le collagène de type I. Ces enzymes appartiennent à la famille des *zinc-binding metalloproteinases*. ADAMTS-2 comporte une séquence tripeptide RGD qui pourrait lui permettre d'interagir avec les intégrines.

Il existe deux isoformes de la PCP : le *Bone Morphogenetic Factor-1* (BMP-1) et *mammalian tolloid* (Kessler et al., 1996). BMP-1, contrairement aux autres membres de la famille des *Bone Morphogenetic Factors*, n'a pas d'homologie avec TGFβ. PCP appartient à la super famille des *zinc-binding metalloproteinases*. Il contient trois régions CUB qui médient une interaction avec les C-procollagènes. PCP clive les C-procollagènes des collagènes de type I, II, III, mais aussi de type V (Kessler et al., 2001). Il est intéressant de noter que PCP clive aussi la pro-lysyl oxidase (Uzel et al., 2001). Ce clivage rend l'enzyme fonctionnelle. Le clivage du C-procollagène et l'activation de l'enzyme qui permet la formation de liaisons covalentes entre les triple hélices sont donc corrélés. Cela pourrait permettre de rapprocher ces deux événements dans le temps.

L'activité de PCP est potentialisée par la présence d'une autre protéine : la *Procollagen C-terminal Proteinase Enhancer* (PCPE), qui contient aussi des régions CUB. Elle pourrait servir à changer la conformation du C-propeptide, permettant le clivage par la PCP (Takahara et al., 1994).

Le clivage du C-propeptide n'est pas complet et il subsiste un télopeptide (11 à 27 résisus) non agencé en triple hélice sur la partie C terminale des collagènes. Ce telopeptide, dans le cas du collagène II, permet d'établir des liaisons avec les résidus lysines des FACIT collagènes de type IX (observé pour cartilage). Dans le cas du collagène de type III, le propeptide n'est pas nécesairement clivé.

4.1.1.5. Formation de fibres

La lysine et l'hydroxylysine présentes dans les parties terminales de la séquence de la triple hélice peuvent être converties en allysine et hydroxyallysine, qui sont les formes aldéhydiques de ces résidus. Cette conversion, réalisée par la lysil oxydase, se fait dans l'espace extracellulaire et permet la formation de liaisons covalentes entre les chaînes α de différentes triples hélices, ce qui permet la formation des fibres (Figure 24).

La formation de fibres dépend en premier lieu du clivage des propeptides et de la conversion enzymatique des lysine et hydroxylysine. Mais la formation des fibres est un processus plus complexe dans le sens où il dépend aussi de partenaires d'interaction dans

l'espace extracellulaire. La fibrillogenèse des collagènes I et III et de la fibronectine sont interdépendantes. Les fibroblastes n'exprimant pas la fibronectine ne sont pas capables de former des fibres de collagènes, leur formation étant possible lorsque de la fibronectine purifiée est ajoutée au milieu de culture (Velling et al., 2002). Le collagène de type I présente une séquence d'interaction avec la fibronectine et régule la fibrillogenèse de la fibronectine (Dzamba et al., 1993). De plus, les fibres de collagènes de type I et III sont formées selon un processus dépendant des collagènes de types V et XI, respectivement (Andrikopoulos et al., 1995; Kypreos et al., 2000). Des glycoprotéines comme la thrombospondine-2 (Kyriakides et al., 1998) et la tenascine-X (Mao et al., 2002) et des protéoglycans (Graham et al., 2000), notamment la decorine (Danielson et al., 1997), régulent la formation des fibres de collagènes. L'observation des souris déficientes pour les gènes codant ces protéines montre en effet un phénotype correspondant à une malformation des fibres de collagènes. Enfin, l'assemblage des fibres est régulé par les intégrines (Velling et al., 2002). La formation des fibres de collagènes est donc un processus dépendant de l'interaction avec les autres protéines dans l'espace extracellulaire. Ces interactions sont sans doute nécessaire à la mise en place d'un réseau moléculaire cohérent.

4.1.1.6. Récepteurs

Les collagènes sont des ligands pour les intégrines. L'interaction est dépendante du magnésium, mais inhibée par le calcium ; elle se fait sur la partie N-terminale de la sousunité α , sur le domaine I (*I domain*).

L'intégrine $\alpha 1\beta 1$ est un récepteur pour les collagènes de type I à VI, XI et XIII, $\alpha 2\beta 1$ lie les collagènes de types I, III, IV, V et VI. Plus récemment, il a été montré que l'intégrine $\alpha 10\beta 1$ interagit avec le collagène de type II, et la séquence cDNA de $\alpha 11\beta 1$ présente un *I domain*. Cependant, aucune de ces intégrines n'est connue pour être présente dans le SNC. Les collagènes peuvent présenter des motifs peptidiques RGD, qui sont connus pour être des ligands des intégrines, mais les collagènes dans leur conformation native n'interagissent pas avec ces intégrines. Une dénaturation est nécessaire pour que les collagènes interagissent avec les intégrines $\alpha V\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$ (Heino, 2000).

L'interaction des collagènes avec leur récepteur entraîne la mise en place de rétrocontrôle positifs et négatifs. L'interaction du collagène avec $\alpha 2\beta 1$ entraîne une expression des collagénases MMP1 et 13. Il existe donc un rétrocontrôle négatif, puisque les MMPs vont cliver les collagènes. Mais l'interaction avec $\alpha 1\beta 2$, qui active une voie de



Figure 20. Les collagènes fibrillaires sont organisés en fibres

La séquence primaire des collagènes (a) permet la conformation d'une triple hélice (b, c). Les triples hélices s'alignent (d) pour former des fibres (f). La longueur des triples hélices et leur agencement provoquent un motif répété de 64nm observé en microscopie électronique (e).

In www.sp.uconn.edu



Figure 21. Observation de fibres de collagène

Les fibres de collagène sont opaques aux électrons et peuvent être directement observées en microscopie électronique.

Observation au niveau de la pie mère du cervelet de rat au 7ème jour postnatal.

Observation personnelle.



Figure 22. Organisation de la triple hélice de collagène

Les molécules de collagènes fibrillaires sont des trimères constitués de trois chaînes α . La partie centrale a une conformation en triple hélice. De part et d'autre, deux propeptides de conformation globulaire rendent la molécule soluble. Ces propetides sont clivés dans l'espace extracellulaire. La partie Nterminale comporte un peptide signal qui permet la secrétion.

In Olsen BR, « Collagen biosynthesis » from Hay ED « Cell biology of extracelllular matrix » 1991



Figure 23. Les procollagènes sont clivés après secrétion

Lorsque la molécule de collagène est secrétée, les *Collagen N-Proteinase* (NP) et *C-Proteinase* (CP) clivent les propeptides. La *Collagen C-Proteinase* est dépendante de l'action de la *Procollagen C-terminal Proteinase Enhancer* (EN). Après le clivage des propeptides, la lysil oxydase (LO) permet la liaison des triples hélices et la formation de fibres.

In Bateman et al. « Collagen superfamily » from Comper WD « Extracellular matrix vol2 » 1996



Figure 24. Les triples hélices de collagènes s'associent pour former des fibres

Les triples hélices de collagènes, composées de trois chaînes α (a), subissent une modification dans l'espace extracellulaire. La lysil oxydase transforme le groupement amine des résidus lysine en groupement aldéhydique. Les groupements aldéhydiques forment des liaisons covalentes (b). Les triples hélices forment ainsi des fibres observables en microscopie électronique (c).

transduction dépendante de la MAPkinase p38, entraîne en parallèle l'expression de collagène I (Riikonen et al., 1995; Ivaska et al., 1999).

Les fonctions des collagènes ne sont pas restreintes à l'intégrité et à la structure du tissu. Par exemple, l'interaction avec l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ active une voie de transduction impliquant la protéine adaptrice Shc et régule la prolifération des fibroblastes (Pozzi et al., 1998). Cependant, l'étude des fonctions associées aux collagènes fibrillaires n'a jamais été menée dans le contexte du SNC.

4.1.1.7. Expression dans le système nerveux central

Les études des collagènes fibrillaires ont été réalisées dans différents tissus de l'organisme des mammifères, mais très peu dans le SNC. L'explication en est que les collagènes fibrillaires ne sont, à quelque exception près, observés qu'au niveau des méninges (cf. chapitre 1.3.).

Les collagènes fibrillaires sont présents dans la *lamina fibroreticularis* présente au niveau de la pie mère. L'expression du collagène de type V est plus faible. La présence de collagènes I, III et V est parfois observée autour de vaisseaux sanguins de large diamètre (Shellswell et al., 1979; Azzi et al., 1989). Chez l'embryon, des hybridation *in situ* montrent que les collagènes de types I et III sont exprimés dans les méninges mais pas dans le tissu nerveux central (Cheah et al., 1991; Niederreither et al., 1995).

La chaîne $\alpha 2$ du collagène de type I est absente du SNC chez la souris, puisqu'aucune expression d'un gène rapporteur sous la dépendance du promoteur du gène codant $\alpha 2(I)$ n'a pu être observé dans ce tissu (Goldberg et al., 1992). Chez le poulet, le gène de $\alpha 2(I)$ comporte un promoteur interne localisé dans le deuxième intron qui provoque la synthèse d'un transcrit alternatif (Bennett and Adams, 1990). La nature protéique de cette isoforme, déduite de la séquence ARN, laisse supposer que si cette isoforme est traduite, la protéine n'aura pas les caractéristiques des collagènes. Cette isoforme est exprimée lors de l'ostéogenèse après une phase d'expression du collagène $\alpha 2(I)$. De plus cette isoforme est exprimée dans le neuroectoderme à E3,5, puis elle disparaît (elle n'est plus observée à E14) (Nah et al., 1996) ; aucune fonction potentielle n'est cependant associée à l'expression du transcrit alternatif.

Le collagène de type III présente une expression alternative similaire à celle du collagène de type II. Chez le poulet, l'expression d'une isoforme où les 23 premiers exons sont remplacés par 70 bases a été montrée. La traduction de cette isoforme en protéine n'a

pas été montrée, mais il est prédit que la protéine correspondante ne pourrait pas se conformer en triple hélice. L'expression de l'isoforme dans le SNC n'a pas été clairement montrée (Nah et al., 1994; Cohen et al., 2002).

Des expériences d'hybridation *in situ* et la construction de souris transgéniques avec un gène rapporteur sous la dépendance du promoteur du gène codant la chaîne alphal du collagène de type II ont permis de montrer l'expression du collagène II dans le neuroepithelium lors du développement embryonnaire de la souris. Une séquence promotrice qui provoque l'expression du collagène II dans le mésencéphale a été isolée. Le collagène II pourrait donc contribuer à la formation de la MEC stabilisant l'epithélium pseudostratifié du SNC au cours du développement embryonnaire (Cheah et al., 1991; Leung et al., 1998; Sakai et al., 2001). Il est intéressant de noter les expériences d'hybridation in situ montrent que les expressions de a1(I) et a1(II) s'excluent mutuellement chez la souris à E14,5 (Cheah et al., 1991).

4.1.2. Autres types de collagènes dans le système nerveux central

Dans le SNC, la localisation de certains collagènes a été étudiée, mais leurs fonctions restent peu connues. Les différents types de collagènes, autres que les collagènes fibrillaires, présents dans le SNC sont présentés ici.

4.1.2.1. Collagène de type IV

Le collagène de type IV est présent dans la membrane basale du neuroépithélium lors du développement embryonnaire. Il devient par la suite un composant des membranes basales au niveau des vaisseaux sanguins et des méninges (Urabe et al., 2002). Les plus fins capillaires sanguins présentent toujours une lame basale comprenant du collagène IV, mais dépourvus de collagènes I et III (Shellswell et al., 1979).

Il a été proposé que le collagène de type IV régule la différentiation des neurones corticaux et des astrocytes (Ferri and Levitt, 1995; Ali et al., 1998). Des études semblent montrer une colocalisation du collagène IV et du récepteur de l'EGF dans la zone ventriculaire de l'embryon de rat (Eagleson et al., 1996).

Dans les modèles de lésion du SNC, l'invasion de la lésion par les cellules des méninges, la formation d'une lame basale et la formation d'une *glia limitans* est observée (Shearer and Fawcett, 2001). La lame basale contient du collagène de type IV. Des études

montrent que le collagène de type IV est un facteur important de l'inhibition de la régénération (Stichel et al., 1999b; Stichel et al., 1999a; Weidner et al., 1999).

Le collagène de type IV n'est pas exprimé par les astrocytes en culture et *in vivo*, mais son expression a été observée dans les astrocytes réactifs après lésion du SNC (Liesi and Kauppila, 2002).

4.1.2.2. Collagène de type XIX

Le collagène XIX appartient à la famille des FACIT collagens. Son expression dans le SNC adulte n'a été montrée que par PCR et western blot (Sumiyoshi et al., 1997).

4.1.2.3. Collagènes de types VIII

Des études en immunohistochimie faites chez l'embryon de veau ont montré une localisation du collagène de type VIII dans la substance blanche de la moelle épinière (Kapoor et al., 1988). Cependant, des études faites en hybridation *in situ* n'ont montré qu'une expression par les méninges chez le rongeur (Muragaki et al., 1992) et sa localisation chez l'homme est limitée aux vaisseaux sanguins chez l'embryon (Paulus et al., 1992).

4.1.2.4. Collagène de type XIII

Le type XIII est un collagène transmembranaire. Il est composé de domaines (NC1 à 4) séparés par trois domaines collagènes conformés en triple hélices (COL1-3). Le domaine NC1, qui correspond à la partie N terminale, contient une séquence hydrophobique insérée dans la membrane, terminée par une courte séquence cytoplasmique (Snellman et al., 2000). Le collagène XIII est exprimé dans le SNC au cours du développement embryonnaire de la souris. Il apparaît dès E10,5 dans le neuroépithélium. A E18,5, le collagène XIII est présent dans la moelle épinière, les méninges et les ganglions de la racine dorsale. Il est exprimé par des neurones hippocampiques en culture primaire, mais pas par les astrocytes. De plus, le domaine extracellulaire du collagène XIII est promoteur de la croissance neuritique de ces neurones (Sund et al., 2001).

4.2. Phosphacan/RPTPβ

4.2.1. Présentation

Il existe trois isoformes de phosphacan/RPTP β . Phosphacan est un protéoglycan secrété dans la MEC ; RPTP β est un récepteur à activité tyrosine phosphatase (Receptor Protein Tyrosin Phosphatase beta). Deux isoformes de RPTP β ont été décrites (Figure 25), une isoforme longue (IRPTP β) et une isoforme courte (sRPTP β).

Les isoformes de phosphacan/RPTP β ont été indépendamment purifiées et clonées par différents laboratoires. Des anticorps monoclonaux produits contre des protéines de la MEC du SNC ont permis l'identification de Phosphacan (3F8 et 3H1(Rauch et al., 1991); 6B4 (Maeda et al., 1992); 473HD (Faissner et al., 1994)). RPTP β a été identifié et séquencé indépendamment de phosphacan (chez la souris (Levy et al., 1993); chez le boeuf (Shitara et al., 1994)). RPTP β a été cloné chez l'homme et nommé RPTPzeta ((Krueger and Saito, 1992)). Les homologies de séquences entre phosphacan et RPTP β ont permis de conclure que ces protéines étaient des isoformes (Barnea et al., 1994). Chez le Xénope, 13 isoformes ont été clonées, dont 11 sont des protéines transmembranaires (Nagata et al., 2001). Par ailleurs, il a été proposé que astrochondrine pourrait être phosphacan/RPTP β (Margolis et al., 1996).

4.2.2. structure

Sur gel d'électrophorèse, on observe une bande de taille comprise entre 800 et 1000 kD ; cette taille est réduite à 300 ou 400 kD après digestion des GAGs, de par la présence de N et O-glycosylations. La taille du corps protéique des isoformes est de 175 kD pour phosphacan, 255 kD pour lRPTPβ et de 165 kD pour sRPTPβ.

Les séquences ARN des isoformes sont connues, et une analyse par northern blot révèle un transcrit de 9,5 kb pour lRPTP β , 6,4 kb pour sRPTP β et 8,4 kb pour phosphacan. Les trois isoformes phosphacan/RPTP β ont des structures similaires. Leurs parties Nterminales sont communes, avec un domaine analogue à la carbonique anhydrase (CAH) suivi d'un domaine fibronectine de type III et d'une région S (*spacer region*). Ces domaines sont communs à l'ensemble des isoformes. Phosphacan et IRPTP β présentent une séquence



Figure 25. Présentation des isoformes de Phosphacan/RPTPß

Il existe trois isoformes. Phosphacan, qui est un protéoglycan secrété dans la MEC, et deux isoformes transmembranaires : une forme courte (sRPTPb) et une forme longue (IRPTPb) qui est un protéoglycan.

La partie N-terminale est commune aux trois isoformes et est composée d'un domaine anhydrase carbonique (CAH), d'un domaine fibronectine de type III (FNIII) et d'une séquence S (*spacer region*). Les GAGs sont portées sur une région IS (*intervening sequence*).

Les deux isoformes transmembranaires ont deux domaines à activité tyrosine phosphatase dans la région cytoplasmique.

IS (*intervening sequence*), qui est absente de sRPTPβ. Les sites de gagosylations se trouvent sur le domaine S, et sRPTPβ, à l'inverse des deux autres isoformes, ne porte pas de GAGs. RPTPβ porte un domaine transmembranaire et deux domaines à activité tyrosine phosphatase (PTP1 et PTP2). Les isoformes présentent donc une partie N-terminale commune et phosphacan correspond à la partie extracellulaire de lRPTPβ. Les ligands d'interaction de phosphacan et RPTPβ peuvent donc être similaires.

Phosphacan et IRPTPβ portent des chaînes GAGs de type chondroitine sulfate, mais Phosphacan peut aussi porter des GAGs de type keratan sulfate reconnesu par l'anticorps 3H1 (Maurel et al., 1994). Phosphacan/RPTPβ est par ailleurs glycosylé. Phosphacan et IRPTPβ pourraient en théorie porter 16 N-glycosylations et 30 O-glycosylations (Garwood et al., 1999) Il porte le sucre HNK-1 reconnu par l'anticorps L2 (Maurel et al., 1994); (Maeda et al., 1992) ; (Faissner et al., 1994) et LewisX reconnu par L5, mais sRPTPβ ne porte pas ces épitopes (Nishiwaki et al., 1998).

4.2.3. Localisation

Des études en western blot et northern blot faites à partir d'extraits de tissus à différents âges montrent que le pic d'expression des trois isoformes se situe dans la période postnatale. L'expression commence à E13, augmente jusqu'à un pic à la première semaine post parturition puis décroît, de façon progressive pour phosphacan et brutale pour IRPTP β . L'expression de sRPTP β semble, par contre constante et son niveau d'expression est moindre (Nishiwaki et al., 1998) (Canoll et al., 1996).

Des études ont été faites chez le rat avec les anticorps 3F8 (Meyer-Puttlitz et al., 1996) et 6B4 (Katoh-Semba et al., 1998) (Maeda et al., 1992) (Maeda et al., 1995). Phosphacan/RPTP β est exprimé dès E13 dans le neuroépithélium. A E16 on observe une expression majoritaire dans la sous-plaque, la zone marginale et la zone ventriculaire ((Meyer-Puttlitz et al., 1996), mais les autres structures, plaque corticale et zone sous ventriculaire sont aussi marquées, bien que plus faiblement (Maeda et al., 1995). Phosphacan/RPTP β sont aussi exprimés dans le thalamus et la capsule interne dès E16. Lors du pic d'expression de Phosphacan/RPTP β , l'ensemble de la MEC du SNC est marquée. Les structures majoritairement marquées dans les stades postnataux sont les zones ventriculaire et sous-ventriculaire ainsi que le cervelet et l'hippocampe (Wilson and Snow, 2000). La moelle épinière est marquée par les anticorps dirigés contre phosphacan/RPTPβ à tous les stades du développement ainsi que chez l'adulte.

La connaissance des séquences ARN de phosphacan/RPTP β a permis de réaliser des hybridations *in situ*. Ces études révélent que l'expression de phosphacan/RPTP β dans le neuroépithélium est restreinte au niveau de la zone ventriculaire (Engel et al., 1996), mais une expression dans la plaque corticale a aussi été observée (Snyder et al., 1996). L'observation indépendante de phosphacan et de RPTP β montre que si les formes secrétées et transmembranaires sont effectivement exprimées dans les zones ventriculaires, phosphacan est aussi exprimé dans l'ensemble du SNC, contrairement à RPTP β dont l'expression reste confinée, aux stades embryonnaires et postnataux, à la zone ventriculaire (Canoll et al., 1996). Dans l'hippocampe postnatal, phosphacan est exprimé par les cellules gliales dans toutes les couches, alors que RPTP β est aussi exprimé dans les couches neuronales pyramidales et granulaires ; chez l'adulte une expression gliale et neuronale est observée pour phosphacan et RPTP β (Snyder et al., 1996).

L'expression de phosphacan/RPTPB dans le cervelet est intéressante ; elle correspond au moment de la genèse des neurones en grains qui prolifèrent dans la couche germinative externe et migrent le long des fibres de Bergmann pour se positionner dans la couche granulaire interne, entre la couche des cellules de Purkinje et la substance blanche. Si les études immunohistochimiques montrent la présence de phosphacan/RPTPβ dans toutes les couches cellulaires, les expériences d'hybridation in situ démontrent que seules les cellules épithéliales de Golgi, qui sont les astrocytes projetant les fibres de Bergmann, synthétisent phosphacan/RPTP_β (Engel, 1989). Si l'homologie entre l'astrochondrine et phosphacan/RPTPβ était confirmée, les rôles joués par ces molécules dans le développement du cervelet seraient alors connus. Il a été proposé que phosphacan/RPTP β soit exprimé par les cellules de Purkinje (Maeda et al., 1992), mais le marquage observé, bien qu'associé à la membrane, est extracellulaire. Des travaux d'hybridation in situ ont montré une expression chez le rat adulte de phosphacan et de RPTPß par les cellules épithéliales de Golgi et les cellules de Purkinje (Snyder et al., 1996).

A partir de P30, on observe l'apparition de *perineuronal nets* (cf. chapitre 3.3.) dans le cortex ou l'hippocampe. Ces structures, composées d'éléments de la MEC, contiennent phosphacan/RPTPβ (Wintergerst et al., 1996b; Haunso et al., 1999).

Chez l'adulte, phosphacan/RPTPβ est exprimé dans l'ensemble du SNC, mais le niveau d'expression est inférieur à celui observé lors des stades postnataux. Cependant, on

observe une expression importante dans la zone ventriculaire, l'hippocampe et la couche des cellules de Purkinje du cervelet (Snyder et al., 1996). Une expression notable est observée dans la partie dorso-latérale de la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux, la localisation de phosphacan/RPTP β correspond à la zone de prolifération et de migration des neurones du bulbe olfactif, qui sont générés en permanence chez l'adulte; phosphacan/RPTP β pourrait donc réguler la prolifération et/ou la migration des neurones du bulbe olfactif (Gates et al., 1995; Thomas et al., 1996).

4.2.4. Expression cellulaire

Une expression par les astrocytes dans le cervelet (les cellules épithéliales de Golgi) a été montrée (Engel et al., 1996). *In vitro*, les astrocytes expriment phosphacan/RPTPβ.

In vitro, les précurseurs d'oligodendrocytes (OP-C), expriment les deux formes de RPTPβ. Cette expression disparaît au cours de la différentiation au moment de l'apparition du marqueur O4 (Canoll et al., 1996). La microglie n'exprime pas phosphacan/RPTPβ (Canoll et al., 1996).

Maeda et al. ont proposé une expression de phosphacan/RPTPβ par les neurones, l'anticorps 6B4 montrant une expression *in vivo* et *in vitro* par les neurones corticaux chez l'embryon (Maeda et al., 1995). L'anticorps KAF13 n'a cependant jamais permis de faire de telles observations (observation personnelle, KAF13 ne marque pas les neurones du cortex et du cervelet en culture, cf. manuscrit 5), et l'expression neuronale de phosphacan/RPTPβ a longtemps été récusée (Canoll et al., 1996). L'expression de phosphacan/RPTPβ par les neurones a finalement été confirmée grâce à une souris transgénique avec le gène LacZ sous la dépendance du promoteur du gène codant phosphacan/RPTPβ. Les neurones en grains de l'hippocampe (Shintani et al., 1998). Les neurones dopaminergiques du mésencéphale pourraient aussi exprimer phosphacan/RPTPβ chez l'embryon (Ohyama et al., 1998).

Phosphacan/RPTP β est donc exprimé par l'ensemble des types cellulaires du neuroectoderme. Si l'expression de RPTP β est limitée aux zones ventriculaire et sous-ventriculaire, et en regard des résultats obtenus *in vitro*, on peut penser que RPTP β est exprimé par les cellules en cours de différentiation, notamment les OP-C qui apparaissent au niveaux des ventricules dans les stades postnataux et qui expriment RPTP β en culture.

L'expression par les neurones corticaux et hippocampiques et par les astrocytes chez l'animal postnatal et adulte devrait correspondre à l'expression de Phosphacan. Par contre, l'expression de phosphacan/RPTP β par les cellules épithéliales de Golgi qui forment les fibres de Bergmann guidant la migration des neurones des grains dans le cervelet postnatal pourrait correspondre à une expression de RPTP β . Des expériences d'immunohistochimie réalisées avec un anticorps dirigé contre la partie intracellulaire de RPTP β semble confirmer cette idée, mais une réaction croisée avec RPTP γ ne peut être exclue. L'expression de phosphacan par ces cellules semble par ailleurs évidente, puisqu'on observe un signal extracellulaire dans l'ensemble des couches de cervelet, malgré une expression restreinte aux cellules épithéliales de Golgi, révélée par hybridation *in situ*. Enfin, chez l'embryon, un signal extracellulaire de l'expression de RPTP β restent incertaines. Ainsi, le profil d'expression précis de chacune des isoformes reste à préciser.

4.3. Tenascine-C

4.3.1. Présentation

La famille des tenascines comprend cinq membres : tenascine-C, R, X, Y et W. Les tenascine-C, R et Y sont exprimées dans le SNC (Jones and Jones, 2000a).

Les tenascines sont composées d'une partie N-terminale riche en résidus cystéine, de motifs *Epidermal Growth Factor* (EGF) et de motifs fibronectine de type III (FNIII). La partie C-terminale est composée d'un domaine homologue du fibrinogen (Figure 26).

Chez la souris, la tenascine-C (TN-C) est composée de 14,5 domaines EGF et de 8 domaines FNIII constitutifs notés 1 à 8. Six domaines FNIII (A1, A2, A4, B, C, D) peuvent être ajoutés par épissage alternatif. La présence de ces 6 domaines alternatifs permettrait en théorie de générer 64 isoformes différentes, mais 27 seulement ont été trouvées dans le SNC (Joester and Faissner, 1999). Selon la présence de domaines alternatifs, la protéine a un poids

moléculaire compris entre 190 et 230kD. Par ailleurs, la TN-C contient des sites potentiels de N–glycosylation sur les domaines FNIII (Jones and Jones, 2000b; Joester and Faissner, 2001).

Une observation par microscopie électronique a permis de révéler que la TN-C s'organise en hexabrachion (Figure 15). Des ponts disulfures lient les molécules de TN-C au niveau de la partie N-terminale (Lochter et al., 1991).

4.3.2. Expression

La TN-C est exprimée dans l'embryon dès le stade *gastrula*. Elle est exprimée dans la plupart des tissus. Au niveau de SNC, elle est exprimée durant l'embryogenèse au niveau de la glie radiaire. Son expression est largement répartie dans le SNC avec un pic durant le stade postnatal (Bartsch, 1996). Chez le rongeur adulte, la TN-C est exprimée autour des ventricules latéraux, où elle pourrait jouer un rôle dans la prolifération et la migration des neurones du bulbe olfactif (Thomas et al., 1996)

La TN-C a longtemps été considérée comme étant exprimée uniquement par les astrocytes. La TN-C est exprimée par la glie radiaire chez l'embryon (ainsi que la glie de Bergmann dans le cervelet) puis par les astrocytes. Mais des études ont montré que le gène LacZ sous la dépendance du promoteur de la TN-C est exprimé par les neurones.

Constitutive FN III domains



Alternatively spliced FN III domains

5. FONCTIONS ASSOCIEES AUX PROTEINES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

De nombreuses fonctions ont été attribuées aux molécules de la MEC, dont le contrôle de la migration cellulaire, du cycle cellulaire, de l'expression de gènes, de l'apoptose ou de la différentiation (Hay, 1993; Roskelley et al., 1995; Small et al., 1996; Lukashev and Werb, 1998). De nombreuses études ont montré que les protéoglycans de la MEC contrôlent l'accessibilité des facteurs de croissance (Schonherr and Hausser, 2000; Kresse and Schonherr, 2001) et que des protéoglycans transmembranaires tels syndecan modifient l'interaction de ces facteurs avec leurs récepteurs (Carey, 1997).

Les protéines de la MEC du SNC sont exprimées durant les stades développementaux, et ne sont exprimées qu'à un niveau basal chez l'adulte. Il semble donc qu'elles participent à la régulation des processus développementaux. Lors du développement du SNC, la plaque neurale évolue en tube neural et forme le neuroépithélium. Lors de la formation du neuroépithélium, des cellules de type glial migrent et joignent les pôles basal et apical par deux prolongements, formant la glie radiale. Les neurones générés par prolifération au pôle apical migrent en utilisant la glie radiale comme support pour former les différentes couches corticales. Les neurones vont alors projeter des axones vers des cibles précises. Pour cela, les axones vont suivre des trajets, le cône de croissance étant guidé par des signaux présents dans la MEC. Lors du développement postnatal, la glie radiale se tranforme en astrocytes, tandis qu'au niveau de la zone ventriculaire, astrocytes et précurseurs d'oligodendrocytes sont générés. Les astrocytes et les précurseurs d'oligodendrocytes migrent pour se positionner dans le SNC. Durant la période postnatale s'organisent la synaptogenèse et la myélinisation. Les études sur les protéines de la MEC se sont donc axées sur la croissance axonale, la migration cellulaire et, plus récemment, sur la formation du nœud de Ranvier et la régulation de l'activité neuronale.

D'autres aspects des fonctions des protéines de la MEC sont présentés dans le chapitre « The Extracellular Matrix in Neural Development, Plasticity, and Regeneration » (manuscrit 1).

5.1. Régulation du développement des axones

5.1.1. Régulation de la croissance axonale

Deux observations ont conduit à supposer que les molécules de la MEC régulent la migration cellulaire et la croissance axonale : d'une part leur localisation, d'autre part la nature de leurs récepteurs. La plupart des molécules de la MEC du SNC sont exprimées durant la période embryonnaire et postnatale, ce qui correspond à une période où s'effectuent la migration des différents types cellulaires et la mise en place des voies nerveuses. Les molécules de la MEC interagissent avec différents types de récepteurs, dont les intégrines et les molécules d'adhésion cellulaire. Ces récepteurs sont connus pour réguler l'adhésion, la migration et la croissance de prolongements cellulaires (Grumet et al., 1993; Bandtlow and Zimmermann, 2000).

Des études ont montré que des molécules de la MEC ont des effets sur la croissance neuritique. La méthodologie employée en général consiste à comparer la longueur des neurites de neurones en culture sur différents substrats de protéines purifiées. Il a ainsi été montré que la TN-C, phosphacan, neurocan, laminine ou NG2 ont des effets sur la croissance des neurites (Margolis and Margolis, 1997; Bovolenta and Fernaud-Espinosa, 2000). *In vivo*, le rôle des protéoglycans de type chondroitine sulfate dans la régulation de la mise en place des voies nerveuses a été suggéré par une étude où la croissance axonale était perturbée par le traitement à la chondroitinase. Il a ainsi été montré que la mise en place des voies thalamocorticales est dépendante des chondroitine sulfate, et que ceux-ci sont associés à des territoires inhibant et stimulant la croissance (Emerling and Lander, 1996). Il est possible que les effets observés soient indirects. La désorganisation du réseau moléculaire formé par les protéoglycans pourrait perturber la localisation de signaux instructeurs entraînant la perturbation de la croissance axonale.

Les effets observés sont différents selon les molécules (la laminine est promotrice de la croissance neuritique pour les neurones des ganglions de la racine dorsale alors que phosphacan inhibe cette croissance (Garwood et al., 1999)), le mode de traitement du substrat (selon que la molécule est présentée comme substrat homogène ou déposée de façon à former une barrière, des effets différents peuvent être observés, c'est par exemple le cas pour la TN-C (Gotz et al., 1996)) et le type cellulaire considéré (phosphacan augmente la longueur moyenne des neurites des neurones hippocampiques, mais inhibe la croissance des neurites pour les

neurones des ganglions de la racine dorsale (Garwood et al., 1999)). Il n'est pas possible d'attribuer des propriétés générales aux molécules de la MEC. Il est certain qu'elles régulent la croissance axonale, mais leurs modes de régulation sont divers. De plus, leur action est sous le contrôle des protéases extracellulaires, les métalloprotéinases (MMPs), elles mêmes régulées par des inhibiteurs de métalloprotéinases (TIMPs) (Zuo et al., 1998).

La présence de sucres sur le corps protéique peut moduler les effets sur la croissance axonale. Les GAGs ont des effets sur la croissance neuritique, indépendamment du corps protéique (Dou and Levine, 1995). Un résumé des résultats connus de la littérature est présenté dans le tableau 2 du manuscrit 8. Les mécanismes impliqués ne sont pas connus, les GAGs pouvant interagir par liaisons ioniques avec de nombreuses molécules sur la surface neuronale. Il a aussi été proposé que leurs effets soient dus à des encombrements stériques (Morris, 1993).

5.1.2. Régulation de la fasciculation

Les molécules de la MEC régulent l'adhésion des neurones. En effet, l'adhésion entre les neurones se fait par des interactions homophiliques des cadherines et des molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des Immunoglobulines (CAMs). Les protéoglycans phosphacan et neurocan interagissent avec les CAMs, et des expériences montrent qu'ils inhibent l'adhésion des neurones (Friedlander et al., 1994; Milev et al., 1994). La TN-C, en interagissant avec phosphacan, neurocan et les CAMs, pourrait participer à la régulation de l'adhésion (Grumet et al., 1994). Durant le développement, la fasciculation - adhésion par les CAMs le long de l'axone - des axones joue un rôle important dans la mise en place des voies nerveuses. Il a été montré que la tenascine-R régule la défasciculation en interagissant avec F3/contactine (Xiao et al., 1998). Phosphacan et la TN-C pourraient jouer des rôles similaires lors du développement et dans le contexte de pathologies (cf. manuscrit 4).

5.1.3. Formation de frontières

Des protéoglycans de type chondroitine sulfate et la TN-C sont localisés de manière spécifique durant la fin du développement postnatal. La TN-C et des PGs de type chondroitine sulfate sont observés autour des colonnes du cortex somatosensoriel, formant des frontières entre les colonnes (Mitrovic et al., 1994; Watanabe et al., 1995). Des PGs de type

chondroitine sulfate sont localisés au point d'entrée des neurones sensoriels dans la moelle épinière (*Dorsal Entry Zone*) (Pindzola et al., 1993) et dans la moelle épinière où ils semblent délimiter des barrières (Snow et al., 1990).

Le fait que ces molécules aient des effets inhibiteurs sur la croissance neuritique (Snow et al., 1990; Snow and Letourneau, 1992) a conduit à penser que la MEC forme des barrières fonctionnelles qui guident la croissance axonale par répulsion (Steindler, 1993). Phosphacan est exprimé dans la *Dorsal Entry Zone* (Milev et al., 1996), et inhibe la croissance neuritique des ganglions de la racine dorsale (Garwood et al., 1999). Par contre, phosphacan présente une localisation homogène dans le néocortex et favorise la croissance des neurones corticaux (cf. manuscrit 5 et 6). Ainsi on peut supposer que les molécules de la MEC peuvent former des frontières fonctionnelles inhibant la croissance axonale dans des régions précises du SNC. Cependant, il n'est pas évident que ces frontières aient un rôle instructeur puisque la formation d'une frontière de TN-C apparaît lorsque les colonnes du cortex somatosensoriel se sont déjà formées (Jhaveri et al., 1991).

5.2. Rôle de la tenascine-C dans le développement du SNC

La TN-C interagit avec d'autres molécules de la MEC. La TN-C interagit avec phosphacan (Milev et al., 1997), neurocan (Rauch et al., 1997). Comme neurocan et phosphacan interagissent avec NCAM pour inhiber l'adhésion neuronale, la TN-C pourrait réguler l'adhésion entre neurones.

La TN-C est un ligand pour différents récepteurs. Elle interagit avec des récepteurs de la famille des intégrines et avec les protéoglycans transmembranaires glypican (Vaughan et al., 1994), neuroglycan-C (Schumacher et al., 2001). De plus elle interagit avec les molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) F3/contactine (Weber et al., 1996) et TAG-1/axonin-1 (Milev et al., 1996). Enfin, il a été récemment montré que les domaines EGF de la TN-C interagissent avec le récepteur de l'EGF (Swindle et al., 2001).

Dans le SNC, la TN-C régule l'adhésion et la migration cellulaire ainsi que la croissance axonale. La TN-C a des propriétés anti-adhésives qui peuvent être mises en évidence en culture primaire de neurones. Les neurones n'adhérent pas sur un substrat de TN-C (Faissner and Kruse, 1990). Des études réalisées avec des protéines de fusion correspondant à différents domaines et des expériences utilisant des anticorps monoclonaux pour bloquer spécifiquement des domaines distincts de la TN-C ont montré que cette protéine contient des domaines inhibant l'adhésion (principalement les domaines EGF et les domaines FNIII A1,

A2, A4) et des domaines favorisant l'adhésion (le domaine fibrinogen et les domaines FNIII 1,2, 3) (Gotz et al., 1996). La modulation de l'adhésion cellulaire par la TN-C pourrait être un élément de régulation de la migration cellulaire lors du développement du SNC.

En culture, la TN-C inhibe la migration des précurseurs d'oligodendrocytes (OP-C). Les domaines responsables de cette inhibition sont les domaines FNIII 7 et 8 (Kiernan et al., 1996). Cette fonction est associée à l'observation d'une barrière de TN-C dans le nerf optique, qui stopperait les OP-C et permettrait ainsi à la première partie du nerf d'être non myélinisé. Des études portant sur les souris déficientes pour le gène codant la TN-C semblent confirmer ce rôle de la TN-C dans la régulation de la migration des OP-C dans le nerf optique (Garcion et al., 2001). Des expériences utilisant des anticorps dirigés contre la TN-C ont montré que la TN-C régule la migration des neurones des grains lors de leur migration le long des fibres de Bergmann dans le cervelet postnatal (Husmann et al., 1992).

La TN-C est exprimée pendant le développement du SNC dans des zones de croissance axonale ; de plus elle interagit avec des récepteurs connus pour contrôler la croissance axonale. Des études ont donc été réalisées en culture afin de déterminer les rôles de la TN-C dans la régulation de la croissance neuritique. Il a pu être montré que la TN-C exerce une régulation différente selon le type cellulaire, et que les domaines FNIII jouent des rôles distincts (Faissner, 1997).

5.3. Rôle de phosphacan/RPTPβ dans le développement du SNC

Phosphacan/RPTP β interagit avec les molécules d'adhésion moléculaire de la superfamille des immunoglobulines, ainsi qu'avec des molécules de la MEC (Figure 27).

Phosphacan interagit avec NCAM et L1/NgCAM (Milev et al., 1994); cette interaction n'est plus observée après un traitement de phosphacan avec la N-glycosidase (Milev et al., 1995). TAG-1/axonine-1 est aussi un récepteur potentiel pour phosphacan, leur interaction n'est pas dépendante des N-glycosylations, mais est réduite après le clivage par la chondroitinase des GAGs de type chondroitine sulfate. Des résultats similaires sont observés avec la forme dermatan sulfate de phosphacan (Milev et al., 1996).

La molécule F3/contactine est une autre molécule d'adhésion qui interagit avec phosphacan (Peles et al., 1995). La production de protéines de fusion correspondant à différents domaines de phosphacan a permis de montrer que phosphacan/RPTP β interagit avec F3 via son domaine CAH (Figure 28).

Des molécules de la MEC sont aussi des partenaires d'interaction de phosphacan/RPTPβ comme tenascine-C et R (Grumet et al., 1994; Milev et al., 1998b) (Figure 29).

Le fait que phosphacan soit un ligand pour les molécules d'adhésion permet de supposer qu'il est une molécule de la MEC pouvant réguler des processus tels que l'adhésion, la migration cellulaire et la croissance axonale. Des protéines de fusion correspondant aux régions CAH, FNIII et S de phosphacan permettent l'adhésion des neurones du tectum du poulet et ont un effet promoteur sur la croissance des neurites ; cet effet est inhibé en présence d'un anticorps dirigé contre les CAMs F3 ou NrCAM (Sakurai et al., 1997).

HB-GAM (pleiotrophine) et midkine sont des facteurs de croissance pouvant interagir avec les heparan sulfate. HB-GAM/Pleiotrophin interagit avec phosphacan/RPTPβ. Cette interaction semble médiée par les chaînes GAGs puisqu'une digestion avec la chondroitinase empêche l'interaction (Milev et al., 1998b). Il est intéressant de noter que l'interaction de HB-GAM entraîne une augmentation de l'affinité de phosphacan/RPTPβ pour F3. Ces observations sont à mettre en relation avec l'observation de l'inhibition par les GAGs de la promotion de la croissance des neurites par HB-GAM (Maeda and Noda, 1998) et l'inhibition par l'anticorps 6B4 de la migration et de la croissance neuritique des neurones corticaux induites par HB-GAM (Maeda et al., 1996; Maeda and Noda, 1998). *In vivo*, HB-GAM et phosphacan/RPTPβ colocalisent dans le neuroépithélium, dans les ganglions de la racine dorsale chez l'embryon, et dans le cervelet et la rétine chez l'adulte (Milev et al., 1998b).

Phosphacan/RPTP β est exprimé durant des stades de développement correspondants à des phases de migration cellulaire et de croissance axonale. De plus, il interagit avec des molécules d'adhésion et des molécules de la matrice ayant des fonctions de régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire. Il semble donc raisonnable de penser que Phosphacan/RPTP β joue un rôle dans la régulation de ces mécanismes. Phosphacan purifié à partir d'extraits de tissus a été utilisé dans des tests *in vitro* afin de déterminer s'il pouvait réguler l'adhésion cellulaire et la croissance neuritique. Il a ainsi été montré que phosphacan a des effets sur la croissance neuritique (résumé dans le tableau 1 du manuscrit 8). Phosphacan peut être promoteur ou inhibiteur de la croissance neuritique selon le type de neurone considéré, ce qui suggère qu'il agit sur des récepteurs différents. De plus, la présence de GAGs sur la protéine introduit un niveau supplémentaire de régulation, puisque
les chaînes GAGs ont des effets spécifiques sur l'adhésion cellulaire (Dou and Levine, 1995) (résumé dans le tableau 2 du manuscrit 8).

La relation entre la localisation de phosphacan/RPTP β et ses effets sur la croissance neuritique est délicate à interpréter. Le fait que phosphacan soit promoteur de la croissance neuritique des neurones corticaux et soit localisé dans la sous-plaque du neuroépithélium, où l'on trouve également les sémaphorines, les netrines, la laminine, neurocan, entre autres, et l'absence de défauts de la mise en place des voies nerveuses dans le *knock-out* de phosphacan/RPTP β , rend l'analyse difficile. A l'inverse, la présence de phosphacan dans la *dorsal entry zone* (point d'entrée dans la moelle épinière des axones des ganglions de la racine dorsale) durant les stades postnataux, et le fait que phosphacan soit inhibiteur de la croissance des ganglions de la racine dorsale, et ceci même en présence de laminine, semble indiquer que celui-ci contribue à l'établissement d'une barrière fonctionnelle empêchant l'entrée des axones issus des ganglions de la racine dorsale. Il a enfin été montré récemment que RPTP β participe à la régulation de la croissance dendritique des cellules de Purkinje (Tanaka et al., 2003).

Le développement des neurones dopaminergiques du mésencéphale pourrait impliquer phosphacan/RPTPβ. Ces neurones coexpriment phosphacan/RPTPβ et L1/NgCAM, et la tenascine-C est présente dans la MEC (Ohyama et al., 1998), de plus les GAGs portées par phosphacan augmentent la croissance neuritique de ces neurones *in vitro* (Clement et al., 1998). Cependant, la migration des ces neurones est correcte dans les souris déficientes pour le gène codant phosphacan/RPTPβ (Harroch et al., 2000).

Un autre rôle potentiel de phosphacan/RPTP β pourrait être la régulation de la prolifération cellulaire. En effet, il a été montré que le corps protéique de phosphacan/RPTP β interagit avec FGF-2 et augmente le taux de prolifération des cellules de la lignée 3T3 (Milev et al., 1998a). De plus, la colocalisation de FGF-2 et de phosphacan/RPTP β au niveau de la zone ventriculaire du neuroépithélium, l'action de FGF-2 sur les OP-C et l'expression de RPTP β par ces cellules, laisse supposer que phosphacan/RPTP β joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire lors du développement du SNC.

Phosphacan/RPTPb	Molécules interagissant
Corps protéique	NrCAM F3/contactine tenascine-R
N-glycosylations	L1/NgCAM NCAM tenascine-C bFGF
Chaînes glycosaminoglycans	TAG-1/axonine-1 HB-GAM/Pleiotrophine Midkine

Figure 27. Tableau récapitulatif des principaux partenaires d'interaction de phosphacan/RPTPß

Phosphacan/RPTPβ interagit avec des récepteurs neuronaux et avec des protéines de la matrice extracellulaire. Les interactions se font au niveau du corps protéique et des sucres. Les sucres peuvent donc participer à l'activité fonctionnelle du protéoglycan.



Figure 28.

Représentation des interactions entre phosphacan et les molécules d'ahdésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines. Phosphacan est un ligand pour différents récepteurs. Il peut interagir au niveau du corps protéique ou des GAGs.



5.4. Rôle des protéines de la matrice dans la formation et le maintien du nœud de Ranvier

L'expression de phosphacan/RPTP β par les oligodendrocytes et par les neurones pourraient impliquer un rôle dans la formation des nœuds de Ranvier.

La conduction de l'information nerveuse se fait par les fibres myélinisées selon un phénomène saltatoire rendu possible par la localisation des canaux sodiques dépendants du potentiel de membrane au niveau des noeuds de Ranvier, et une série d'études récentes a mis en évidence l'implication de molécules d'adhésion cellulaire dans la formation du noeud de Ranvier (Girault and Peles, 2002) (Figure 30). Le noeud de Ranvier se divise en trois parties : *node, paranode* et *juxtanode*. Les canaux sodiques sont localisés au niveau du *node*, où ils interagissent avec la neurofascine 186 (Ratcliffe et al., 2001). Les canaux potassiques sont localisés dans le *juxtanode*, où ils interagissent avec la molécule Caspr (Poliak et al., 1999). Caspr (ou Paranodin, ou NCP1) est retrouvé au niveau du paranode, où il forme un complexe avec F3/contactine ; F3 est retrouvée dans le *node* (Rios et al., 2000). Les souris déficientes pour le gène codant F3 ou Caspr montrent une formation altérée du noeud de Ranvier, avec une localisation anormale des protéines citées (Bhat et al., 2001). Il a de plus été montré que F3 interagit avec les canaux sodiques et modifie leur localisation (Kazarinova-Noyes et al., 2001).

Les molécules de la MEC semblent aussi réguler les phénomènes de conduction saltatoire puisque la tenascine-R est présente au niveau du *node*. Il a été montré que la tenascine-R interagit et module l'activité des canaux sodiques (Srinivasan et al., 1998; Xiao et al., 1999). Cette idée est renforcée par le fait que les souris présentant une déficience pour le gène codant la tenascine-R montrent des problèmes de conduction de l'influx nerveux (Weber et al., 1999).

La tenascine-R est un partenaire d'interaction pour phosphacan/RPTP β ; de plus, F3, qui est nécessaire à la formation du noeud de Ranvier, est un ligand de phosphacan/RPTP β . Dans des préparations *ex vivo* de nerfs optiques, la présence d'une protéine de fusion correspondant au domaine CAH de phosphacan/RPTP β empêche une localisation correcte de Caspr au niveau du noeud de Ranvier (Rios et al., 2000). Il est probable que le domaine CAH empêche l'interaction de F3 avec Caspr et bloque ainsi la localisation correcte de Caspr. Par ailleurs, la régulation des canaux sodiques par phosphacan/RPTP β – montré par Ratcliffe et al. 2000 (cf. chapitre 5.5) -, suggère que cette molécule pourrait être un élément régulateur du

noeud de Ranvier. On pourrait supposer soit une expression gliale (par les oligodendrocytes ou par les astrocytes fibrillaires) de phosphacan/RPTP β , soit une expression neuronale ; dans ce dernier cas, une interaction et une régulation des canaux sodiques pourraient avoir lieu, ainsi qu'une interaction en cis avec F3. Ainsi, phosphacan/RPTP β pourrait être un élément régulateur de la formation et du maintien du nœud de Ranvier. Les souris déficientes pour le gène codant phosphacan/RPTP β ne montrent pas de problèmes de formation du nœud de Ranvier ni de conduction de l'influx nerveux (Harroch Schlessinger 98), mais des défauts de remyélinisation dans un modèle murin de sclérose en plaque (Harroch et al., 2002). Cependant, les défauts de remyélinisation pourraient être dus à des problèmes de migration et de croissance de processus oligodendrocytaires.

5.5. Protéines de la matrice et régulation de l'activité neuronale

La MEC du SNC correspond à l'environnement direct des neurones. Le soma et l'arbre dendritique des neurones sont en contact permanent avec les molécules de la MEC. L'axone est myélinisé, donc isolé, mais les noeuds de Ranvier, où se concentrent les canaux sodiques et potassiques contiennent des récepteurs des molécules de la MEC et celle-ci semble jouer un rôle au moins dans le développement de ces noeuds.

L'idée que les canaux sodiques puissent interagir avec des molécules de la MEC est venu de l'observation de la présence d'une boucle immunoglobuline sur la partie extracellulaire de la sous-unité β ; cette boucle immunoglobuline étant homologue de celles du récepteur F3/contactine (Isom et al., 1995).

En 1998, il a été montré que les domaines FNIII des tenascine-C et R interagissent avec les canaux sodiques (Srinivasan et al., 1998) et que la partie N-terminale de la tenascine-R provoque une augmentation de l'amplitude des courants sodiques dans l'oocyte de xénope transfecté pour exprimer les canaux sodiques (Xiao et al., 1999).

Une fonction similaire a été montrée pour RPTP β . Des techniques biochimiques ont montré que RPTP β interagit avec les canaux sodiques dépendant du potentiel de membrane. Cette interaction se fait pour la partie extracellulaire par le domaine CAH sur la sous-unité α du canal, et pour la partie intracellulaire par le domaine PTP1 sur les sous-unités α et β 1. Des expériences de transfection du canal sodique dans des cellules HEK exprimant RPTP β ont permis de mettre en évidence une régulation de l'activité des canaux par RPTP β (Ratcliffe et al., 2000). Cette interaction semble bien exister *in vivo* puisque des extractions ont permis d'isoler un complexe formé de canaux sodiques et de sRPTPβ. Une autre possibilité d'interaction, non démontrée, pourrait être faite par Phosphacan, qui pourrait en théorie interagir avec le canal via le domaine CAH.

Par ailleurs, les protéoglycans de la famille des lecticans pourraient jouer un rôle dans la maturation de l'activité neuronale. Le protéoglycan reconnu par l'anticorps CAT301, qui correspond à aggrecan (Matthews et al., 2002), est localisé autour de certains neurones dans le cortex visuel du chat à la fin de la période critique. Le maintien des yeux clos chez le chaton retarde l'apparition de signal observé avec l'anticorps CAT301 (Lander et al., 1997). Plus récemment, un lien direct entre le développement de colonne de dominance oculaire et les PGs de type chondroitine sulfate a été montré (Pizzorusso et al., 2002). On sait qu'une matrice péricellulaire (*perineuronal net*, voir chapitre 3.3.) se forme autour des neurones GABAergiques à la fin du développement postnatal. La formation de cette matrice – observée avec des lectines marquées ou un anticorps dirigé contre neurocan - est retardée dans le cortex visuel lorsque des chatons sont laissés dans l'obscurité, par contre la distribution de neurocan dans le tissu est normal. De plus, un traitement à la chondroitinase perturbe la mise en place des colonnes de dominance oculaires.

Les molécules de la MEC pourraient aussi participer aux mécanismes de plasticité synaptique. Des tranches d'hippocampes montrent des altérations de la potentiation à long terme après digestion à la chondroitinase (Bukalo et al., 2001). L'obtention de souris déficientes pour des gènes codant des protéines de la MEC laisse supposer que les tenascine-C et R, neurocan et brevican jouent un rôle dans la plasticité synaptique (Nakic et al., 1998; Zhou et al., 2001; Brakebusch et al., 2002; Evers et al., 2002; Strekalova et al., 2002). Ainsi, il semble que certaines molécules de la MEC soient directement impliquées dans la modulation de l'activité neuronale.



Figure 30. Organisation du nœud de Ranvier

Le nœud de Ranvier correspond à la mise en place d'interactions entre l'axone et les cellules gliales (A). Ces interactions sont médiées par des molécules d'adhésion (F3/contactine) qui sont aussi des récepteurs pour les protéines de la MEC. La tenascine-R, phosphacan et versican sont présents dans la MEC au niveau du nœud de Ranvier (B).

Phosphacan/RPTP β , exprimé par les cellules gliales, pourrait interagir avec F3 et contribuer à la formation et au maintien du nœud de Ranvier. Il a par ailleurs été montré que RPTP β interagit avec les canaux sodiques et module leur activité.

In Girault et Peles 2002 CurrOpNeurobio 12:476

6. LES MECANISMES MOLECULAIRES DE LA CROISSANCE AXONALE

L'adhésion cellulaire, qui pourrait être définie comme le lien entre la MEC et le cytosquelette, ne consiste pas seulement à intégrer la cellule dans un tissu et à contrôler sa morphologie, elle est la base de tous les mouvements cellulaires. La migration, la croissance de prolongements (dont un exemple est la croissance axonale) sont deux phénomènes dont la mise en oeuvre se fonde sur le principe d'adhésion cellulaire. Si l'on veut comprendre comment les protéines de la MEC agissent sur la croissance axonale, il faut étudier leurs récepteurs et comprendre l'interaction entre la MEC et le cytosquelette.

Dans ce chapitre, les récepteurs des protéines de la MEC sont présentés. L'observation de l'interaction de ces récepteurs avec le cytosquelette amène à présenter la relation dynamique entre les protéines de la MEC et la cellule. Puis les mécanismes moléculaires de la migration cellulaire sont expliqués, en prenant l'exemple de la migration des fibroblastes, qui est la mieux caractérisée. En effet, si les mécanismes de la croissance restent mal connus, ils sont vraisemblablement proches de ceux connus d'autres modèles cellulaires étudiant la migration cellulaire. La compréhension, au niveau moléculaire, de l'influence de la MEC sur le cytosquelette est donc nécessaire pour commencer à comprendre les mécanismes moléculaires de la croissance axonale.

6.1. Intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères $\alpha\beta$ composés de deux protéines transmembranaires liées de manière non covalentes (Hynes, 1992) (Figure 33). 16 sous-unités α et 8 sous-unités β sont connues pour le moment (Figure 31).

Certains ligands peuvent se fixer sur différents intégrines, et un hétérodimère peut interagir avec différents ligands. La séquence peptidique du ligand a été caractérisée dans quelques cas. Une séquence classique observée est le tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD), qui permet la fixation de différentes protéines sur les intégrines. Un aspect important de l'interaction ligand récepteur est l' « activation » des intégrines (Figure 32). L'activation correspond à une régulation de l'affinité des intégrines pour leurs ligands (Liddington and Ginsberg, 2002). Les intégrines sont dans un état inactif dans lequel l'interaction avec le ligand est de faible affinité. L'activation est nécessaire pour que l'affinité soit assez grande



Figure 31. Schéma des dimères formant les intégrines

Les intégrines forment des dimères $\alpha\beta$. L'association des sous-unités est sélective, 22 hétérodimères seulement ont été caractérisés à ce jour, soit beaucoup moins que le nombre théorique d'associations possibles.

In Hynes 2002 Cell 110



Figure 32. Schéma représentatif de l'activation des intégrines

Les intégrines interagissent avec leurs ligands selon un mode actif. Le ligand et les récepteurs interagissent pour provoquer la formation de complexes d'adhésion. Le recrutement des intégrines est corrélé avec leur ancrage, c'est à dire l'interaction stable avec le cytosquelette. Le complexe protéique liant les intégrines au cytosquelette est nommé « plaque ».

In Gumbiner 1996 Cell 84:345

pour initier une interaction qui soit transduite au niveau du cytoplasme. Cette activation peut être induite par le cytosquelette d'actine, ou par des ligands ; cette activation est aussi nécessaire pour la formation de complexes d'adhésion cellulaire (FAC) (cf. chapitre 6.3.).

Les sous-unités α et β ne présentent qu'un domaine transmembranaire, suivi d'une courte partie cytoplasmique. La partie cytoplasmique interagit avec un complexe moléculaire directement lié au cytosquelette d'actine, dénommé « plaque ». Les principaux composants de cette plaque sont taline, vinculine, paxiline (Critchley, 2000), mais plus de 50 protéines participent à l'interaction entre les intégrines et le cytosquelette (Zamir and Geiger, 2001). L'existence de voies de transduction activées par les intégrines a de plus été démontrée.

Les intégrines sont connues pour réguler la prolifération, la différentiation, la survie et l'apoptose, la polarité, la morphologie, la migration, et la croissance de prolongements. Dans le SNC, les précurseurs d'oligodendrocytes, les astrocytes et les neurones expriment les intégrines (Milner and Campbell, 2002). La migration des précurseurs d'oligodendrocytes est régulée par des intégrines (Milner et al., 1996), de même que la croissance axonale (Ivins et al., 2000). L'étude de souris déficientes pour des gènes codant des sous unités α et β d'intégrines a montré qu'elles jouent des rôles essentiels dans le développement du SNC par exemple pour la fermeture du tube neural et pour la mise en place des couches corticales (De Arcangelis and Georges-Labouesse, 2000). Les protéines de la MEC qui peuvent interagir avec les intégrines sont la laminine, la fibronectine et la tenascine-C.

6.2. Molécules d'adhésion cellulaire CAMs

Dans le SNC, des molécules d'adhésion cellulaires de la superfamille des immunoglobulines (CAMs) (Figure 33) régulent l'adhésion neuronale et interagissent avec les molécules de la MEC pour moduler la croissance axonale (Grumet, 1991; Doherty and Walsh, 1994; Fields and Itoh, 1996). Les travaux présentés dans cette thèse montrent que des isoformes de phosphacan/RPTP β interagissent avec L1/NgCAM et F3/contactine (manuscrit 5) et que la tenascine-C agit sur le cône de croissance en interagissant avec F3/contactine (manuscrit 7).

On distingue la famille des CAMs homologues de L1 (L1/NgCAM, neurofascin, NrCAM, CHL1) qui sont des protéines transmembranaires et la famille des CAMs homologues de TAG-1 (TAG-1/axonin-1, F3/F11/contactine, BIG-1 et 2, NB-2 et 3) qui sont associées à la membrane plasmique par un motif GPI. Ces molécules sont caractérisées par la

présence de domaines FNIII et de domaines immunoglobulines (Ig) sur leur partie extracellulaire. Elles médient une adhésion indépendante du calcium, contrairement aux cadherines (Walsh and Doherty, 1997).

NCAM régule l'adhésion entre neurones. NCAM interagit en trans par ses domaines Ig. NCAM possède deux domaines FNIII et cinq domaines Ig Il existe trois isoformes qui varient au niveau de la partie cytoplasmique (Ronn et al., 2000). Une isoforme supplémentaire existe, où un exon nommé VASE code une séquence peptidique supplémentaire dans la partie cytoplasmique. Cette séquence peptidique lie un sucre, l'acide polysialique (PSA). La présence de PSA empêche l'adhésion homophilique de NCAM et serait directement impliquée dans des mécanismes de plasticité nécéssitant des changements de morphologie cellulaire (Kiss and Rougon, 1997).

Les CAMs L1, TAG-1 ou F3/conactine sont exprimées sur l'axone et le cône de croissance et sont directement impliquées dans la régulation de la croissance axonale (Kamiguchi and Lemmon, 1997). Les CAMs régulent la fasciculation des axones en interagissant en trans et ce mécanisme est essentiel dans le développement des voies nerveuses, où un axone pionnier sert de support à la croissance des axones devant connecter des cibles similaires (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). L'action des CAMs est complexe puisque des interactions homophiliques et hétérophiliques, en cis et en trans, sont possibles. Ainsi L1/NgCAM permet la fasciculation des axones commissuraux par interactions homophiliques en trans, mais son interaction en cis avec l'axonine-1 est nécessaire pour que les axones se projettent sur leur cible (Kamiguchi and Lemmon, 2000a). De plus, les CAMs sont des récepteurs pour les molécules de la MEC. Ainsi F3 interagit avec NCAM, L1, phosphacan, TN-C et R (Brummendorf and Rathjen, 1996).

Le lien entre les CAMs et le cytosquelette n'est pas encore bien connu. On sait que NCAM interagit avec la spectrine et L1 avec l'ankyrine (Suter and Forscher, 1998) ainsi qu'avec l'ezrine, une protéine de la famille ERM qui lit l'actine (Dickson et al., 2002). L'existence de voies de transduction associées aux CAMs a été montrée. F3 interagit avec *fyn*, une kinase de type src (Kramer et al., 1999) et la croissance axonale stimulée par L1 en culture est dépendante des MAP kinases (Doherty et al., 2000). Cependant, les voies de transduction en aval des CAMs sont très peu connues en comparaison des intégrines.



6.3. Les protéines de la MEC, en interagissant avec leurs récepteurs, régulent les mouvements du cytosquelette

L'idée d'adhésion cellulaire est apparue avec une observation simple : les cellules dissociées de deux tissus s'agrègent pour former deux populations distinctes, selon leur tissu d'origine. Ainsi, les cellules adhèrent entre elles selon un processus type cellulaire spécifique. Mais l'idée d'adhésion cellulaire correspond aussi à la mise en évidence d'un lien entre l'extérieur de la cellule et le cytosquelette. L'adhésion cellulaire implique soit une interaction cellule-cellule, soit une interaction cellule-MEC. Dans les deux cas, la cellule adhère via des molécules transmembranaires regroupées en des points focaux spécialisés et liés au cytosquelette, et peut activer des voies de transduction (Fagotto and Gumbiner, 1996; Hynes, 1999; Adams, 2001).

L'interaction des récepteurs avec le cytosquelette implique que la MEC a un effet sur la cellule, et que celle-ci influence la MEC en retour. Une expérience illustrative consiste à cultiver des cellules sur un film de silicone ; il est alors possible d'observer des mouvements du film provoqués par la tension exercé par les cellules sur celui-ci (Harris et al., 1980). Des expériences plus récentes (Balaban et al., 2001) et d'autres utilisant la technologie des pinces optiques (Choquet et al., 1997) ont permis de mesurer ces forces et de conclure que l'adhésion est un processus dynamique, dépendant d'un équilibre entre les forces de tension issues de la MEC et du cytosquelette.

Les mécanismes moléculaires de l'interaction entre les protéines de la MEC et du cytosquelette les mieux caractérisés sont ceux des intégrines et de la formation de complexe d'adhésion focaux (FAC). Ces mécanismes sont à l'origine de la migration cellulaire des fibroblastes. L'interaction des protéines de la MEC avec les intégrines au niveau des lamellipodes, qui guident la migration des cellules, entraîne la formation d'un complexe focal. Ce complexe focal correspond à un lien entre des molécules de la MEC et le cytosquelette d'actine, ce lien étant réalisé par les intégrines. Dans certains cas, le complexe focal évolue en FAC. Cette évolution correspond à une stabilisation du lien entre la MEC et le cytosquelette. Une étape critique est l'activation, c'est-à-dire l'augmentation de l'affinité de l'intégrine pour son ligand, donc la stabilisation de l'interaction ligand-récepteur. Le signal induisant l'activation et l'évolution d'un complexe focal en FAC peut provenir de l'extérieur (*outside-in*), ou de l'intérieur (*inside-out*). Soit la MEC renforce l'adhésion, soit le cytosquelette renforce le complexe, ce qui influe en retour sur la MEC. L'application de tension sur des billes recouvertes de fibronectine par des pinces optiques provoque la formation de FACs



Figure 34. Le concept de mecano-sensor

Les molécules de la MEC interagissent avec les intégrines. L'activation des intégrines entraîne un remaniement du cytosquelette. La condition est une force mécanique suffisante.

Dans cette expérience, une bille recouverte de fibronectine et appliquée à la surface de la cellule grâce à des pinces optiques. La force mécanique exercée provoque un changement du cytosquelette. Cela implique une mesure par la cellule de la force mécanique, résumé par le concept de *mecano-sensor*.

Cette expérience illustre le fait que l'interaction entre la MEC et le cytosquelette est un processus dynamique.

In Choquet et al. 1997 Cell 88:39

(Chicurel et al., 1998). D'un autre côté, l'activation d'une contraction impliquant la myosine provoque la formation de FACs (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Cette stabilisation du complexe focal en FAC provient donc autant de signaux extérieurs qu'intérieurs, mais dépendrait dans les deux cas de la force mécanique mise en jeu. La mesure de cette force mécanique par le complexe focal (si cette force est assez grande, il y aura stabilisation en FAC) a donné lieu au concept de *mecano-sensor* (Figure 34). Il nous semble cependant prudent de ne pas considérer que ce *mecano-sensor* soit une hypothétique molécule ; c'est plutôt la mesure d'un équilibre impliquant la stabilité du cytosquelette d'actine et celle du réseau de molécules de la MEC. Si les facteurs induisant la formation des FACs sont connus, les mécanismes intracellulaires impliqués dans ce processus le sont beaucoup moins ; la seule donnée sûre est la nécessité de l'activation des *small GTP-binding proteins* rho et rac (Geiger et al., 2001).

L'interaction entre la MEC et la cellule est régulée à plus long terme par l'expression de gènes codant des protéines de la MEC, cette expression étant en partie régulée par l'action de la MEC sur les cellules. Le stress mécanique provoqué par la MEC sur la cellule entraîne une modulation de l'expression des protéines de la MEC (Chiquet et al., 1996; Chiquet, 1999) dont la tenascine-C (Chiquet-Ehrismann et al., 1995).

6.4. Les mécanismes de la migration cellulaire

Les mécanismes de la migration sont étudiés en utilisant les fibroblastes comme modèle. Dans ce cas, la cellule présente un processus nommé lamellipode (Figure 35), qui s'étend dans le sens de la migration (1 : *extension*). Le lamellipode adhère au substrat (2 : *attachment*), le cytosquelette force la contraction de la cellule (3 : *contraction*), l'adhésion cellulaire au substrat est relâchée, la contraction cellulaire entraîne un mouvement (4 : *release*) (Sheetz et al., 1998). Au niveau du lamellipode, un complexe focal est responsable de l'adhésion au substrat. L'adhésion au substrat (*attachment*) relève d'un équilibre : cette adhésion doit être très efficace lors de la *contraction* et du *release* ; puis doit être aussitôt rompue pour permettre l'*extension* (Lauffenburger and Horwitz, 1996). L'adhésion cellulaire doit être un phénomène dynamique afin que le lamellipode puisse adhérer, puis se détacher. Pour cela, deux éléments prennent une part active dans la régulation de la migration : les protéinases extracellulaires (Murphy and Gavrilovic, 1999), et l'endocytose des récepteurs (Kamiguchi and Lemmon, 2000b; Kamiguchi and Yoshihara, 2001).



Figure 35. La migration cellulaire est guidée par le lamellipode

L'attachement et le détachement dépendent de la formation de complexes d'adhésion cellulaires (FACs) et de la dynamique de l'interaction entre la MEC et le cytosquelette. Le détachement dépend du clivage par les protéases extracellulaires et de l'endocytose des récepteurs.

In Gumbiner 1996 Cell 84:345

Au niveau du lamellipode, on observe la formation de FAC. Par conséquent, il est possible d'influer la *protrusion (extension* et *attachment)* du lamellipodie en modulant soit le réseau formé par la MEC, soit en offrant au lamellipodia des signaux qui modifient la stabilité du cytosquelette d'actine. Ainsi, la migration cellulaire se fait de façon préférentielle sur une MEC rigide (Lo et al., 2000). Mais la direction de la migration dépend surtout de la présence dans le milieu extracellulaire de signaux instructeurs qui sont en général des molécules diffusibles dans la matrice extracellulaire.

6.6. Migration cellulaire et croissance axonale dans le système nerveux central

Les mécanismes de l'interaction entre les protéines de la MEC et le cytosquelette ont été expliqué en prenant l'exemple le mieux caractérisé dans la littérature scientifique, le FAC, et une description de la migration cellulaire a été faite à partir du modèle des fibroblastes. Ces données constituent la base qui permettra de comprendre les mécanismes moléculaires de la croissance axonale. Les mécanismes de migration des cellules du SNC et de la croissance axonale sont en effet vraisemblablement très similaires (Hynes and Lander, 1992).

Des observations précises montrent que les neurones en migration le long de la glie radiale utilisent une spécialisation morphologiquement identique à un lamellipode (Figure 36) (Hatten, 1999), mais trop peu d'études ont tenté de caractériser les mécanismes de régulation de la migration des cellules gliales dans le SNC (Tsai and Miller, 2002).

Le développement du SNC implique la mise en place d'un réseau neuronal. Pour cela, les neurones projettent leurs axones vers des cibles précises. Lors de leur développement, l'extrémité des axones présente une structure spécialisée, le cône de croissance. Le cône de croissance est composé de lamellipodes et de filopodes (Figure 37). Ses mouvements sont donc ordonnés par un cytosquelette d'actine. Des observations montrent que les mécanismes moléculaires dirigeant le cône de croissance sont proches de ceux connus du modèle des fibroblastes (Long and Lemmon, 2000). Les GTPases de type rho sont impliquées dans la polymérisation du cytosquelette d'actine dans les lamellipodes des fibroblastes en migration comme dans les cônes de croissance (Figure 38) (Mueller, 1999). Enfin, l'activation des intégrines est nécessaire à la progression du cône de croissance (Ivins et al., 2000). Mais il reste évident que le cône de croissance est une spécialisation unique et évolue dans un MEC spécialisée – sans collagène et fibres de fibronectine, donc sans complexes d'adhésion focaux classiques -, ce qui implique une spécificité des mécanismes cellulaires.



Figure 36. Migration neuronale le long de la glie radiale

La migration des neurones le long de la glie radiale implique une adhésion cellulaire entre le neurone et la glie et est guidée par un lamellipode.

In Hatten 1999 AnnRevNeurosci 22:511



Figure 37. Le cône de croissance

Le cône de croissance est constitué de filopodes et de lamellipodes dans sa partie terminale notée P. Ces spécialisations morphologiques du cône de croissance se distinguent par l'organisation du cytosquelette d'actine et l'absence d'organelles. La partie C du cône de croissance contient des microtubules et des organelles.

In Mueller 1999 AnnRevNeurosci 22:351

6.7. Les protéines de la matrice participent-elles au contrôle de la direction de la croissance des axones ?

L'étude de la croissance axonale pose aussi le problème de la direction de cette croissance. Il est important de comprendre comment le cône de croissance est guidé et de déterminer si les protéines de la MEC participent à la régulation de ce phénomène.

L'apparition de la technique de vidéomicroscopie a permis l'observation précise des comportements du cône de croissance dans les cultures neuronales. Le cône de croissance projette et retracte des filopodes, et les lamellipodes permettent une exploration dans les trois dimensions. Pour atteindre la cible correcte, le cône de croissance doit suivre un trajet dans le tissu. Des études *in vitro* et *in vivo* ont conduit à l'idée que ce trajet est jalonné de signaux instructeurs. Ces signaux ont été résumés par Tessier-Lavigne et Goodman en quatre catégories : attraction et répulsion à distance par des molécules diffusibles, attraction et répulsion par contact (Figure 39) (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Cependant, une même molécule peut être répulsive ou attractive pour le cône de croissance selon le type cellulaire, et - pour une même cellule - selon le niveau de cAMP (Song et al., 1997).

Un autre problème est de distinguer les signaux instructeurs (qui guident la direction de la croissance axonale) et les signaux permissifs (qui favorisent ou inhibent la croissance axonale). On peut distinguer les molécules du type sémaphorines des molécules de la MEC comme la tenascine-C ou la laminine. Les sémaphorines formant un gradient dans un gel de collagène dénaturé sont capables d'induire un changement du direction du cône de croissance (Culotti and Kolodkin, 1996), alors que cet effet n'est pas observé avec la tenascine-C (Franck Rigato, Manuscrit de thèse). De même, à notre connaissance, aucune observation de changement de direction du cône de croissance induit par un protéoglycan dilué dans le milieu de culture n'a été faite, et la formation d'un gradient de protéoglycans de type chondroitine sulfate dans un gel de collagène dénaturé n'induit pas de changement de direction des neurites (Snow and Letourneau, 1992). On pourrait donc distinguer les molécules diffusibles dans l'espace extracellulaire (chemoattraction et chemorépulsion par signaux instructeurs), des molécules de la matrice qui forment le support de la croissance (promotion et inhibition dépendantes de l'adhésion). La situation est sans doute plus complexe. Dans une situation de choix entre un substrat anti-adhésif et un substrat adhésif le cône de croissance progresse sur le substrat adhésif, ce qui peut induire un changement de direction (Gotz et al., 1996) - mais on pourrait alors parler d' « instruction passive ». De plus, la distinction entre protéines

diffusibles instructrices et protéines de la MEC est trop naïve. Ainsi, les netrines sont des molécules diffusibles mais leur séquence est homologue de la chaîne gamma des laminines et leur récepteur DCC appartient à la super famille des Immunoglobulines (Culotti and Merz, 1998) ; et il a été montré que L1, qui est récepteur des molécules de la MEC est corécepteur des sémaphorines (Castellani et al., 2000).

Enfin, un point délicat est celui des gradients de molécules diffusibles. La notion d'action à distance dépend en effet de la formation de gradients de concentration de molécules dans l'espace extracellulaire mais l'existence de ces gradients reste difficile à montrer. Notre connaissance de la composition et de la structure de la MEC ne permet pas de supposer qu'une protéine puisse diffuser passivement en formant un gradient. La formation de tels gradients dépend de la taille de la protéine, de l'interaction de cette protéine avec les molécules environnantes dans l'espace extracellulaire et avec les récepteurs et transporteurs présents à la surface des cellules. La compréhension de la structure du réseau moléculaire qu'est la MEC, présenté dans le chapitre 3., est nécessaire à la compréhension de la mise en place de gradients.



Figure 38. Voies de tranduction impliquées dans la croissance axonale

Le cône de croissance est guidé par des molécules de l'espace extracellulaire. Ces molécules influent sur le cytosquelette d'actine en activant des voies de transduction similaires à celles connues par les études de la migration des fibroblastes.

In Mueller 1999 AnnRevNeurosci 22:351



Figure 39. La croissance de l'axone dépend de signaux qui peuvent être divisés en quatre catégories

On distingue d'une part l'attraction de la répulsion ; d'autre part l'action à distance par des protéines diffusibles, de l'action locale par des protéines de la MEC et des protéines présentes sur la membrane des cellules voisines.

In Tessier-Lavigne et Goodman 1996 Science 274:1123

7. IMPLICATION DES PROTEINES DE LA MATRICE DANS CERTAINES PATHOLOGIES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

De nombreuse études ont montré que les protéines de la MEC interviennent dans le contexte de pathologie dans le SNC. L'implication de protéines de la MEC dans le développement des tumeurs, de la maladie d'Alzheimer, de l'épilepsie ainsi que dans les conséquences pathologiques de lésions a été mise en évidence.

Une présentation de l'implication des protéines de la MEC dans le développement des tumeurs et de la maladie d'Alzheimer est donnée dans le chapitre « The Extracellular Matrix in Neural Development, Plasticity, and Regeneration » (manuscrit 1).

L'observation de variations d'expression de protéines de la MEC dans l'hippocampe épileptique a été faite. Les résultats de l'ensemble des travaux présents dans le littérature est présenté dans l'introduction aux résultats concernant nos propres travaux sur l'expression de protéines de la MEC dans un modèle murin de l'épilepsie (cf. La matrice extracellulaire dans l'épilepsie dans la section Résultats). Comme les protéines de la MEC participent à la régulation de la fasciculation et de la croissance axonale (cf. 5.1.) et de l'activité neuronale (cf. 5.5.), elles pourraient participer activement au phénomène d'épileptogenèse (cf. discussion du manuscrit 4).

L'implication des protéines de la MEC est particulièrement étudiée dans l'inhibition de la régénération axonale après lésion du système nerveux central. Comme expliqué dans l'introduction au manuscrit 6, une expression de protéines de la MEC par les astrocytes réactifs situés autour du site de lésion, corrélée avec l'observation de l'inhibition de la croissance neuritique par certaines protéines de la MEC laisse supposer que des protéines de la MEC présentes autour du site de lésion pourraient inhiber la régénération axonale. L'expression de protéines de la MEC dans les sites lésionnels est importante car une cicatrisation du tissu nécessite la formation d'une nouvelle membrane basale contre la *glia limitans* et la formation d'une MEC après phagocytose par la microglie des débris cellulaires issus de la lésion.

Manuscrit 1

"The Extracellular Matrix in Neural Development, Plasticity, and Regeneration"

Jeremy Garwood, Nicolas Heck, Franck Rigato et Andreas Faissner

chapter 5 in "The neural microenvironment", edited by W. Wlaz ; Humana Press, Totowa New-Jersey



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Jeremy Garwood, Nicolas Heck, Franck Rigato et Andreas Faissner

The extracellular matrix in neural development, plasticity, and regeneration.

Chapter 5 in «The neural microenvironnement », edited by W. Walz; Humana Press, Totowa New-Jersey

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: <u>peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr</u>.

RESULTATS

ETUDE DE L'EXPRESSION DES COLLAGENES FIBRILLAIRES

ETUDE DE L'EXPRESSION DES COLLAGENES FIBRILLAIRES

Manuscrit 2

"Astrocytes express fibrillar collagens in culture"

Manuscrit 3

"The absence of collagen fibers is a unique property of the brain extracellular matrix which depends on crosstalk between astrocytes and meningeal cells and implies the EGF pathway"

1. Introduction

La matrice extracellulaire (MEC) du système nerveux central (SNC) présente des propriétés uniques. A la différence des autres tissus, le SNC ne contient pas de fibres insolubles formées par polymérisation de protéines de la MEC (cf. chapitre 1.2. de l'introduction générale). La fibronectine n'est exprimée que durant les stades développementaux et ne semble pas former de fibres. Les collagènes fibrillaires, qui sont présents dans la totalité des MEC des autres tissus, n'ont jusqu'ici pas été détectés (cf. chapitre 4.1.1.7. de l'introduction). Les collagènes fibrillaires ne sont présents qu'au niveau de la membrane basale placée entre les méninges et la *glia limitans* (cf. chapitre 1.3. de l'introduction). La MEC du SNC est composée d'acide hyaluronique, de protéoglycans et de glycoprotéines qui interagissent pour former un réseau macromoléculaire (cf. chapitre 2. et 3. de l'introduction).

Cette propriété du SNC a jusqu'ici été considérée comme une conséquence de l'absence d'expression de collagènes par les astrocytes, qui sont la principale source des protéines constituants la MEC du SNC.

Notre étude (manuscrits 2 et 3), présentent des résultats nouveaux concernant l'expression des collagènes par les astrocytes et conclue à une inhibition active de cette expression dans le SNC qui explique l'absence de collagènes dans la MEC du SNC.

2. Production de l'anticorps F1C3

Dans une étude précédente, notre laboratoire s'est intéressé à l'expression des protéines de la MEC par les astrocytes réactifs présents dans les lésions du SNC. Il a été montré que les molécules de la MEC exprimées par les astrocytes réactifs constituent une barrière fonctionnelle pour la régénération des axones (cf. introduction au manuscrit 6). L'étude en culture des astrocytes réactifs n'étant pas possible, un modèle a été développé. Une lignée astrocytaire, nommée Neu7, a été sélectionnée pour ses propriétés inhibitrices de la croissance neuritique en comparaison aux astrocytes primaires et à d'autres lignées astrocytaires comme la lignée A7 (Fidler et al., 1999).

Dans le but d'isoler de nouvelles protéines de la MEC potentiellement impliquées dans l'inhibition de la régénération, des anticorps monoclonaux ont été générés contre des antigènes issus de la lignée Neu7. Un anticorps monoclonal de souris, nommé F1C3, a ainsi été produit.

3. Les astrocytes expriment des collagènes en culture

Des expériences d'immunocytochimie et de western blot montrent que l'anticorps F1C3 reconnaît des antigènes exprimés par la lignée Neu7, mais aussi par la lignée A7 et par les gliomes C6 et U373.

Afin de caractériser l'antigène, une purification sur colonne d'affinité a été réalisée. Les séquences peptidiques isolées à partir de bandes reconnues en western blot par F1C3 montrent une forte homologie avec les collagènes. Cependant, la forte homologie entre les différents types de collagènes ne permet pas de déterminer les types reconnus par l'anticorps F1C3.

Les expériences de western blot révélent plusieurs bandes dans le lysat et la milieu conditionné des cellules Neu7, ce qui laisse supposer que l'anticorps reconnaît plusieurs types de collagènes exprimés par les cellules Neu7. Le clivage complet des bandes reconnues par F1C3 en western blot après digestion des extraits protéiques à la collagénase confirme que les cellules Neu7 exprime des collagènes. Le patron d'expression des bandes reconnues dans le

lysat cellulaire est différent de celui observé avec le milieu conditionné. Cette différence est sans doute due à la maturation des collagènes dans l'espace extracellulaire (cf. chapitre 4.1.1.4. de l'introduction).

L'expression par les astrocytes primaires des collagènes reconnus par F1C3 a été étudiée. Des expériences d'immunocytochimie réalisée avec l'anticorps F1C3 montrent un marquage intracellulaire des cellules exprimant la GFAP. Les astrocytes en culture synthétisent donc des collagènes. Plusieurs bandes sont reconnues par F1C3 dans des expériences de western blot, avec un pattern similaire à celui observé avec les cellules Neu7. L'expression de collagène n'est donc pas restreinte à la lignée cellulaire Neu7 mais est une propriété générale des astrocytes.

4. Caractérisation de l'antigène

La famille des collagènes comprend différents types qui présente une très forte homologie dans leurs séquences peptidique. Les séquences peptidiques des collagènes présentent en effet un résidu glycine tous les trois acides aminés. De par cette homologie, les séquences peptidiques obtenues par purification de l'antigène sur colonne d'affinité ne permettent pas de déterminer quel type de collagène est reconnu par l'anticorps F1C3. Le criblage d'une banque d'ADN complémentaire de cerveau de rat a donc été réalisé. Ce criblage a permis de déterminer que l'anticorps F1C3 reconnaît des collagènes de la famille des collagènes fibrillaires, nommément les chaînes α 1 du type I, α 1 du type III et α 2 du type V.

Une cartographie de la séquence codant l'antigène a été réalisée. L'anticorps reconnaît une séquence peptidique de 7 acides aminées (GPPGPVG). On remarque la présence de 3 résidus glycine et 3 résidus proline, qui sont les acides aminés majoritaires des séquences des collagènes. Cette séquence est caractéristique des séquences peptidiques des domaines triple hélices des collagènes fibrillaires (cf. chapitre 4.1.1.2. de l'introduction).

L'expression de ces trois collagènes par les astrocytes en culture a été confirmée par des expériences de PCR. Les astrocytes primaires expriment des collagènes fibrillaires en culture.

5. Les astrocytes ne forment pas de fibres de collagènes

Les astrocytes en culture forment une matrice péricellulaire composée d'acide hyaluronique, de protéoglycans et de glycoprotéines (cf. chapitre 2. de l'introduction). Puisque les astrocytes expriment des collagènes fibrillaires, on peut supposer qu'ils puissent former des fibres de collagènes. Comme les méthodes de préparation des cellules (fixation et perméabilisation) pourraient détruire une matrice extracellulaire fibrillaire, des tests ont été réalisés sur des culture de cellules de méninges (cf. chapitre 5. des méthodes). Ces cellules forment en culture une MEC formée de fibres de fibronectine et de collagènes, elles ont donc été choisies afin de déterminer des conditions d'expériences optimales et de vérifier si l'anticorps F1C3 reconnaît les collagènes lorsque ceux-ci sont conformés en fibres. Lorsque des expériences similaires sont réalisées en parallèle sur des cellules des méninges et des astrocytes, on observe que les astrocytes ne forment pas de fibres de collagènes.

Différentes hypothèses pouvant expliquer cette absence de fibres ont été testées. La formation et la secrétion de triples hélices de collagènes a été vérifiée en western blot après digestion à la pepsine de lysat d'astrocytes – les triples hélices de collagènes ont une conformation qui les rend résistantes à la pepsine. La formation de fibres est dépendantes de la lysil oxydase, dont l'acide ascorbique est le cofacteur essentiel (cf. chapitre 4.1.1.5. de l'introduction). La fibrillogenése des collagènes est dépendante de la formation de fibres de fibronectine, et cette protéine n'est pas exprimée pas les astrocytes. Des expériences réalisées sur des cultures supplémentée en acide ascorbique et traitée avec de la fibronectine purifiée montrent que ces éléments ne suffisent pas à la formation de fibres de collagènes par les astrocytes.

Les astrocytes ne peuvent pas former de fibres de collagènes, puisque la présence de fibronectine est nécessaire et qu'ils n'expriment pas cette protéine. Cependant, même après un traitement à la fibronectine suffisant à la formation de fibres de collagènes par les fibroblastes en culture issues d'une souris *knock-out* pour le gène codant la fibronectine, les astrocytes restent incapables de former des fibres. D'autres facteurs nécessaires à la formation des fibres de collagènes doivent donc être absent. Une explication à l'absence de fibrillogenèse serait un défaut dans le clivage des propeptides, puisque ce clivage est nécessaire pour que les triples hélices de collagènes se lient et forment des fibres.

6. Expression des collagènes fibrillaires in vivo

Puisque les astrocytes expriment des collagènes en culture, l'expression de collagènes *in vivo* a été étudié. Pour cela, des études ont été réalisées avec l'anticorps F1C3. Des expériences d'immunohistochimie par des techniques classiques n'ont pas révélés de présence de collagènes dans le cerveau. Des techniques de détection spécifique ont donc été testées (cf. chapitre 2. des méthodes). Les différentes méthodes de préparation et de fixation du tissu, ainsi que les techniques de restauration d'antigène sur coupes, mais l'ensemble de ces expériences n'ont pas permis de révéler la présence de collagène dans le SNC, en dehors des membranes basales.

On peut poser l'hypothèse que les astrocytes contribuent à l'établissement de la membrane basale (cf. chapitre 1.3. de l'introduction). Dans ce cas, les collagènes exprimés par les astrocytes seraient secrétés et localisés dans la membrane basale adjacente à la *glia limitans*, ce qui expliquerait les résultats négatifs des études d'immunohistochimie. Dans le but de tester cette hypothèse, une étude de l'expression *in vivo* a été réalisée par hybridation *in situ*. Cette étude a été réalisée sur des rats au 1^{er} et 7ème jours postnataux puisque c'est durant cette période que la membrane basale est formée (Del Bigio, 2001). Les résultats montrent que les cellules des méninges expriment les collagènes fibrillaires, mais aucune expression astrocytaire n'est observée.

L'expression par les cellules des méninges est importante car elle représente un contrôle positif interne, montrant que les expériences d'hybridation *in situ* sont probantes. Cependant, un problème possible concerne le niveau d'expression. Si les astrocytes expriment très faiblement les collagènes, le niveau de détection des hybridation *in situ* pourrait être insuffisant. Cependant, nos résultats, associés à des études antérieures montrant l'absence de détection de collagènes dans le SNC à différents stades de développements conduisent à penser que les astrocytes n'expriment pas de collagènes *in vivo*. Enfin, les résultats des expériences suivantes vont dans le sens de cette analyse.

7. Les cellules des méninges inhibent l'expression de collagène par les astrocytes

Si les astrocytes expriment des collagènes fibrillaires en culture, mais que cette expression n'est pas présente in vivo, cela implique soit l'existence d'un mécanisme inhibant

cette expression dans le SNC, soit une activation de l'expression des collagènes par les conditions expérimentales de la culture cellulaire (absence d'autres types cellulaires, milieu de culture, substart de culture etc.). Il a été montré que les cellules des méninges régulent l'expression astrocytaires de protéines de la MEC (Ness et al., 1997). Nous avons donc testé l'influence des cellules des méninges sur l'expression des collagènes par les astrocytes.

Des cocultures ont été réalisées. Dans ces conditions, les astrocytes et les cellules des méninges forment des monocouches concomittantes. La formation d'une glia limitans peut être observé à l'interface des monocouches (Shearer et Fawcett, 2001). Des expériences d'immunocyotchimie montre que les cellules des méninges (identifiées par à un marquage pour la fibronectine) expriment les collagènes reconnus par l'anticorps F1C3. Par contre, on observe que les astrocytes (identifiée par un marquage pour la GFAP) n'expriment pas les collagènes. Afin de déterminer si cet effet est dépendant du contact cellulaire ou d'un facteur soluble, des cocultures ont été réalisées en utilisant le système millicell. Ce système permet la coculture de deux types cellulaires dans un milieu commun mais empêchant tout contact cellulaire. Ce type de coculture est réalisable dans notre cas puisque le milieu de culture utilisé pour les astrocytes et pour les cellules des méninges est identique. Les facteurs secrétés par les deux types cellulaires sont en contact avec chaque type cellulaire à condition de passer au travers du filtre qui sépare les cellules. Le filtre qui a été choisi présente des pores de 0,4µm, qui doivent permettre la diffusion de molécules de grande tailles. Dans ces conditions de coculture, on observe une diminution significative du pourcentage d'astrocytes exprimant des collagènes. Il est peu probable que cet effet soit du à un appauvrissement du milieu par les cellules des méninges, puisque l'effet est observé après seulement 24 heures de coculture dans du milieu frais. Ces résultats laissent supposer que les cellules des méninges secrétent un facteur inhibant l'expression des collagènes par les astrocytes.

8. Mise en évidence d'une boucle autocrine inhibitrice dépendante du récepteur à l'EGF

8.1 L'EGF inhibe l'expression des collagènes

Dans le but de déterminer quel facteur pourrait être responsable de cet effet, nous avons testé l'effet de différentes cytokines sur l'expression de collagènes par les astrocytes. Le traitement par les cytokines est réalisé en milieu défini pendant 24 heures à une concentration de 10ng/ml. Le niveau d'expression des collagènes est estimé par PCR, le niveau d'expression de la GAPDH dans chaque conditions servant de contrôle. Il a été montré que le *Transforming Growth Factor* β (TGF β) entraîne une augmentation de l'expression des collagènes, et que le *Tumor Necrosis Factor* α (TNF α) et l'*Interferon* γ (INF γ) entraînent une diminution de l'expression des collagènes. Ces conditions permettent donc de servir de contrôle positif. On observe que nos conditions de traitement et l'utilisation de la technique de PCR permettent d'observer les effets de ces cytokines. L'étude des effets des cytokines montrent que l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) provoque une diminution de l'expression des collagènes.

Afin de confirmer l'effet de l'EGF sur l'expression des collagènes par les astrocytes, le pourcentage d'astrocytes exprimant les collagènes a été observé par immunocytochimie. Ce pourcentage est significativement réduit après traitement des astrocytes avec l'EGF.

Les facteurs TNF α et INF γ sont impliqués dans des processus inflammmatoires ; l'EGF est par contre une cytokine principalement exprimée lors du développement du SNC, il pourrrait donc être impliqué dans la régulation de l'expression des collagènes dans le SNC.

8.2. L'EGF agit sur les astrocytes par une voie autocrine

Durant la période postnatale, les astrocytes expriment l'EGF, et une expression de l'EGF par les astrocytes a été montrée en culture. Par conséquent, il pourrait exister un mécanisme autocrine de régulation de l'expression des collagènes. Afin de tester cette hypothèse, des cultures d'astrocytes ont été traitées avec un inhibiteur du récepteur à l'EGF, la tyrphostine AG99. On observe une augmentation significative du pourcentage d'astrocytes exprimant les collagènes après traitement à l'AGG99 en comparaison au contrôle. L'expression de collagène par les astrocytes est donc inhibée par un mécanisme autocrine faisant intervenir l'EGF.

8.3. Les méninges inhibent l'expression des collagènes indépendamment de l'EGF

L'inhibition de l'expression des collagènes par les cellules des méninges pourrait soit impliquer le récepteur à l'EGF, soit impliquer un mécanisme différent. Dans le premier cas, on peut envisager soit que les méninges expriment l'EGF, soit qu'elles expriment un facteur que induit l'expression de l'EGF par les astrocytes. Afin de déterminer si le mécanisme d'inhibition des méninges implique le récepteur de l'EGF, nous avons comparé des cultures d'astrocytes traitées avec l'inhibiteur du récepteur à l'EGF en présence et en absence des cellules des méninges. Si l'inhibition par les cellules des méninges implique le récepteur à l'EGF, cette inhibition devrait être bloquée en présence de l'inhibiteur du récepteur. Les résultats de l'expérience montrent que les cellules des méninges induisent une réduction du pourcentage d'astrocytes exprimant des collagènes même en présence de l'inhibiteur du récepteur de l'EGF. Par conséquent, le mécanisme d'inhibition par les méninges de l'expression des collagène est indépendant du récepteur de l'EGF.

9. Conclusion

En conclusion, nous avons montré que les astrocytes peuvent exprimer des collagènes fibrillaires mais que cette expression est inhibée par au moins deux mécanismes. D'une part les cellules des méninges (M) inhibent l'expression astrocytaire de collagènes, d'autre part les astrocytes (A) inhibent leur propre expression de collagène par un mécanisme autocrine dépendant du récepteur de l'EGF. Ainsi, les astrocytes ont la capacité de synthétiser des collagènes fibrillaires, mais deux mécanismes inhibent cette expression, ce qui explique que la matrice extracellulaire du système nerveux central soit dépourvue de collagènes.



10. Perspectives

10.1. Inhibition par les cellules des méninges, un rôle pour SDF-1 ?

Si les méninges secrétent un facteur soluble inhibiteur, son identité reste inconnu. Par conséquent, il est difficile de déterminer si ce facteur – qui serait présent dans le liquide céphalorachidien - pourrait agir uniquement sur les astrocytes formant la *glia limitans* ou pourrait diffuser dans le SNC. Nous pouvons cependant poser une hypothèse de travail.

Il a été montré que les cellules des méninges expriment durant la période postnatale une cytokine, SDF-1 (Zhu et al., 2002). Il a de plus été montré que SDF-1 interagit avec le récepteur CXCR4, exprimé par les astrocytes, et que l'activation de CXCR4 par SDF-1 provoque l'expression de TNF α par les astrocytes (Bezzi et al., 2001). Or, nos études montrent que TNF α inhibe l'expression des collagènes. Les cellules des méninges pourraient donc, via SDF-1, provoquer une expression astrocytaire de TNF α et inhiber l'expression des collagènes. Afin de tester cette hypothèse, des expériences pourraient être réalisées. Des cultures d'astrocytes en présence de cellules des méninges cultivées dans le système milicell pourraient être faites en présence et en absence d'un anticorps bloquant du récepteur CXCR4, l'anticorps monoclonal 12G5 (R&D System). Si le facteur inhibiteur secrété par les cellules des méninges est le SDF-1, la présence de l'anticorps devrait empêcher l'inhibition de l'expression des collagènes. Cette expérience nous permettrait de confirmer ou d'invalider notre hypothèse de travail.

10.2. Existe-t-il un régulation de la fibrillogenèse dans le SNC ?

Nos études montrent que les astrocytes secrétent des triples hélices de collagènes mais ne forment pas de fibres. Cette absence de fibres est due à l'absence d'expression de la fibronectine, puisque la présence de la fibronectine est nécéssaire à la formation de fibres de collagènes, mais l'ajout de fibronectine purifiée dans le milieu ne suffit pas à la formation de fibres de collagènes par les astrocytes. Cela signifie que soient d'autres facteurs nécéssaires à la fibrillogenèse sont absents, soient qu'un mécanisme inhibant la fibrillogenése est mis en place. Ces observations sont à mettre en parallèle avec les études de l'expression de la fibronectine dans le neuroépithélium. Dans le neuroépithélium, la fibronectine est exprimée, mais ne forme pas de fibres (Sheppard et al., 1991). L'absence de fibres est donc une
propriété générale de la MEC formée par les astrocytes, même dans les cas d'expression de collagène – en culture – et de fibronectine – *in vivo*. A ce stade, nos études ne permettent pas d'expliquer pourquoi il n'y a pas de formation de fibres insolubles de collagènes et de fibronectines dans les cultures d'astrocytes et dans la MEC du SNC.

10.3. Les astrocytes réactifs expriment-ils des collagènes ?

Si l'absence d'expression des collagènes par les astrocytes est dépendante de mécanismes inhibiteurs, il serait possible que dans des situations pathologiques ces mécanismes soient perturbés et qu'une expression astrocytaire de collagène soit alors possible. Cette hypothèse est particulièrement intéressante dans le cas d'appartion de lésions du SNC. En effet, les lésions entraînent des changements histopathologiques incluant la formation de membranes basales. Cependant, les cytokines inflammatoires INF γ et TNF α sont exprimées dans les lésions et nos travaux montrent qu'elles inhibent l'expression des collagènes. De plus, les cellules des méninges qui envahissent le site de lésion pourraient inhiber l'expression des collagènes comme nous l'avons montré dans les expériences de coculture.

L'expression de collagènes par les astrocytes réactifs dans les sites de lésions n'a jamais été montrée, à l'exception du collagène IV (Liesi et Kauppila, 2002). La mise en évidence de l'expression de collagènes fibrillaires par les astrocytes réactifs est rendue difficile de par le fait que les cellules des méninges envahissent le site de lésion. Des hybridation *in situ* couplées à un marquage immunohistochimique pour la GFAP permettraient de déterminer si les astrocytes réactifs expriment des collagènes fibrillaires.

Manuscrit 2

"Astrocytes express fibrillar collagens in culture"

Nicolas Heck, Jeremy Garwood, Katrin Schütte, James Fawcett et Andreas Faissner

Glia 2003 vol. 41 : 382-383



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Nicolas Heck, Jeremy Garwood, Katrin Schütte, James Fawcett et Andreas Faissner ASTROCYTES EXPRESS FIBRILLAR COLLAGENS IN CULTURE Glia 2003, vol. 41 : 382-392

Pages 382-392 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/102526760/PDFSTART

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

Manuscrit 3

"The absence of collagen fibers is a unique property of the brain extracellular matrix which depends on crosstalk between astrocytes and meningeal cells and implies the EGF pathway"

Nicolas Heck, Jeremy Garwood, Alexandre Dobbertin et Andreas Faissner

Manuscrit en préparation

INTRODUCTION

The secretion by cells of proteins and carbohydrate polymers into the extracellular environment and the interaction of these molecules with each other and with the cellular surfaces leads to the formation of extracellular matrices. The nature of these extracellular matrices can be quite complex, forming basement membranes to delineate and provide structural support for tissues, or connective tissue, an intracellular system which also provides structural support within a tissue. However, there is increasing evidence that not only does the nature of the ECM influence the diffusion of soluble factors, such as cytokines, which affect cellular behaviour, but that the ECM molecules themselves encode signalling information which can be interpreted by the cells through receptor systems and intracellular signalling cascades (J Garwood, 2002).

In the central nervous system, the nature of the ECM is rather "loose", that is to say, that in comparison with other body tissues which have a relatively densely packed assembly of cells and connective tissue, the CNS has a more open dynamic structure, especially during development of its cortical structures, when extensive cellular migration occurs and there is the generation of the complex networks of neuronal processes which characterise the nervous system (Hockfield, 1996).

One striking difference in the composition of this ECM relative to other tissues is the absence of fibre-forming proteins, which represent the foundations for the sturdier ECM structures found in other tissues.

Although there have been some reports of a low-level transient expression of some of these proteins during CNS development, notably of laminin (Pearlman and Sheppard, 1996), the presence of collagens, the largest and most abundant group of fibre-forming molecules has not been clearly established.

Most of the ECM in the CNS is produced by glial cells, especially astrocytes, which represent the most abundant cell type in the post-natal and adult CNS. We have recently reported the characterisation of a collagen-specific monoclonal antibody, F1C3, that was raised against protein secreted from astrocytic cell lines (Heck et al., 2003). The antigen recognised by mAb F1C3 was shown to be highly homologous to fibrillar collagens based on internal peptide sequences, and could be specifically digested by collagenase I protease.

We further showed that cultures of primary astrocytes also express the F1C3 antigen, and that it is present in brain extracts from different developmental stages.

Here, we report the expression cloning of fibrillar collagens recognised by mAb F1C3, and the mapping of the epitope. Although we have extensively looked for evidence of an in vivo expression of these fibrillar collagens by astrocytes in the developing CNS, none was found. Hence we have addressed the question as to why astrocytes in vitro are expressing fibrillar collagen when those in vivo do not appear to do so. Evidence is presented that astrocytes in vivo are subject to inhibitory factors, including EGF, which are tightly regulating collagen expression. Based on these observations, the significance of such a tight regulation of astrocytic collagen expression in the CNS is discussed.

MATERIEL AND METHODS

Antibody Screening of cDNA expression libraries

The monoclonal antibody, F1C3, was used to screen for proteins expressed by a cDNA library prepared from 14 to 16 day old male and female rat brains cloned unidirectionally into a modified phage Lambda vector, Uni-ZAP XR (Stratagene) using standard procedures.

500,000 phage were screened, yielding 5 positive clones. These were purified, and the DNA sequence obtained by phagemid excision.

All of the positive clones contained sequences coding for fibrillar collagens: 3 of the clones corresponded to collagen alpha 1(III), and the other two to collagens alpha 1(I), and alpha 2 (V).

Epitope mapping

In order to map more precisely the epitope recognised by the monoclonal antibody, F1C3, various fragments of the cloned cDNA for collagen 1(III) were subcloned into the expression vector, pGEX-4T-2, and expressed in E. coli as GST fusion proteins.

The fragments tested were generated from the plasmid, p6, using the following primer combinations:

Sense: Col13GST.F (BamH1) 5'-TCC T<u>GG ATC C</u>CA AGG TCT TCC T Antisense:Col13GST.3R (BamH1) 5'-AAA C<u>GG ATC C</u>AA TGT CCA CAC C Col13GST.1R (BamH1) 5'-CCT C<u>GG ATC C</u>TC TTT CAC CTC T GST-1MR (Sal1) 5'-AAC <u>GTC GAC</u> GAC CTG GAT TGC C GST-1SR (Sal1) 5'-CTC T<u>GT CGA C</u>AC TCT TTC CAG A GST-S1-XSR (Sal1) 5'-CCA GGT CGA CCA TTT TCA CCA C

The PCR products were digested with BamH1 or Sal1, corresponding to restriction sites introduced by the primers, and ligated into the pre-digested vector. Constructs were confirmed by DNA sequencing from both ends. Production of GST fusion proteins followed established procedures with IPTG induction (1mM) of log phase bacterial cultures.

After 3 hours induction, bacteria were harvested and centrifuged. Bacterial pellets were lysed with SDS sample buffer and aliquots separated on SDS-PAGE gels. Separated

proteins were transferred to PVDF membrane using a semi-dry apparatus. Membranes were blocked with 4% milk in PBS-T, then incubated with F1C3 for 2 hrs. rt, rinsed, and incubated with HRP-conjugated rat anti-mouse IgG secondary antibody for 1 hr at rt. Blots were revealed using the ECL system and X-ray film.

Cell culture

For primary culture of astrocytes, cerebral hemispheres from P0 rats were dissected. The meninges were removed, then the hemispheres were passed through a fine sieve with 48 μ m pores. One hemisphere was diluted in 40 ml of culture medium (DMEM containing 10% foetal calf serum), and placed in culture in plastic dishes treated with 15 µg/ml poly-L-lysine (PLL) in borate buffer pH8 for ten to thirteen days. The medium was changed on the third day and then every two days, and a monolayer of astrocytes was observed on the tenth day. Any oligodendrocyte precursor cells present on the astrocytic monolayer were removed by pressure pulses generated with a syringe and their absence was checked by immunostaining with a monoclonal antibody directed against A2B5. For immunofluorescence, glass coverslips treated with 15 µg/ml PLL were used.

Cytokine treatment

For cytokines and AG99 treatments, astrocyte culture was performed as described. After ten days, medium was replaced by defined medium (DMEM supplemented with 50µg/ml Insulin, 100µg/ml Transferrin and 500µg/ml Bovine Serum Albumine) for 48 hours. Then fresh defined medium with cytokines or AG99 was added for 48 hours. All cytokines or growth factors were tested at a final concentration of 10 ng/ml except for IL6 which was used at 2 ng/ml and EGF which was used at 10ng/ml or 20ng/ml. The inhibitor of EGF receptor phosphorylation AG99 was used at 50µM. Recombinant cytokines: human Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1), rat Interleukin 1 β (IL1 β), rat Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), human Epidermal Growth Factor (EGF), human Platelet Derived Growth Factor-AB (PDGF-AB), rat Tumor Necrosis Factor α (TNF α) and rat Interferon γ (IFN γ) were from R&D Systems (Abingdon, Oxon, UK). Human basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), mouse Interleukin 6 (IL6) and human Leukemia Inhibitory factor (LIF) were from Boehringer Mannheim-Roche (Lewes, UK).

Meningeal cells

For culture of meningeal cells, meninges were removed from P0 rat hemispheres and dissociated for 15 minutes at 37°C in 0,25% trypsin, 3% collagenase in PBS. Cells were washed by centrifugation at 800rpm for 5 minutes and were plated in DMEM containing 10% foetal calf serum in plastic dishes treated with 15 μ g/ml PLL in borate buffer pH8. For direct coculture experiments, astrocytes and meningeal cells were prepared from P0 rat hemispheres as described and plated into the same dish.

For the two-chamber transwell (or millicell) coculture system, astrocytes were plated into 6-holes wells or 100mm dishes and then the millicell chamber containing the meningeal cells was introduced into the dish. In this way, the meningeal cells were separated from the astrocytes in the main chamber by a porous membrane (μ m) that allowed diffusion of small molecules between the two chambers. Fresh medium was introduced at the start of the transwell coculture experiments. Incubations were maintained for upto 4 days.

Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes. The cells were permeabilized with methanol at room temperature for 5 minutes, then washed with PBS. After a 1 hour blocking step with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS, the primary antibodies were incubated for 2 hours at room temperature in 3% BSA/PBS (F1C3 1/200 ; rabbit polyclonal Ab against GFAP 1/400; Dako). After several washes in PBS, secondary antibodies were incubated for 1 hour at room temperature in 3% BSA/PBS (goat anti-rabbit-IgG conjugated with the dye, Cy2, 1/800, and goat anti-mouse-IgG conjugated with the dye, Cy3, 1/800 (R and D Systems)). After several washes in PBS, coverslips were rinsed in H₂O and mounted on slides in mowiol. For the staining of the collagen and fibronectin fibers, the permeabilization step was omitted.

Preparation of conditioned medium

For the preparation of conditioned medium, the medium was removed and after two washes with PBS the cells were collected and inhibitors of proteases were added (Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostics), with 2mM EDTA. Protein concentration was determined using the Bradford test with the BioRad kit (Bio-Rad).

Western blots

Samples were boiled for 5 minutes in reducing SDS-PAGE sample buffer and loaded on 6% SDS-PAGE gels. The proteins separated by electrophoresis were transferred to PVDF membranes (Amersham Pharmacia Biotech). Blots were blocked in 4% skimmed milk powder/PBS-T (0.05% Tween 20 in PBS) for 30 minutes. F1C3 antibody was incubated in blocking solution for two hours. After three washing steps of ten minutes in PBS-T, a goat anti-mouse antibody coupled to horseradish peroxidase (1/5000; Jackson Labs) was incubated for one hour in blocking solution. After washing in PBS-T, blots were developed with an ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech) used according to the manufacturer's instructions. For collagenase digestion, 100µg of proteins were digested by 0.1µg of collagenase (purified from Clostridium histolyticum, EC 3.4.24.3. Sigma) in 50mM Tris, 50mM NaAcetate, pH8 at 37°C for 1 hour. For pepsin digestion, 100µg of proteins were digested for 1 hour at 37°C with 1µg of pepsin (purified from hog stomach mucosa, EC 3.4.4.1. Sigma) in 50mM Tris, 50mM NaAcetate, pH8, putted at pH2 by adding 1µl of 9% TriFluoroacetic Acid; ?? Tris pH8,8 was added to obtain pH7 before collagenase digestion or electrophoresis migration. As controls, samples were incubated in the same buffer for 1 hour at 37°C without the enzyme.

In situ hybridization

Brains were removed from rats of the indicated ages and thrown into a bath of 4% PFA for 2 hours at 4°C, then into 20% sucrose in PBS at 4°C overnight. Brains were frozen in isopentane at - 45°C. 14 μ m cryosections were cut and kept at - 80°C. After permeabilization in RIPA buffer for 15 minutes, the sections were washed in SSC 2x then treated by 100mM triethanolamine pH 8 for 5 minutes, then were acetylated by adding 500 μ l of acetic anhydride to 200ml of triethanolamine solution. Sections were washed with SSC 2x and then hybridized overnight at 58°C in 50% deionized formamide, SSC 4x, 10% dextran sulfate, 10 mM dithiothreitol, 0.25 mg/ml yeast total RNA and 0.5 mg/ml DNA herring sperm. After hybridization, the section were quickly washed in SSC 2x, then in SSC 0.1x at 55°C for 1 hour and RNAase (50 µg/ml) treatment was performed for 1h at 37°C in SSC 2x. Sections were then treated for 30 minutes with maleate buffer (0.1 M maleate, 0.15 M NaCl pH 7.5), sections were rinsed for 1 minute in maleate buffer with

0.05% tween 20 and blocked with maleate buffer with 2% bovine serum albumine (BSA) for 1 hour. The blocking solution was removed, and sections were incubated for 2 hour at room temperature with alkaline phosphatase-conjugated sheep antidigoxygenin Fab fragments (Boehringer Mannheim) diluted 1/500 in maleate buffer with 2% BSA.Sections were washed 15 minutes in maleate buffer and treated with 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl and 0.05 M MgCl2 pH 9.5 for 1 hour. Color development was carried out by treatment with 337.5 μ g/ml nitro blue tetrazolium and 175 μ g/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate in 0.1 M Tris, 0.1M NaCl, 0.05 M MgCl2 pH 9.5. When color development was complete, sections were washed in SSc 2x and mounted in 60% glycerol 40% PBS.

Riboprobes

The following primer pairs were used to amplify the fragments indicated in Figure x: Collagen 1(I): sense +2012 5'-TGG TGA ACG TGG TGT ACA AGG T Antisense +2784 5'-AGC ACC AGG AGA TCC TTT CTC A Collagen 1(III): sense +3035 5'-CAG GTA TCA AGG GTG AAA GTG G Antisense +3730 5'-AGA CTT TTC ACC TCC AAC TCC A Collagen 2(V): sense +3160 5'-AGA AGG TCC GGC TGG TAA TGA T Antisense +3780 5'-TGT TTG TGT CAT CTG GAG CTG C These PCR products were ligated into the plasmid vector, pCR2.1 (InVitrogen) and DIG-

labelled riboprobes generated in both senses following linearisation of the plasmids.

RNA isolation

After removing the culture medium, cultured cells were lysed and scraped directly from the culture dish with 4M guanidinium thiocyanate solution. Total RNA was then prepared according to the method described by Chomczynski and Sacchi (1987).

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Reverse-transcription used hexameric random primers (Amersham Pharmacia Biotech). 2.5 μ g of total RNA, and 500 ng of random primers in a total volume of 29 μ l. This was incubated at 65°C for 5 minutes and then cooled slowly to room temperature. The reactions were heated at 37°C before the addition of 10 μ l of First Strand buffer (Life Technologies Inc.), 2.5 μ l 0.1 M dithiothreitol, 2.5 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l of RNase inhibitor, and 2.5 μ l

7

of M-MuLv reverse transcriptase (200 IU/ml) (Life Technologies Inc.). The reactions were incubated for 50 minutes at 37°C, then at 95°C for 5 minutes. Amplification of collagen transcripts was performed using 2 μ l of reverse transcriptase reaction per 20 μ l of PCR reaction with 500 nM of the appropriate sense and antisense primers:-

Collagen 1(I): sense +2012 5'-TGG TGA ACG TGG TGT ACA AGG T

Antisense +2784 5'-AGC ACC AGG AGA TCC TTT CTC A

Collagen 1(III): sense +3035 5'-CAG GTA TCA AGG GTG AAA GTG G Antisense +3730 5'-AGA CTT TTC ACC TCC AAC TCC A

Collagen 2(V): sense +3160 5'-AGA AGG TCC GGC TGG TAA TGA T Antisense +3780 5'-TGT TTG TGT CAT CTG GAG CTG C

The reaction conditions were as follows: 60 mM Tris/HCl pH8.8, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs and 1 IU of *Taq* polymerase (AGS Gmbh, Heidelberg, Germany) per reaction. Cycling was performed using a thermocycler (PE-9600, Applied Biosystems) starting with a 3 minute denaturation step at 94°C, followed by 28 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 55°C and 90 seconds at 72°C, and a final extension step at 72°C for 7 minutes. Quantification of final PCRs products from 1% agarose gels pictures used the NIH Image software (Scion Image, USA). Relative RNA concentrations were quantified using the housekeeping gene, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) which was amplified using the sense 5'-GAG TAT GTC GTG GAG TCT AC and antisense 5'-TGA GCT TCC CGT TCA GCT CT primers (amplicon size 408 bp) and 23 cycles to remain in a linear range.

RESULTS

Expression Cloning of cDNAs encoding F1C3-antigen yields three fibrillar collagens.

Previously, peptide sequence information was obtained from F1C3 antigen purified over an F1C3 affinity chromatography column. All of the resulting sequences contained the typical triplet peptide repeats, Glycine-X-Y (where the residues X and Y are often Proline or Hydroxyproline), that are characteristic of fibrillar collagens. However, due to the extensive homology found in these collagen domains, it was not possible to conclusively identify the F1C3 antigen from the sequences. Instead, as an alternative approach to the identification of the F1C3 antigen, it was decided to screen a post-natal rat brain cDNA expression library using the F1C3 mAb. A total of 5 x 10^5 UniZap phage were screened and this yielded 5 F1C3-positive clones. Each of these phage clones was purified to homogeneity, and the cDNA insert sequence subsequently obtained.

All five clones were found to correspond to monomers from three types of known fibrillar collagen: the alpha-1 from type I, the alpha-1 from type III, and the alpha-2 from type V (Table 1). All of the clones cover the 3' of the open reading frame and include the stop codon and part of the 3'-untranslated region (3'-UTR)(Figure 1). The three clones for alphaI(III) overlap. No other clones were detected by this screening procedure suggesting that the vast majority of the cDNAs coding for proteins containing the F1C3 epitope are indeed fibrillar collagens, although there may be some clones represented at very low levels in the cDNA library, or in which the epitope is in the less-represented 5'-region of the open reading frame. Hence, it appears that the epitope recognised by F1C3 is present on more than one type of fibrillar collagen. As such, it is possible that the F1C3 antigen expressed by astrocytes in vitro corresponds to more than one type of collagen, and this may account for the number of protein bands observed (principally at 140, 160 and 230kD).

Identification of the F1C3 epitope.

Since it appears that the epitope recognised by the F1C3 mAb is present on more than one type of collagen, it was decided to further characterise it in order to assess the possibility that other proteins may also be recognised by the antibody.

The smallest F1C3-positive clone obtained from the screening of the brain cDNAexpression library, p6 (1777 bp; 495 aa), was subcloned into a pGEX plasmid, to generate an in-frame GST-fusion protein. It was established that this recombinant protein was still recognised by F1C3 on Western blot, and subsequently, the insert cDNA in the plasmid construct was further reduced in size by sub-cloning smaller PCR fragments of the sequence. In this way, an additional four truncated GST fusion protein constructs were generated, each of which contained smaller and smaller regions of the collagen alpha I(III) sequence (Figure 2a). On Western blot, the L, M, and S proteins continued to be recognised by F1C3 whereas the XS construct was not (Figure 2b). Hence, the S protein containing a 70 residue region is still F1C3-positive, while the further removal of 24 amino acid residues in the XS protein resulted in the complete loss of recognised by F1C3 is associated with this region of 24 amino acids.

A comparison of this peptide sequence with all of the positive cDNA clones obtained suggests that the epitope is restricted even further to the sequence: GPPGPVG. Comparing this sequence to the protein databases indicates that, in rat, it is only present in the three fibrillar collagens which have been cloned and in alpha-4 of type V. However, in the mouse, for which more sequence data exists, this sequence is also found on collagen alpha-1 of type II, alpha-1 of type VIII, and alpha-2 of typeXI (Table 2). Hence given the close homology of rat and mouse sequences it is possible that these collagens may also be recognised in the rat.

Confirmation of fibrillar collagen expression by astrocytes.

The astrocytic expression of specific types of fibrillar collagen was also confirmed by RT-PCR analysis of RNA prepared from primary cultures of astrocytes. Employing appropriate oligonucleotide primers (Figure 1), it was possible to amplify PCR products corresponding to all three of the collagens identified as F1C3-positive by cDNA expression cloning, namely alpha-1(I), alpha-1(III), and alpha-2(V) (Control lane in Figure 7). The relative number of PCR cycles necessary to amplify the respective PCR fragments suggest that the collagen transcripts are expressed in the order: alpha-2(V)>alpha-1(I)>alpha-1(III).

Astrocytes in culture can not build collagen fibers

Although there was confirmation of the expression of fibrillar collagens by astrocytes in vitro, the biophysical implications of this expression remained to be clarified.

In general, the component alpha-chains of the fibrillar collagens are synthesised as large precursor procollagens, with globular domains flanking the helical domain. After secretion, these globular domains are proteolytically cleaved to produce collagen consisting of the triple helix and short non-helical flanking sequences. The most commonly occurring collagens, types I, II, and III, form fibrils in which adjacent molecules are staggered with respect to each other and stabilised by covalent intermolecular crosslinks, forming large insoluble fibers (Linsenmayer, 1991; J F Bateman, 1996). Immunocytochemical analysis of astrocyte cultures with the mAb F1C3 reveals a clear intracellular staining pattern that extends into the cell processes, but a distinct extracellular staining pattern was not observed (Figure 3 B, C). Neverthelss, further analysis by Western blot of the proteins secreted into the cell-conditioned medium clearly shows that there is a strong secretion of F1C3-positive collagen by the astrocytes (Figure 3 A). This secreted F1C3 protein is readily digested by the protease, collagenase I, but it is resistant to digestion by the protease, pepsin. The triple helices of fibrillar collagens are characterised by their resistance to the proteolytic activity of pepsin. Hence, the digestion with pepsin of the astrocyte-conditioned medium results in a reduction in the size of the F1C3 antigen corresponding to the proteolytic cleavage of non-collagen domains flanking the triple helical region. The subsequent separation of the remaining protein by denaturing SDS-PAGE leads to a denaturation of the triple helix into its three monomeric chains, which are visualised on the Western blot shown in Figure 3A lane e) as bands around 110 and 120 kD. Hence, it appears that the F1C3 antigen is present in the conditioned medium in the form of pepsin-resistant collagen triple helices but that, despite the secretion of this fibrillar collagen in a triple helical state, no fibrous macromolecular collagen deposits could be observed in the extracellular space.

A possible explanation for the differences in the recognition of secreted collagen by mAb F1C3 in immunocytochemistry and on Western blots might be that the F1C3 collagen epitope is relatively inaccessible to the antibody in the mature polymeric collagen fibers. For the Western blots, the collagen is denatured to a monomeric state prior to the SDS-PAGE and hence the F1C3 epitope is freely accessible. In order to test this possibility it was decided to observe the extracellular staining pattern for F1C3 in cultures of another cell type known to produce fibrillar collagen matrices. The basement membrane of the meninges enveloping the CNS is rich in collagen fibrils. Hence, primary cultures of cells from the meninges were established and the expression of F1C3 antigen investigated by immunocytochemistry. An extensive fibrillar collagen matrix was observed associated with the meningeal cells (Figure 4 A). Thus, it appears that F1C3 can interact with its epitope in mature collagen fibers, and consequently the lack of an extracellular signal in astrocytic cultures would appear to reflect the absence of a collagen matrix. Astrocytes lay down an ECM on the surface of culture dishes and closer examination of this ECM shows that there is in fact a weak F1C3 signal but that this is punctate in appearance rather than fibrillar (Figure 4 C, D).

Therefore, although astrocytes secrete fibrillar collagen, the collagen cannot form the kind of large fiber networks observed in meningeal cultures. The most likely explanation for the difference observed between astrocytes and meningeal cells would seem to be that there is an absence of an enzyme or other co-factor from astrocytic cultures that is necessary for fiber formation. For example, another glycoprotein known to be associated with such collagen matrices is fibronectin (FN). Immunostaining of meningeal cultures for FN shows that there is a strong colocalisation with the F1C3 signal (Figure 4 B), indicating that there is a close association of fibers of collagen and FN in this matrix. The astrocytes in culture do not express FN (data not shown), and it has been shown elsewhere that FN null mice have severe deficiencies in their capacity to form collagen fibers. In addition, cultured fibroblasts from FN null mice could not form collagen fibers, but it was possible to rescue this phenotype by the addition of exogenous fibronectin to the culture medium (Velling et al., 2002). Nevertheless, the addition of purified fibronectin to the astrocytic culture medium did not result in any apparent formation of F1C3 fibers.

The absence of an efficient processing of the procollagen was also considered. After secretion, the helical collagen domains are modified by lysil oxidase which converts lysine and hydrolysine to their aldehydic forms, leading to the formation of covalent bonds between adjacent triple helices and the subsequent formation of collagen fibers. Vitamin C (ascorbic acid) is an essential cofactor of lysil oxidase, and the presence of Vitamin C is a limiting condition for the correct formation of collagen fibers. Nevertheless, supplementing the astrocytic culture medium with Vitamin C did not result in any visible change in the F1C3 staining pattern. And neither did a combined addition of Vitamin C and FN to the culture medium.

Hence, in conclusion, it seems that although astrocytes in vitro can express fibrillar collagens, and secrete triple helices, they are unable to form large collagen fibers under culture conditions in which meningeal cells can form extensive collagen matrices. Although this inability might be due to the absence of certain appropriate enzymes and co-factors, their identity remains to be elucidated.

Fibrillar collagen in vivo: no astrocytic expression evident.

Our observation of an expression of fibrillar collagen by astrocytes in culture raises questions about a possible expression in vivo. In order to investigate the nature of any in vivo expression of F1C3-positive collagen in the CNS, we performed immunohistochemical studies of rat brain at different stages (P0, P7, P20 and adult) with the antibody F1C3. A range of different histological methods were tested, including alternative fixation and detection protocols. However, none of these techniques permitted us to detect any signal for F1C3-positive collagen within the CNS tissue, even though in the same tissue sections a clear staining pattern could be obtained that was associated with the pia mater and the meninges (data not shown).

However, based upon our above observation that there is an absence of fiber formation in astrocytic cultures, it is possible that, although astrocytes may actually be secreting collagen protein into the extracellular space of the CNS during development, the presence of this collagen may be difficult to detect if the astrocytes and the ECM of the CNS are not condusive to the formation of the larger polymeric collagen fibers found elsewhere.

Alternatively, an astrocytic collagen expression might only be occurring in boundary situations where the glial cells are contributing to the formation of basement membranes that serve to segregate the CNS from non-neural tissue, for example, at the pia mater.

Laminin is another ECM protein which is a major component of basement membranes. It can also be expressed by astrocytes in culture but is not expressed at high levels in the CNS. However, it has been shown that astrocytic laminin expression can be enhanced by endothelial cells which generate the basal lamina around blood vessels , and consequently, it has been suggested that astrocytes may be in fact be contributing to the building of this basal lamina in vivo.

Similarly, it might be envisaged that astrocytes could express collagen in a localised manner through their endfeet, and hence deposit it at the site of the basement membrane beneath the meningeal cells. In this situation, the collagen protein expressed by astrocytes would be difficult to distinguish from the collagen expressed by meningeal cells. Since such a localisation of protein expression would not permit us to determine the cellular origin of the collagen present in the basement membrane, an in situ hybridization study of collagen expression in the postnatal rat brain was performed. This developmental stage was chosen because astrogenesis and the establishment of the pia mater occur at this time (Bigio, 2002). Neonatal (P0) and P7 rat brains were analysed using riboprobes against the three cloned F1C3-positive collagens: alpha-1(I), alpha-1(III), and alpha 2(V)(Figure 1). In accordance with previous studies, a strong expression of collagen type I, and type III could be seen in the meningeal cells surrounding the CNS at both ages (Figure 5). The expression of collagen type V was lower and could be detected only at P7 in the meninges (data not shown). However, in none of these experiments could we observe any collagen expression by astrocytes. In this respect, the observation of the cerebellum is of particular interest, because the cell bodies of astrocytes are localised in the Purkinje cell layer, and they extend their Bergmann fiber processes out to the pia mater. Thus, if the astrocytes were contributing to the formation of the basement membrane in the pia, an expression of collagen should be detected as a positive staining in the Purkinje cell layer. In our experiments, such an expression was never observed, allowing us to rule out the possibility that astrocytes express collagen in vivo. Positive cells for collagen type I and type III could sometimes be seen within the tissue, but this did not colocalize with GFAP astrocytic markers, and probably corresponded to endothelial cells associated with forming blood vessels. Thus, neither by immunohistochemical nor by in situ hybridization studies were any signs of collagen expression by astrocytes within the CNS detected.

Despite these negative results, it cannot be excluded that there may be stages and locations in the CNS where in vivo expression occurs. However, it is unlikely to be a robust expression, since previous reports, including studies of embryonic stages, have also been negative (Niederreither et al., 1995). Nevertheless, if astrocytes in vitro readily express fibrillar collagen, but no such expression is observed in vivo, it suggests that either there is an activation of the collagen expression in vitro or that there is an inhibition occurring in the CNS in vivo.

Meningeal cells inhibit collagen expression by astrocytes

Since the collagen that we observe in brain sections is localised in the basement membranes of the meninges and the blood vessels, we reasoned that if there were an astrocytic collagen expression, it might be associated with these sites. It has already been shown that meningeal cells can regulate the astrocytic expression of other extracellular proteins, and thus, the apparent absence of astrocytic collagen expression in vivo might conceivably be due to interactions with these cells.

To observe the putative effects of meningeal cells on the collagen expression by astrocytes, we generated cocultures of primary astrocytes and meningeal cells from P0 rat hemispheres. Using GFAP as a marker of astrocytes and fibronectin as a marker for meningeal cells, we could observe that under these conditions, the two cell types do not mix but rather form adjacent monolayers. By immunocytochemistry with the F1C3 antibody, we observed that although meningeal cells express collagen, very little astrocytic expression is observed compared to that found in pure astrocyte cultures (Figure 6). Indeed, a reduction of greater than 50% was observed in the proportion of astrocytes expressing collagen when they were cultivated in the presence of meningeal cells. This was in stark contrast to co-culturing of astrocytes with other cell types (oligodendrocyte precursors or endothelial cells) which did not reveal any significant effects on collagen expression (data not shown).

Hence, the presence of meningeal cells seems to result in a strong downregulation of the astrocytic collagen expression. In order to determine if this effect is due to a factor secreted by the meningeal cells, we performed coculture studies using the millicell system, which allowed us to cocultivate primary astrocytes and meningeal cells in a shared common medium while avoiding any direct cellular contact between the two cell types. Under these conditions, we could observe that, after 24 hours and 4 days of coculture, the percentage of astrocytes expressing collagen was significantly reduced in comparison to cultures of pure astrocytes. To test if such an inhibition was due to a general downregulation of ECM molecules, we performed ELISA assays to compare expression levels of tenascin-C (TN-C), a glycoprotein which is widely expressed and secreted by astrocytes in the extracellular matrix of the CNS. Although levels of collagen protein expression were significantly decreased in meningeal coculture compared to pure astrocytic culture, no difference could be detected for the expression of the TN-C.

From these experiments, we could conclude that a soluble factor was influencing the astrocytic expression of collagen. However, it is not clear whether this soluble factor is secreted by meningeal cells or, alternatively, whether it is a factor of astrocytic origin which is being removed from the culture medium by the meningeal cells. Since the coculture experiments were compared to mono-cultures of each cell type in the same medium, it seems unlikely that the soluble factor was in the starting medium, but rather, that it was secreted either by the meningeal cells or the astrocytes. Hence, if meningeal in origin, it would be inhibiting the expression of collagen by the astrocytes, whereas if it was produced by the astrocytes it would be favouring collagen expression (by an autocrine mechanism) and its removal by the meningeal cells would lower the concentration in the medium and hence reduce the stimulation. If an astrocytic factor, we might expect it to increase in concentration in the culture medium over time and hence to be accompanied by an increase in collagen expression.

EGF downregulates the expression of collagen by astrocytes

In order to determine which soluble factor might be responsible for the inhibition we observed, we treated cultures of primary astrocytes with a range of purified cytokines for 48 hours. We then evaluated the effects of the cytokines on the expression of the fibrillar collagens, alpha-1(I), -1(III), and 2(V), by RT-PCR analysis of total RNA prepared from the cytokine-treated astrocytes (Figure 7). According to studies performed on other cell types, TGFbeta should be a potent upregulator (Ignotz et al., 1987), while TNFalpha and INFgamma should be inhibitors of collagen expression (Scharffetter et al., 1989; Varga et al., 1990), and our observations of astrocytes treated with these cytokines confirms this. In addition, of the nine other cytokines tested (EGF, FGF-2, CNTF, VEGF, PDGF, HGF, IL1, IL6), we could observe that EGF treatment resulted in a significant decrease in the expression levels of all three collagen transcripts (Figure 7).

Thus, the cytokines, INFgamma, TNFalpha and EGF can inhibit collagen expression by astrocytes. However, since INFgamma and TNFalpha are inflammatory cytokines it is unlikely that they are acting in a widespread fashion during development. INFgamma is not expressed by meningeal cells and it is only expressed by astrocytes with $TNF\alpha$ after induced activation corresponding to inflammatory states in the CNS.

On the other hand, EGF is a cytokine widely expressed in vivo and astrocytes have been shown to express the EGF receptor (EGF-R) (Kornblum et al., 1998). Hence, we reasoned that of the cytokines tested, EGF was the most promising factor to test in further detail.

The effect of EGF on collagen protein expression by astrocytes was assessed using immunocytochemistry with the F1C3 antibody and by counting the proportion of collagenexpressing to non-expressing astrocytes. After 48 hours EGF treatment, a significant decrease in the percentage of astrocytes producing collagens was observed (Figure 8 A). In addition, with EGF treatment, a change in the cell morphology of the astrocytes is observed, although the decrease in collagen expression did not appear to be directly associated with such cytoskeletal changes since collagen-expressing astrocytes exhibiting a strong change in morphology were also observed. It is also interesting to note that although EGF downregulates collagen expression in astrocytes, it has been shown to upregulate the astrocytic expression of two other ECM proteins, namely TN-C and phosphacan (Dobbertin A, Garwood , unpublished observation).

Inhibition of EGF-R results in strong upregulation of collagen expression by astrocytes.

The treatment of astrocyte cultures with EGF results in a downregulation of the expression of fibrillar collagen. Since EGF expression has been demonstrated by astrocytes both in culture and in vivo, it is possible that astrocytes may be downregulating their own expression of collagen through an autocrine mechanism. To test this hypothesis, we treated astrocytic cultures with AG99, a tyrphostin inhibitor of the EGF receptor (EGF-R) in order to inhibit any cellular events downstream following ligand-activation of this receptor.

In the presence of AG99, the proportion of collagen-positive astrocytes was considerably higher than the controls. At 50μ M, a concentration of AG99 corresponding to 5 times the IC50 (defined as the concentration of the drug required to inhibit the receptor activity by 50%), the increase observed was 5-fold (Figure 8 B).

Thus, it seems that, as predicted, the inhibition of EGF-R activity in astrocytes results in a strong upregulation in collagen expression. In the absence of exogenous EGF, the implication of this result is that the astrocytes themselves are the source of the ligand for the EGF-R. Consequently, it appears that the astrocytes on their own can indeed downregulate their expression of fibrillar collagen through an autocrine mechanism involving the EGF receptor.

Based on this result, it was decided to reexamine the meningeal-astrocyte cocultures in order to determine whether the reduction in astrocytic collagen expression in these cultures was also associated with the EGF-R signaling pathway. Thus, the effects on astrocytic collagen expression in the presence of meningeal cells and of the EGF-R inhibitor, AG99, were tested side-by-side. As shown in Figure 9, the strong inhibition observed with meningeal CM (obtained by millicell co-culturing) was reversed by the EGF-R inhibitor. However, this reversal did not result in as strong an upregulation of astrocytic collagen expression as was obtained by the application of AG99 alone. Hence, whereas the EGF-R inhibitor treatment very strongly upregulates collagen expression in astrocytes, apparently by blocking the effects of an autocrine mechanism that passes via the EGF-R signaling pathway, the inhibitory effects of meningeal CM are still present, indicating that an additional soluble factor is present in meningeal CM which exerts its inhibitory effects via an astrocytic receptor that is different to the EGF-R.

DISCUSSION

The ECM of the CNS is devoid of fibrillar elements. In a former study, we have shown that primary astrocytes express collagen proteins recognized by the antibody F1C3. Here, we showed that F1C3 specifically recognized the collagens of type I, III and V. We confirm the expression of fibrillar collagens by astrocytes in vitro and show that they secrete triple helices of collagens, but that they are unable to form fibers. Nevertheless, we find no evidence for collagen expression by astrocytes in vivo. A possible explanation for this contradiction is suggested by our observation that there are at least two mechanisms which could be acting to inhibit collagen expression by astrocytes in vivo. In co-culture assays, we demonstrate a strong inhibitory effect by meningeal cells on astrocytic collagen expression. In addition, we have identified EGF-R ligands as downregulating factors which act via an autocrine loop on astrocytes.

Astrocytes can express collagen but are unable to form a fibrillar matrix

The expression of fibrillar collagen by astrocytes in culture was clearly demonstrated in our previous study. Here, we have further characterised this expression and have shown that astrocytes in culture express collagens of type I, III and V. However, although these collagens are secreted into the extracellular space, no fibers of collagen could be detected in the ECM laid down by astrocytes in culture, even when the medium was supplemented with Vitamin C, a co-factor essential in the enzymatic processing of collagen fibrils.

By comparison, cultures of meningeal cells produce extensive fibrillar collagen networks. Although it seems likely that the inability of astrocytes to form collagen fibers is due to the absence of some factor or factors necessary for fibrillogenesis, these remain to be identified.

The fact that astrocytes can express fibrillar collagens, but cannot form macromolecular collagen fibers might explain why such an expression has been neglected for so long since only matrix deposits in the vicinity of the cell membrane or on solid surfaces can be visualised when using detection techniques such as particle exclusion assays (Maleski and Hockfield, 1997).

Collagen expression in the developing CNS.

We could observe an expression of collagens of type I and III by the meningeal cells which form the reticular lamina of the pia. This is in accordance with previous studies which have shown that the pia is the site of extensive collagen I and III expression (Shellswell et al., 1979; Azzi et al., 1989). Collagen of type I can occur as a homotrimer of alpha1 chains or as a heterotrimer composed of alpha1 and alpha2 chains, although it seems probable that it occurs in the homotrimeric form since the alpha2 chain appears to be absent from the CNS. Other collagens are known to be expressed in the brain, especially collagen IV, which is the main protein of the basal lamina with laminin around blood vessels and beneath the pia (Weidner et al., 1999; Urabe et al., 2002). Fibrils of type I and III collagen are found above the basal lamina lining the pia. The production of these collagens and of the basal lamina is clearly meningeal in origin. However, a putative contribution by astrocytes to the production of the basal lamina has been proposed in other studies. Thus, it has been shown that astrocytes in culture can produce laminin, but not collagen IV, and in vivo, an expression of these molecules appears to be glial in origin only in the case of penetrant lesions of the CNS leading to the formation of a glial scar (Liesi et al., 1983, 1984; Liesi and Kauppila, 2002).

Immunohistochemistry with an antibody against collagen VIII has shown an expression in the white matter of the spinal cord of the bovine embryo (Kapoor et al., 1988), but using this antibody we could not detect any expression by astrocytes in culture (not shown). In addition, in situ hybridization experiments on rodents have revealed a meningeal expression of collagen VIII (Muragaki et al., 1992).

Collagen II is expressed in the neuroepithelium during early embryogenesis, but disappears subsequently (Cheah et al., 1991). Only collagen XIII has clearly been shown to have a role in the CNS, since this transmembrane collagen is expressed by neurons and could be implied in the regulation of axon growth (Snellman et al., 2000; Sund et al., 2001).

Regulation of Astrocytic Collagen Expression by Cytokines.

We have looked at a range of growth factors and cytokines which might be implicated in the regulation of collagen expression by astrocytes. In vivo, the apparent absence of astrocytic collagen expression is in striking contrast to the expression by astrocytes in culture and this tends to suggest that, either there is a strong repression of this expression in vivo or, alternatively, that there is an activation in vitro.

Screening for the effects of cytokine treatment on astrocytes in vitro has allowed us to demonstrate that EGF can strongly inhibit collagen expression. Furthermore, we provide evidence that there is an inhibitory mechanism acting on the EGF-R through an autocrine loop to inhibit the in vitro expression of collagen by astrocytes.

In our previous study, we found that 30% of astrocytes in culture show intracellular staining for collagen. This observation can now be explained in the light of the existence of an EGF-dependent autocrine mechanism which downregulates this collagen expression in astrocytes.

In vivo, astrocytes have also been shown to express the EGF-R (Kornblum et al., 1998). There are two natural ligands of EGF-R, EGF and TGF α . In vivo, TGF α is expressed at higher levels than EGF and its peak of expression occurs during the first week postnatal (Seroogy et al., 1993). EGF-R is apparently the only astrocytic receptor for TGF α since astrocytes from EGF-R null mice do not respond to TGF α (Kornblum et al., 1998), and its effects on astrocytes are similar to those described for EGF. Hence, it is possible that TGF α may also be involved in the autocrine inhibition of astrocytic collagen expression in vivo.

Regulation of Astrocytic Collagen Expression by Meningeal Cells.

Our results show that meningeal cells secrete a soluble factor which acts on astrocytes to provoke the inhibition of the expression of collagens.

In vivo, meningeal cells are located along the glia limitans which delimits the CNS and is formed by the association of very large numbers of astrocytes and thin astrocytic processes. Consequently, an inhibition of astrocytic collagen expression mediated by meningeal cells may play an important role in the maintenance of the glia limitans in vivo. The identity of the inhibitory factor secreted by the meningeal cells remains to be determined. Hence, it is not yet possible to assess the extent to which this factor could diffuse into the deeper regions of the brain. In addition, many astrocytes are linked by gap junctions and consequently, a transmission of the inhibitory effect could conceivably be spread to astrocytes located deeper in the brain. Another important consideration is that this

soluble factor might be present in the cerebrospinal fluid, and that, as such, it could diffuse into the deepest regions of the brain via its irrigation of the ventricles.

Astrocytes and the ECM of the developing CNS.

Our results describe phenomena which occur during the postnatal period. During the two first postnatal weeks, astrocytes proliferate and migrate, GFAP expression beginning at P0 and reaching a maximum at P14 (Lemenkühler). The peak of expression of almost all of the proteins of the ECM in the CNS, many of which are produced by astrocytes, occurs during this period (J Garwood, 2002). At these stages, there is also a peak in the expression of EGF and TGF α both of which could be acting on astrocytes to maintain an inhibition of collagen expression.

The establishment of the basement membrane also occurs during the postnatal period. It begins at the 19th embryonic day, and the basement membrane is mature at P21. The glia limitans is formed by astrocytes along this basement membrane, with the presence of astrocytic processes linked by gap junctions in the early postnatal period (Bigio, 2002). The results of our study demonstrate that there is a tight regulation of the astrocytic expression of the fibrillar collagens, type I, III, and V. At least two inhibitory mechanisms exist to control this expression, one of which can passes via the EGF-R and can be autocrine, the other is also mediated by a soluble factor associated with meningeal cells. In vivo, the widespread efficiency of this inhibition is evident since there is no apparent expression of collagens by astrocytes. However, the functional significance of this inhibition is less evident.

One of the unique characteristics of the ECM of the CNS is considered to be the relative absence of fibrous collagen. We have now shown that astrocytes are capable of expressing fibrillar collagen but that, in isolation, the astrocytes cannot generate macromolecular collagen fibres under conditions in which meningeal cells readily produce extensive fibrillar networks.

In situ hybridisation analyses suggest that if astrocytes are producing collagens in vivo, it is at levels that are well below those found in meningeal cells and endothelial cells. Similarly immunohistochemistry would tend to indicate either that any collagen expression is at very low levels or that the very nature of the fibrillar collagen by astrocytes produced is hard to detect.

It is not clear why astrocytes cannot produce macromolecular collagen fibres in vitro and similarly, if astrocytes secreted fibrillar collagens in vivo, it is not clear whether this protein could be assembled into the fibres so characteristic of the fibrillar collagens elsewhere in the body.

An expression of fibrillar collagens by astrocytes might be envisaged in the context of a minority contribution to the formation and maintenance of the basal lamina of the blood vessels and the meninges. Such a role might be of added significance in the context of lesions and pathologies in which glial scars are formed and extensive remodelling of the basement membranes can occur. Further studies of these issues will seek to clarify this intriguing phenomenon which may underpin fundamental aspects of the unique properties of the extracellular environment of the CNS relative to the other body tissues.

- Azzi G, Jouis V, Godeau G, Groult N, Robert AM (1989) Immunolocalisation of extracellular matrix macromolecules in the rat spinal cord. Matrix 9:479-485.
- Bigio MRD (2002) Glial linings of the brain. In: The neural environement (Walz W, ed). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Cheah KS, Lau ET, Au PK, Tam PP (1991) Expression of the mouse alpha 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. Development 111:945-953.
- Heck N, Garwood J, Schutte K, Fawcett J, Faissner A (2003) Astrocytes in culture express fibrillar collagen. Glia 41:382-392.
- Hockfield SSCaS (1996) Central Nervous System. In: Extracellular matrix (Comper WD, ed). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Ignotz RA, Endo T, Massague J (1987) Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. J Biol Chem 262:6443-6446.
- J F Bateman SRLaJAMR (1996) Collagen superfamily. In: Extracellular matrix (Comper WD, ed). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- J Garwood NH, F Rigato and A Faissner (2002) The extracellular matrix in neural development, plasticity and repair. In: The neural microenvironment (Walz W, ed). Totowa, New-Jersey: Humana Press.
- Kapoor R, Sakai LY, Funk S, Roux E, Bornstein P, Sage EH (1988) Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices. J Cell Biol 107:721-730.
- Kornblum HI, Hussain R, Wiesen J, Miettinen P, Zurcher SD, Chow K, Derynck R, Werb Z (1998) Abnormal astrocyte development and neuronal death in mice lacking the epidermal growth factor receptor. J Neurosci Res 53:697-717.
- Liesi P, Kauppila T (2002) Induction of type IV collagen and other basement-membraneassociated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar. Exp Neurol 173:31-45.
- Liesi P, Dahl D, Vaheri A (1983) Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. J Cell Biol 96:920-924.
- Liesi P, Dahl D, Vaheri A (1984) Neurons cultured from developing rat brain attach and spread preferentially to laminin. J Neurosci Res 11:241-251.
- Linsenmayer TF (1991) Collagen. In: Cell biology of the extracellular matrix (Hay ED, ed). New York: Plenum Press.
- Maleski M, Hockfield S (1997) Glial cells assemble hyaluronan-based pericellular matrices in vitro. Glia 20:193-202.
- Muragaki Y, Shiota C, Inoue M, Ooshima A, Olsen BR, Ninomiya Y (1992) alpha 1(VIII)collagen gene transcripts encode a short-chain collagen polypeptide and are expressed by various epithelial, endothelial and mesenchymal cells in newborn mouse tissues. Eur J Biochem 207:895-902.
- Niederreither K, D'Souza R, Metsaranta M, Eberspaecher H, Toman PD, Vuorio E, De Crombrugghe B (1995) Coordinate patterns of expression of type I and III collagens during mouse development. Matrix Biol 14:705-713.
- Pearlman AL, Sheppard AM (1996) Extracellular matrix in early cortical development. Prog Brain Res 108:117-134.
- Scharffetter K, Heckmann M, Hatamochi A, Mauch C, Stein B, Riethmuller G, Ziegler-Heitbrock HW, Krieg T (1989) Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha and

interferon-gamma on collagen synthesis of human skin fibroblasts in vitro. Exp Cell Res 181:409-419.

- Seroogy KB, Lundgren KH, Lee DC, Guthrie KM, Gall CM (1993) Cellular localization of transforming growth factor-alpha mRNA in rat forebrain. J Neurochem 60:1777-1782.
- Shellswell GB, Restall DJ, Duance VC, Bailey AJ (1979) Identification and differential distribution of collagen types in the central and peripheral nervous systems. FEBS Lett 106:305-308.
- Snellman A, Keranen MR, Hagg PO, Lamberg A, Hiltunen JK, Kivirikko KI, Pihlajaniemi T (2000) Type XIII collagen forms homotrimers with three triple helical collagenous domains and its association into disulfide-bonded trimers is enhanced by prolyl 4-hydroxylase. J Biol Chem 275:8936-8944.
- Sund M, Vaisanen T, Kaukinen S, Ilves M, Tu H, Autio-Harmainen H, Rauvala H, Pihlajaniemi T (2001) Distinct expression of type XIII collagen in neuronal structures and other tissues during mouse development. Matrix Biol 20:215-231.
- Urabe N, Naito I, Saito K, Yonezawa T, Sado Y, Yoshioka H, Kusachi S, Tsuji T, Ohtsuka A, Taguchi T, Murakami T, Ninomiya Y (2002) Basement membrane type IV collagen molecules in the choroid plexus, pia mater and capillaries in the mouse brain. Arch Histol Cytol 65:133-143.
- Varga J, Olsen A, Herhal J, Constantine G, Rosenbloom J, Jimenez SA (1990) Interferongamma reverses the stimulation of collagen but not fibronectin gene expression by transforming growth factor-beta in normal human fibroblasts. Eur J Clin Invest 20:487-493.
- Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S (2002) Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. J Biol Chem 277:37377-37381.
- Weidner N, Grill RJ, Tuszynski MH (1999) Elimination of basal lamina and the collagen "scar" after spinal cord injury fails to augment corticospinal tract regeneration. Exp Neurol 160:40-50.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Antibody expression cloning of rat brain cDNA with F1C3 monoclonal antibody yields clones for fibrillar collagens.

The size and alignments of the positive cDNA clones obtained by screening a cDNA expression library with F1C3 (black lines) are shown relative to the database entries for the corresponding full-length cDNAs (open boxes). The scale at the top is in DNA base pairs, +1 corresponds to the start of the cDNA entry. The clones are orientated 5' to 3' left to right. 3'-utr: the 3'- untranslated region following the pen reading frame. The boxes containing the arrows above the respective cDNA sequences represent the PCR products used to generate the riboprobes for in situ hybridisation analyses. More complete details of the plasmid clones and the collagen cDNA database entries are given in Table 1.

Figure 2. Mapping of the Epitope recognised by the Monoclonal antibody F1C3.

- a) A range of recombinant GST protein constructs containing the indicated regions of the collagen a1(III) were generated by cloning of the appropriate PCR products into the plasmid, pGEX-4T-2. The positions relative to the full-length collagen 1(III) are shown on the scale at the bottom. The size of the collagen protein in each construct is indicated in amino acid residues (aa). The box shows the peptide sequence of the region present in the S protein whose absence in the XS protein leads to a loss of reactivity with the F1C3 monoclonal antibody.
- b) Western blot analysis using the F1C3 mAb of the GST recombinant protein constructs described in a). The constructs XL, L, M, and S are recognised by the antibody, while the XS protein and the GST protein alone are not recognised by F1C3.

Figure 3. Astrocytes express and secrete triple helices of fibrillar collagens in culture

A: Western blot analysis of fibrillar collagen secreted into the medium of P0 primary astrocytes culture of newborn rats. Two bands at 140 and 200kD are recognized, upper bands correspond to triple helices covalently linked. After treatment with collagenase, all bands are cleaved (lane c). After pepsin digestion, two bands at 110 and 120kD corresponding to the monomers from pepsin-resistant triple helices are recognized (lane e). After treatment with pepsin followed by collagenase, these two bands are cleaved, confirming that they correspond to triple helices of fibrillar collagen (lane g).

Lane a: no treatment ; lane b: buffer control (no collagenase) ; lane c: collagenase digestion ; lane d: buffer control (no pepsin) ; lane e: pepsin digestion ; lane f: buffer control (no enzyme) ; lane g: pepsin digestion followed by collagenase digestion.

B, **C** : Astrocytes in culture express fibrillar collagen. Double immunostaining of primary astrocytes from neonatal rats. A colocalization of the astrocytic marker GFAP revealed with cy2-secondary antibody (green) and the F1C3 antigen revealed with cy3-secondary antibody (red) is observed.

Figure 4. Astrocytes cannot build macromolecular collagens fibers

A : F1C3 antibody recognizes fibrillar collagens when they are conformed into macromolecular fibers. Immunostaining without permeabilization of meningeal cell culture.

B : Meningeal cells form fibers of fibronectin as seen in immunostaining without permeabilization.

C, D: Astrocytes do not form fibers of collagen. Immunostaining without permeabilization using the F1C3 antibody on primary astrocytes in medium supplemented with Vitamin C and purified fibronectin reveals a punctate signal on top of the monolayer of astrocytes.

Figure 5. Astrocytes do not express fibrillar collagens in vivo

In situ hybridization for collagen of type I (A, C, E, G) and type III (B, D, F, H) was performed on rats at postnatal days P0 (A, B, C, D) and P7 (E, F, G, H). A strong expression is seen within meningeal cells at both ages in hemispheres (A, B, E, F) and cerebellum (C, D, G, H). In A, a close-up shows the expression of collagen type I in a meningeal cell.

Figure 6. Meningeal cells inhibit the expression of collagen by astrocytes

In direct coculture :

A: Meningeal cells produce a matrix of fibronectin fibers (cy2, green), and express collagen (recognized with F1C3 antibody stained in red). The juxtaposing monolayer of astrocytes is devoid of signal for fibronectin or collagen.

B: All meningeal cells are GFAP negative and express collagen recognized by F1C3 antibody (stained in red). Astrocytes are stained with GFAP (green) but do not express collagen. *In millicell system :*

C : The percentage of astrocytes (marked positive for the astrocytic marker GFAP) expressing fibrillar collagens (revealed as an intracellular staining with the F1C3 antibody), is

significantly reduced in the presence of meningeal cells after one day ($P \le 0.05$; unpaired t test; n=2) and four days ($P \le 0.01$; unpaired t test; n=3).

D : In ELISA assay, the level of expression of fibrillar collagen estimated with the F1C3 antibody is significantly reduced in the presence of meningeal cells ($P \le 0,01$, unpaired t test). The level of expression of Tenascin-C remains the same with or without meningeal cells ($P \ge 0,05$, unpaired t test).

Figure 7. Specific cytokines downregulate the expression of fibrillar collagens by astrocytes

RT-PCR analysis of collagen expression by astrocytes after 48 hours of treatment by cytokines. GAPDH is used as a control. The expression of collagens a1(I), a1(III) and a2(V) was studied. For the three collagens an upregulation by TGF β and a downregulation by INF γ , TNF α and EGF is observed. Bands were all observed at correct molecular weight and no bands were observed in control conditions.

Figure 8. EGF downregulates the expression of collagens by astrocytes through an autocrine mechanism

The percentage of astrocytes expressing fibrillar collagens was estimated by counting the percentage of astrocytes showing intracellular staining for F1C3 antibody (red). Astrocytes were considered as cells positive for the marker GFAP (green).

A : Percentage of astrocytes expressing collagens, is significantly reduced in the presence of EGF at 10ng/ml (ANOVA, tukey's test P<=0,01, n=3) and 20ng/ml (ANOVA, tukey's test, P<=0,01, n=3). EGF was added to the medium for 48 hours.

B : Percentage of astrocytes expressing collagens, is significantly enhanced in the presence of the EGF receptor inhibitor AG99 at 50 μ M incubated for 48h in the culture (unpaired t test, P<=0,01, n=3).

Figure 9. Inhibition of astrocytic collagen expression by meningeal soluble factor is not mediated by EGF-R.

The percentage of astrocytes (GFAP positive cells) expressing collagen (F1C3 positive cells) were counted in control cultures (A), in the presence of meningeal cells (A + M) and in the presence of the inhibitor of the EGF receptor, AG99 (A + AG99). These conditions were compared to a culture of astrocytes treated with meningeal cells and AG99 (A + M + AG99).

Meningeal cells (A + M) provoke an downregulation of collagen expression, and AG99 (A + AG99) apparently blocks the autocrine inhibitory effects of EGF, leading to an upregulation of collagen expression. However, the effect of meningeal cells is not abolished by AG99 (A + M + AG99), indicating that it acts through an astrocytic receptor that is different to the EGR receptor.

Figure 1



Figure

	Collag.	en Database Entries				F1C3-p	ositive cDNA clones	
Collagen	Species	Accession nos.	Length	ATG	STOP		Length	Position
chain		(cDNA/protein)	cDNA/protein	base	base	Clone	cDNA/protein	Relative to
								Database Entry
α1(I)	Rat	Z78279/CAB01633	5721bp/1453aa	+1	4362	p1	2841bp/863aa	1771-4612
	Mouse	U08020/CA11_mouse	4589bp/1453aa	+1	4362	p1		1771-4612
α1(III)	Mouse	X52046/CA13_mouse	4766bp/1464aa	+118	4513	p24	2784bp/870aa	1903-4687
~			1			p2	2181bp/636aa	2603-4784
						p6	1777bp/495aa	3026-4803
	Rat*	X70369/RNPRO1C	2217bp/637aa*	I	1912	p24		(-698-2086)
						p2		2-(2183)
						p6		426-(2202)
α2(V)	Mouse	L02918/AAA37440	4494bp/1497aa	+1	4494	p11	2561bp/763aa	2203-4764
	Rat*	RNAJ4880/CAA12180	1473bp/470aa*	I	1412	p11		(-879-1682)
Table showir	ng a comparise	on of the database entries for rat	and mouse collagen se	seduences	that matc	thed the l	71C3-positive cDNA e	expression

clones and the size and alignments of the open reading frames for the clones. *= incomplete sequences corresponding to the 3'-end of the ORF and the 3'-UTR for rat collagens 1(III) and 2(V).

TABLE 1






Figure 2b

Collagen chain	Species	Accession Number	Position (residues in entry)
Alpha1(I)	Rat	CAB01633	885 (of 1453)
	Mouse	CA11_MOUSE	885 (of 1453)
Alpha1(III)	Rat	P13941	222 (of 636)*
	Mouse	CA13_MOUSE	1049 (of 1464)
Alpha2(V)	Rat	CAA12180	146 (of 469)*
	Mouse	AAA37440	1174 (of 1497)
Alpha4(V)	Rat	AAF76432	475 (of 1737)

Database search for proteins containing the F1C3 epitope (GPPGPVG) . *=partial sequences

TABLE 2



Figure 3



Figure 4



Figure 5



Figure 6

Ctle	INFγ	TGFβ	$TNF\alpha$	EGF	
_	I	ł		-	GAPDH
_	-				α1 Col I
					α 1 Col III
					α 2 Col V

Figure 7



Figure 8



Figure 9

LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS L'EPILEPSIE

LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS L'EPILEPSIE

Manuscrit 4

"Extracellular matrix molecules are upregulated in a murine model of temporal lobe epilepsy"

1. Epilepsie : définition générale

Le terme épilepsie vient du mot grec « epilambanein » qui signifie « assaillir » ou « saisir violemment ». Cette pathologie touche 350000 personnes en France (chiffres de la Ligue Francaise Contre l'Epilepsie). L'épilepsie est l'expression d'un fonctionnement anormal, aigu et transitoire de l'activité électrique du cerveau qui se traduit par des crises épileptiques. L'activité épileptique correspond à une hypersynchronisation de l'activité de réseaux neuronaux. Les raisons de l'apparition d'une telle activité restent mal connues, on peut schématiquement envisager soit une baisse d'activité des circuits inhibiteurs, soit une augmentation de l'activité des circuits excitateurs. L'épilepsie se définit par la répétition des crises (récurrance) pendant un certain temps de la vie d'un individu. Compte tenu des multiples formes d'expression des crises et de leur évolution, il faut considérer plusieurs types d'épilepsie. On peut distinguer deux grands types : les crises généralisées etl des crises focales. Dans les crises généralisées, on observe une activité épileptique bilatérale propagée dans les aires corticales. Dans les crises focales, on observe une activité épileptique restreinte à certaines structures cérébrales. Les crises focales associées au lobe temporal représentent près de 25% des cas d'épilepsie, l'étude de l'apparition et de l'évolution de cette pathologie est donc importante.

2. Epilepsie mésiale du lobe temporal

L'épilepsie mésiale du lobe temporal est un type d'épilepsie qui est caractérisée par des crises focales et une sclérose de la corne d'Ammon. L'observation des pièces de résection provenant de patients opérés a permis de caractériser les modifications histopathologiques

liées au syndrôme. On observe une perte cellulaire dans les régions CA1, CA3 et dans le hile (Margerison et Corsellis, 1966) et une gliose réactionnelle. Le gyrus denté présente un élargissement de la couche granulaire. Plus précisément, on observe une hypertrophie des corps cellulaires et l'augmentation du volume intercellulaire (Houser, 1990; Lurton et al., 1998). L'élargissement de la couche granulaire aboutit à la sclérose de la corne d'Ammon observée dans les hippocampes de patients en étude *postmortem*. Enfin, un bourgeonnement des fibres moussues est observé dans les couches supragranulaires. Ces modifications sont généralement unilatérales; elles ne sont bilatérales que dans 10 à 20% des cas (Guerreiro et al., 1999).

Les enregistrement électroencéphalographiques montrent que l'épilepsie du lobe temporal est de type focal. La crise est focalisée dans l'hippocampe, l'amygdale et le gyrus parahippocampique, et parfois restreinte à l'hippocampe. Dans quelques cas, une genéralisation de la crise au cortex est observée (Riban et al., 2002).

L'épilepsie mésiale du lobe temporale est pharmacorésistante. La polythérapie utilisée classiquement reste sans effet dans 30% des cas. L'approche thérapeutique adoptée est alors la résection chirurgicale de l'hippocampe qui aboutit à une suppression totale des crises dans 65% des cas (Spencer, 1996).

3. Description du modèle

De nombreux modèles animaux de l'épilepsie ont été proposé. Un modèle largement utilisé est celui de la pilocarpine. Il consiste en l'injection de pilocarpine, qui est un agoniste des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine. Un état de mal convulsif est observé chez le rat adulte suite à l'injection, avec des crises tonicocloniques. Ce modèle reproduit les crises généralisées du lobe temporal.

Cependant, le modèle pilocarpine, de même que d'autres modèles comme celui généré par injection intrapéritonéale de kaïnate, entraîne des lésions bilatérales et des crises généralisées. Or, on observe majoritairement chez les patients des lésions unilatérales et des crises focales. Pour cette raison, un modèle correspondant à cette étiologie était nécessaire. Un modèle de l'épilepsie mésial du lobe temporal a été développé chez la souris. Sa génération est obtenue par injection intrahippocampique de domoate, qui est un agoniste des récepteurs au glutamate de type AMPA (Figure A).



Figure A

Le modèle consiste en l'injection de domoate dans l'hippocampe. Une seringue est implantée au dessus de l'hippocampe, ne provoquant pas de lésion dans cette structure. Cette coloration au cresyl violet montre la perte cellulaire dans la région CA1.

Bourgeonnement des fibres moussues Dispersion de la couche granulaire



Figure B

Schéma récapitulatif des modifications histopathologiques associées au modèle





Figure C

On observe une dispersion de la couche granulaire du gyrus denté ipsilatéral (B et D). Cette dispersion peut être observée une semaine après l'injection. Elle progresse jusqu'à provoquer une sclérose de l'hippocampe. La dispersion du gyrus denté observée dans l'hippocampe ipsilatéral (B) correspond à une hypertrophie des corps cellulaires et à une augmentation de l'espace extracellulaire (D). L'hippocampe contralatéral ne présente pas de modifications histopathologiques (A et C).

A, B barre = 500μ m ; C, D barre = 25μ m Observation 48 semaines après injection.

In Inoue et al. Neuroscience 1998

Dans ce modèle, on observe l'apparition d'un « état de mal » suite à l'injection. Après une période de latence qui dure environ deux semaines, des crises focales hippocampiques unilatérales sont observées. Ces crises présentent un profil électroencéphalographique semblable à ceux observés chez les patients (Riban et al., 2002).

L'observation histologique montre que ce modèle reproduit les changements histopathologiques observés chez les patients atteints d'épilepsie mésiale du lobe temporale. On observe des pertes cellulaires dans les régions CA1, CA3 et dans le hilus. Un bourgeonnement des fibres moussues et un élargissement de la couche granulaire dans le gyrus denté (Bouilleret et al., 1999) (Figure B). L'élargissement, ou dispersion, de la couche granulaire correspond à une hypertrophie des corps cellulaires et à une augmentation de l'espace extracellulaire, tandis que le nombre de neurones dans la couche reste inchangé (Figure C) (Suzuki et al., 1995). La dispersion de la couche granulaire est dépendante du *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) puisque l'injection d'oligonucléotides antisens de BDNF empêche l'apparition de la dispersion (Guilhem et al., 1996).

Ces changements morphologiques, de même que les crises enregistrées par électroencéphalographie montrent une affection unilatérale. L'unilatéralité n'est pas observée chez le rat ayant subi des injections similaires. Le modèle implique donc une étude sur la souris.

4. Etude de la matrice extracellulaire dans l'épilepsie

La génération de crises épileptiques est corrélé avec des modifications morphologiques décrites ci-dessus. Un des problème posé dans l'étude de l'épilepsie est la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires associés avec ces modifications.

Les molécules de la matrice extracellulaire régulent la morphologie cellulaire, la migration et la croissance axonale lors du développement du SNC (cf. chapitre 5. de l'introduction générale). On peut donc poser comme hypothèse que ces molécules pourraient intervenir dans la régulation des modifications morphologiques observées dans l'épilepsie.

Dans le cas de lésions du SNC, il a été montré que l'expression des protéines de la MEC est modifiée et qu'elles régulent la régénération des axones. Les protéines de la MEC peuvent donc être exprimées chez l'adulte dans des contextes de pathologies pour réguler des changements cellulaires comme la croissance axonale ou la migration cellulaire (Bähr et Bonhoeffer, 1994).

Dans cette étude, nous avons étudié l'expression de molécules de la MEC associées avec les modifications histopathologiques observées dans un modèle de l'épilepsie du lobe temporal, afin de déterminer si ces molécules pourraient potentiellement être impliquées dans ces modifications.

5. La matrice extracellulaire dans les modèles d'épilepsie

L'expression de protéines de la MEC a été décrite dans des études antérieures. Les conclusions de ces études sont résumées dans la figure D.

On peut conclure de ces études que les protéines de la MEC sont exprimées dans des modèles d'épilepsie. Par contre, la diversité des modèles utilisés et le fait que dans la majorité des cas une seule protéine ai été étudiée ne permet pas de conclure à un schéma commun.

Un problème important de ces études est de discriminer les expressions de protéines de la MEC associées au phénomène d'épilepstogenése de celles associées aux lésions provoquées par les crises. En effet, on sait que les protéines de la MEC sont surexprimées dans les lésions et dans de nombreux modèles les crises épileptiques entraînent des lésions secondaires.

6. Méthodologie

Dans notre étude, nous avons étudié l'expression de molécules de la MEC par immunohistochimie. Cette technique nous est permise par le fait que le modèle est unilatéral. Cette caractéristique permet la comparaison des structures ispilatérales (hippocampe ayant subi l'injection de domoate) aux structures contralatérales, c'est à dire la comparaison à un contrôle interne.

7. Résultats

Les résultats sont décrits dans le manuscrit et présentés dans les figures. Un résumé da l'ensemble des résultats est donné dans le tableau 1.

On observe l'augmentation de l'expression de la tenascine-C, du neurocan et du sucre HNK-1 après une semaine, et l'augmentation de l'expression de l'expression du Phosphacan après deux semaines. La fibronectine et la laminine ne sont par contre pas exprimées dans

	Neurocan : Neurones Matsui et al., 2002 pyramidaux (avant mort	apoptotique), Astrocytes réactifs	14 j. Kurazono et al., 1. 2001	Astrocytes Shee et al., 1998	Précurseurs Bu et al., 2001	d'oligodendrocytes Microglie	Naffah-	Mazzacoratti et al., 1999	Wu et al., 2000	Astrocytes Niquet et al., 1994	Astrocytes Hoffman et al.,	Neurones 1998	Astrocytes Niquet et al., 1995	NI	Neurones en grains Ferhat et al., 1996		Neurones en grains 4 h. Nakic et al., 1996	Cellules pyramidales 30 j.
diminuée	Phosphacan Neuroglycan-C	après les crises	Neurocan, 7 et Phosphacan 8 r															
Expression augmentée	Neurocan 3 et 7 j., région CA1			Perlecan 5 j à 1 s.	NG2	1 à 90 j.	Phosphacan/RPTPβ		Phosphacan Gyrus denté	Fibronectine, région CA3 et CA4	Fibronectine	1 h.	Tenascine-C, région CA3	C	I enascine-C	6 h.	Tenascine-C	
Expression inchangée	Phosphacan Neuroglycan-C	Syndecan	Phosphacan et Neurocan 7 j., 3 m.															
Modèle	K aïnate intrapéritoneal		Ihara (IER) mutant	Kaïnate Ventricule	Kaïnate	Hippocampe postérieur	Pilocarpine	intrapéritonéal	Kaïnate Amygdala	Kaïnate Amvgdale	Kaïnate	intrapéritonéale	Kaïnate A murdala		Kainate	Amygdale	Kaïnate	intrapéritonéal
Animal	Rat		Rat	Mouse	Rat		Rat		Mouse plasminKO	Rat	Rat		Rat		Kat		Rat	

Figure D

l'étude de Wu et al., les observations sont faites sur la souris knock-out du gène codant la protéase plasmine. Les temps après injection auquels Le modèle est défini par l'agent convulsivant et le mode d'injection, sauf dans le cas des rats Ihara que sont des mutants épileptiques. Dans Récapitulatif des données bibliographiques montrant un changement d'expression de protéines de la MEC dans des modèles d'épilepsie. ont été faits les observations sont indiquées (h.=heure post injection, j.=jour, m.=mois). l'hippocampe. L'étude de la localisation montre que les molécules sont présentes uniquement dans le gyrus denté ; dans le hilus, la couche granulaire et moléculaire.

8. Discussion

Notre étude montre que des molécules de la MEC sont exprimées dans l'hippocampe épileptique dans le modèle murin de l'épilepsie mésial du lobe temporal.

On remarque que la localisation est restreinte au gyrus denté. Aucune expression n'est observée dans les régions CA1 et CA3 où il y a une perte cellulaire. De plus, si l'on observe une réactivité astrocytaire dans tout l'hippocampe, les protéines de la MEC ne sont exprimées que dans le gyrus denté. Ces observations sont importantes car elles tendent à montrer que les profils d'expression observés ne sont pas associés à des phénomènes lésionnels. On observe une corrélation dans le temps et dans l'espace entre l'expression des molécules de la MEC et les modifications histopathologiques associées à l'épilepsie. Notre modèle n'est donc pas un modèle lésionnel, et semble plutôt montrer que les molécules de la MEC soient impliquées dans le phénomène d'épileptogenése.

Peu d'études ont porté sur l'expression des protéines de la MEC chez les patients épilpetiques. Une étude a montré l'expression de la tenascine-C et deux études ont montré une augmentation de chaînes glycosaminoglycans correspondant sans doute à l'expression de protéoglycans. Les observations faites chez les patients humains sont en accord avec nos propre observations, ce qui apporte un nouvel élément de validation au modèle.

Les molécules de la MEC sont exprimées dans les régions de l'hippocampe dans lesquelles des modifications cellulaires sont observées, et il a été montré que ces molécules régulent ce type de phénomènes durant le développement. Aussi, il est probable que les molécules de la MEC participent à la régulation des modifications histopathologiques dans l'hippocampe épileptique. Les mécanismes moléculaires possibles de cette régulation sont discutés dans le manuscrit.

9. Perspectives

Afin de déterminer précisément les rôles joués par les molécules de la MEC dans les modifications histopathologiques associées à la génération de crises épileptiques, une étude pourrait être réalisé sur des souris déficientes pour les gènes codant les protéines de la MEC.

L'étude des modifications histopathologiques après injection intrahippocampique de kaïnate dans des souris *knock-out* de la tenascine-C, du Phosphacan, du Neurocan et d'HNK-1 permettrait peut-être de déterminer si ces molécules sont nécessaires à la régulation du bourgeonnement des fibres moussues et de l'élargissement de la couche granulaire.

Manuscrit 4

"Extracellular matrix molecules are upregulated in a murine model of temporal lobe epilepsy "

Nicolas Heck, Jeremy Garwood, Jean-Philippe Loeffler, Andreas Faissner et Yves Larmet

Manuscrit en préparation

INTRODUCTION

Temporal lobe epilepsy (TLE) is one of the most common neurological disorders (Margerison et corsellis 1991). In human, histological analysis of surgical resection of the hippocampus revealed Ammon's horn sclerosis and granule cell dispersion. These morphologicals changes are accompanied by occurrence of recurrent seizures that are often pharmacology resistant (Loscher 2002).

The systemic or intracerebral administration of kainic acid or domoic acid, powerful glutamate receptors agonists, have been extensively used to induce epileptic seizures in animals. In adult mice, the unilateral injection of kainic acid into the dorsal hippocampus has been found to result in histological changes that are reminiscent of those observed in human TLE. This features include cell death of pyramidal neurones in the CA1 and CA3 regions of Ammon's Horn, interneurons in the hilus, reactive gliosis, reorganisation of neurotransmitter receptors, mossy fibres sprouting into the molecular layer, and a pattern of cell dispersion in the granule cell layer of the dentate gyrus (Suzuki et al., 1997; Bouilleret et al., 1999). These mice also display spontaneous recurrent paroxysmal discharges in the hippocampus, replicating several key features of human TLE. In particular, a latent period before seizures begin, a limitation to the lesion area of the paroxystic ictal activity during the chronic phase, and a resistance of both the paroxystic ictal and interictal activity to classical antiepileptic drugs are observed (Riban et al., 2002).

Many studies indicate that there is a close link between the generation of epilepsy and the progressive changes observed in the structure and function of the hippocampus, both in patients and in animal models. Indeed, synaptic rearrangements of the mossy fibres are closely related with the onset of epileptic circuit. However, it's remained to be firmly proved that such hippocampal plasticity is a cause or a consequence of epilepsy.

There is now extensive evidence that localised expression of extracellular matrix molecules (ECM) can play a role in modulating the behaviour of cells during the development and maintenance of the adult brain. In addition, many studies indicate that such ECM components play a key role in pathological conditions and wound regeneration. Indeed it has

been proposed that the expression of ECM molecules in lesions contribute to the regenerative failure observed in the CNS, for example, in situations of axonal re-growth through glial scars. Although some studies of alterations in the expression of ECM molecules in epileptogenesis have been reported, there has been no systematic study of the temporal changes in ECM expression associated with the early latent period before the appearance of the first recurrent seizures. Here we report such a study, in which we have analysed the expression of a number of representative ECM proteins and carbohydrates which has been previously shown to interfere in different aspects of plasticity changes in the CNS.

Using intrahippocampal injection of glutamate receptors agonist, we have followed the expression pattern of three glycoproteins, Tenascin-C, Laminin and Fibronectin, two proteoglycans, Phosphacan and Neurocan, and one sugar epitope, HNK-1. This analysis was compared to the timing of the dentate gyrus granule cells dispersion and subsequent morphological changes. We show that these molecules are highly and specifically up regulated when the dispersion of granule cell layer and mossy fibre sprouting take place, leading to the possibility that they play direct role in the regulation of these phenomenons. These results suggest that specific ECM proteins are required for dispersion and occurrence of recurrent seizures, suggesting new perspectives in the treatment of human TLE.

MATERIEL AND METHODS

Animal and surgical procedures

Experiments were performed on adult male mice FVB/N weighting about 30-35g and housed in a 12h light dark controlled cycle in individual cages with free access to food and water. All experiments were performed in accordance to the European Committee Council directive of November 24, 1986 (86/69/EEC). Animals were anesthesiates using equithesin (4mL/Kg). Mice were stereotaxically injected with domoate (24 to 48 pmole) into the right dorsal hippocampus (cooordinates from bregma A=-1.8mm, and L=-1.6mm, from brain surface H=-1.9mm. Injection were performed as already described (Suzuki et al., 1995). Briefly, 50nl (32 pmoles) of the domoate solution dissolved in Phosphate-Buffered Saline (PBS) were injected using a Hamilton syringe at very low speed (50nl in 2 minutes) to avoid any mechanical damages. Control animals were injected with PBS alone or sham operated.

Killing and Brain perfusion

The animals were deeply anesthesiate using 4% hydrate chloral (0.15ml/10g) at various times after the injection. They were perfused intracardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS for 15 minutes. The brain were removed and post-fixed overnight with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS. The brains were cut in coronal sections of 30 μ m on a vibratome (Leica). The section were processed for cresyl violet staining to analyse the localisation of the injection site and the onset of neuronal death, only animals with a marked cell losses in the CA1 region were kept. PBS-injected or sham-operated animals show no cell loss and were used as control experiment.

For PCR experiment, after deep anaesthesia, fresh brain were removed, and cut in 300μ m thick slices in an ECSF-like solution using a vibratome (Leica). One or two 100μ m slices were kept for histological control of the extent of granule cell migration using cresyl violet staining. Thick slices were was further micro dissected under binocular in the same solution to isolate only the dentate gyrus of the hippocampus. This tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and keep at -80° C until PCR analysis.

Antibodies

Polyclonal sera were all from rabbit: KAF13 (1/400) was raised against the purified DSD-1-PG (Faissner et al., 1994) and recognises all isoforms of Phosphacan/RPTPbeta, KAF14 (1/400) was raised against purified Tenascin-C (TN-C) from post-natal mouse brains (Faissner and Kruse, 1990). The antibodies directed against Fibronectin (1/100) and Laminin (1/200) were from Sigma.

Neurocan was detected by using the monoclonal antibody 1D1 (1/20) and was provided by U. Rauch (University of Lund, Lund, Sweden). The rat monoclonal antibody 473HD was used to detect Phosphacan/RPTPbeta, and the rat monoclonal atibody 412 was used to detected HNK-1. The mouse monoclonal antibody directed against the Glial Fibrillate Associated Protein GFAP (1/400) was from Chemicon.

Secondary antibodies were goat anti rabbit cy2 (1/800), donkey anti mouse cy3 (1/800) and donkey anti rabbit cy3 (1/800) from R&D systems. For the detection of Neurocan, HNK-1 and the epitope 473 a biotinylated horse anti mouse (Vectastain, 1/400) and a biotinylated horse anti IgG from all species (universal biotinylated antibody) from Vectastain were used.

Immunological studies

Sections were permeabilized with 0,1% Triton in Phosphate Buffer Saline (PBS) for 10 minutes, then washed with PBS. After 2 hours blocking step with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS, the primary antibodies were incubated overnight at room temperature in PBS with 3% BSA. After 3 washes of 30 minutes in PBS, secondary antibodies were incubated for 2 hours at room temperature in PBS with 3% BSA. After 3 washes of 15 minutes in PBS, the sections were mounted on slides in 60% glycerol/40% PBS. In case of the use of biotinylated secondary antibodies, the incubation was done in 3% BSA in PBS with 5% serum from the animal were the antibody was produced followed by 3 washes of 15 minutes in PBS. Then streptavidine-cy3 (Jackson Immunochemicals 1/2000) was incubated for 30 minutes followed by 3 washes of 15 minutes in PBS.

PCR experiments

Total RNA was prepared from isolated hippocampi. Reverse-transcription used hexameric random primers (Amersham Pharmacia Biotech). 4 µg of total RNA, and 500 ng of random primers in a total volume of 25 µl. This was incubated at 65°C for 5 minutes and then cooled slowly to room temperature. The reactions were heated at 37°C before the addition of 5 µl of First Strand buffer (Life Technologies Inc.), 1,25 µl 0.1 M dithiothreitol, 1,25 µl 10 mM dNTPs, 0,5 µl of RNase inhibitor, and 1,25 µl of M-MuLv reverse transcriptase (200 IU/ml) (Life Technologies Inc.). The reactions were incubated for 50 minutes at 37°C, then at 95°C for 5 minutes. PCR amplification was performed using 2 µl of reverse transcriptase reaction per 20 µl of PCR reaction with 500 nM of the appropriate sense and antisense primers (see below). The reaction conditions were as follows: 60 mM Tris/HCl pH8.8, 15 mM (NH4)2SO4, 2 mM MgCl2, 0.5 mM dNTPs and 1 IU of Taq polymerase (AGS Gmbh, Heidelberg, Germany) per reaction. Cycling was performed using a thermocycler (PE-9600, Applied Biosystems) starting with a 3 minute denaturation step at 94°C, followed by 30-43 cycles (according to the abundance of the specific transcript) of:- 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 55°C and 30 seconds at 72°C, and a final extension step at 72°C for 7 minutes.

RESULTS

Histological changes and astrocytic reactivity

The morphological changes of the hippocampus were established using Nilss staining, 48 hours after the injection of the glutamate agoniste domoate a massive neuronal loss could be observed in the CA1 and the CA2 region of the hippocampus (Fig 1A). Some cells are also lost in the ventral part of the CA3 (CA4) and within the hilus of the dentate gyrus, neurones with a large cell body (mossy cells) are also lost. These losses are seen only in the injected hippocampus since no apparent neuronal losses are observed in the controlateral hippocampus (fig 1B)

As previously reported, these neuronal losses a strictly similar to that observed when kainate is injected (Suzuki et al., 1995; Bouilleret et al., 1999), furthermore, domoate injected animals present similar EEG recording than kainate-injected mice (Larmet et Depaulis, Data not shown).

In all animals, the syringe used to inject the domoate was implanted through the cortex and stopped close in the CA1 region, before reaching the hile of the dentate gyrus. Thus a lesion scar was formed above the hippocampus, but it did not directly extend to the hippocampus itself. This was important since the expression of the molecules of the extracellular matrix is known to be modulated in the context of a lesion scar. At the domoate dose injected, after 7 days, no clear dispersion of the granule cell layer could be observed , whereas at 14 days a significant increase of the thickness of dentate gyrus granule cell layer is clearly seen (Gigure 1 A). This phenomenon of dispersion is continuing at 21 days, and could occurs for several month (Suzuki et al., 1995). A close examination of granule cell layers show that there is a dispersion of the neurones since an hypertrophy of neurones is observed, as well as an increase of extracellular space between neuronal cell body. No massive increased of cell division are observed (data not shown).

In order to evaluate the role of non-neuronal cell, GFAP immunohistology were performed on adjacent slices at various times after the injection. A strong increase in immunoreactivity was observed for the astrocytic marker, GFAP (Figure 1 C). This increase in signal has been already described in other models of pathologies and indicates a reactivity of astrocytes. In the our model, the reactive astrocytes were found in the whole ipsilateral hippocampus (Figure 1 C), but not in the contralateral side (Figure 1 D). The hilus was the

place of an intense astrocytic reactivity, and the glial processes in the granule cell layer show an obvious increase in GFAP expression.

Tenascin-C

During the neuronal development of the CNS, Tenascin-C is a glycoprotein (TN-C) highly expressed by astrocytes and radial glia. In the adult brain, a basal expression remains in the CNS, with higher expression in restricted areas such as the dorsal part of the lateral ventricles (Gates et al., 1995). TN-C is well known to play a major role in the regulation of migration of granule cells from the cerebellum (Husman et al., 1992), precursors of oligodendrocytes (Kiernan et al., 1996) and can act as inhibitor or promoter of neurite growth, depending on the neuronal type (Götz et al., 1996). In brain pathologies TN-C could be up regulated after brain lesion. Recently, Faissner et al, have shown that TN-C is highly express in the human hippocampus during temporal lobe epilepsy (Scheffler et al., 1997).

The expression of TN-C was observed by immunohistochemistry at different times post injection. At 48h (48hpi), no changes could be detected between the ispilateral and contralateral hippocampi (Figure 2, A B). Tenascin-C is present in the hippocampus as a boundary between the hilus and the granule cell layer in the adult mouse, in the upper part of the polymorphic layer. But at 7days (7 dpi), an increased expression of TN-C was observed in the injected hippocampus (Figure 2 C), in comparison to the contralateral hippocampus (Figure 2 D). The increased expression was observed in the dentate gyrus, with the most of the signal being in the hilus, a place of intense GFAP immunoreactivity. High power magnification show a clear extracellular staining around the neurones of the granule cell layer and the molecular layer of the dentate gyrus. (Figure 3 F), no signal could be observed neither in the CA1 nor in the CA3 region, where the massive loss of pyramidal neurones occurs, this suggest that TN-C upregulation is not related to secondary event associated with neuronal apoptosis.

As the dentate gyrus granule cell dispersion take place, the increase of TN-C expression was further maintained 14 days (14 dpi) (Figure 2 E), as well as 21 days (21 dpi) after the injection (figure 2 G). No increase in TN-C expression were observed in other hippocampal region, or in the controlateral side (Figure 2 F, H) suggesting that the up-regulation of TN-C is strictly associated with dentate gyrus granule cell dispersion and mossy fibers sprouting.

To investigate the specificity of Tenascin-C expression we used a similar experimental approach to analyse the putative changes in other glycoproteins of the extracellular matrix

Such as Laminin and Fibronectin. Laminin was only found associated with blood vessels in the contralateral and ipsilateral hippocampi. No expression was found to be induce at any time observed (48hpi, 7dpi, 14dpi and 21dpi) (data not shown). Similarly, Fibronectin was not found to be upregulated neither at 48hpi or 7 and 14dpi (data not shown) in any part of the hippocampus.

The only molecule from the extracellular matrix, which has been studied so far in human patients with temporal lobe epilepsy is TN-C. In patients with Ammon Horn Sclerosis, the restricted expression of TN-C in the inner molecular and pleomorphic layers of the dentate gyrus were lost and an increase of TN-C expression was observed, colocalizing with areas of astrocytic reactivity and neuronal loss. Interestingly, changes in the pattern of expression of GAP43 revealed that growth cone activity in the molecular layer of the dentate gyrus colocalized with TN-C. This is an area where dendritic remodelling and TN-C upregulation appear in our mouse model too.

Phosphacan

Phosphacan (also known as DSD-1-PG and 6B4-PG) is a large chondroitin sulfate proteoglycan (180-kDa protein core, but up to 800 kDa with glycosylation), which represents the secreted isoform of a receptor protein tyrosine phosphatase, RPTP-beta. In addition to glycosaminoglycan chains, Phosphacan can possess N-linked sugars, including the HNK-1 epitope (Garwood et al., 1999). During brain development Phosphacan is mainly expressed postnatally in brain areas were intense axon growth and migration take place. In the adult brain only low level of expression is maintained. In vitro, that Phosphacan has been show to positively regulate the neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurones (Garwood et al., 1999).

The expression of Phosphacan/RPTPbeta was followed using a polyclonal antibody KAF13 that recognises all isoforms. No change in the basal level of Phosphacan/RTBbeta expression was observed up to 7 days after the injection (Figure 4 A, B). A strong upregulation of Phosphacan/RPTPbeta was seen 14 days after the injection (Figure 4 C), and this expression, was still maintained at 21days (data not shown). The localisation of Phosphacan/RPTPbeta upregulation is strictly restricted to the dispersing granule cell layer of the dentate gyrus with, as for TN-C, a staining appearing extracellular around the neurones (figure 5 A). An upregulation is seen in the molecular layer too, where mossy fibers sprouting occurs (Figure 5 A). The up regulation of the sugar chondroitin sulphate epitope carried by Phosphacan/RPTPbeta was further analysed using the monoclonal antibody 473HD. An

upregulation was observed in the hilus and granule cell layer of the ipsilateral dentate gyrus with 473 at 14days (Figure 4 E) and 21days (data not shown). But unlike the staining obtained with KAF13 which recognised all phosphacan isoform, the signal was restricted in the granule cell layer and, no signal was detected in the molecular layer were intense sprouting take place (Figure 5 B).

To further investigate the putative role of Phosphacan/RPTPbeta isoform, hippocampi were microdissected 14 days after the injection and PCR analysis were done using various primers, that allow to recognize which isoforms are expressed. In comparison to GAPDH levels, an expression of Phosphacan was observed ; but no signal for the RPTPbeta isoforms could be detected (Figure 6). This suggests that only the secreted isoform Phosphacan is upregulated. This result is in accordance with the extracellular staining seen in the granule cell layer with both antibodies KAF13 and 473HD (Figure 5 A, B).

HNK-1

HNK-1 is a sugar epitope which can be carried either by Phosphacan (Maeda et al., 1995), Neurocan (Retzler et al., 1996b), TN-C or adhesion molecules N-CAM and L1 (Kruse et al., 1984). A large body of literature has found that HNK-1 is specifically involved in cell adhesion, migration and axon growth (Schachner et Martini, 1995).

In this model of human TLE, the sugar epitope HNK-1 was also found to be upregulated at 14 dpi (Figure 5 C) and 21dpi (data not shown) whereas at 7 dpi after the injection, no marked increase of HNK-1 expression was observed (data not shown). In the ipsilateral hippocampi, an extracellular signal was observed in the hilus and the granule cell layer (Figure 5 E). In the molecular layer a strong and dense signal was observed, indicating that either ECM molecules in this layer are modified by addition of this sugar epitope when normally they don't, or that ECM molecules carrying this sugar epitope are upregulated. Because the timing of expression of HNK-1 is identical to the one observed for Phosphacan, it could be that the upregulation of HNK-1 corresponds to an expression of phosphacan carrying HNK-1.

Neurocan

Neurocan is a secreted chondroitin sulfate proteoglycan specific to the CNS, which belongs to the lectican family (Rauch et al., 2001). During brain development it is expressed by newly formed of differentiating neurones and astrocytes. Its main function is to inhibit neuronal adhesion and indeed play a key role during axon growth by interacting with adhesion molecules like N-CAM and L1 (Friedlander et al., 1994). In adult CNS, Neurocan expression remains low and mainly localized in the hippocampus. In pathological conditions such as lesion of the enthorinal pathway, an upregulation of Neurocan expression is observed (Haas et al., 1999).

In the TLE mouse model we found a widespread upregulation of Neurocan expression after 48 hours. This upregulation is observed mainly in the cortex and the whole hippocampus (data not shown). This increase was strongest near the lesion site caused by the canula and was almost absent in the hippocampus anterior or posterior to the site of injection, indicating that this upregulation was only the result of the mechanical lesion induced by the canula used for the injection. 7 days after the injection, a secondary, and more specific upregulation of Neurocan expression was observed only in the hilus and granule cell layer (Figure 7 A) of the injected hippocampus. This allows us to conclude that this upregulation is strictly associated with the cellular changes accompagning the dentate gyrus dispersion and not to the mechanical lesion induced by the canula. 14 days after the injection, a similar pattern of expression is present (Figure 7 C) and this signal were still observed at 21dpi (Figure 7 E). Whatsoever the time of the observation, we never observed Neurocan expression of the molecular layer of the dentate gyrus. This contrast to our results described for TN-C and Phosphacan.

In contrast to the expression pattern observed for TN-C and Phosphacan, some intracellular staining was observed, showing obvious neuronal expression of Neurocan in accordance with previous studies. The neuronal types expressing Neurocan could be identified morphologically and based on their tissue localisation as pyramidal cells, granule cells and neurones from the hilus, as shown for the contralateral hippocampus at 48 hours (Figure 7 G). At 14 days, when the dispersion of the granule cell layer begins, the expression of Neurocan by granule cells could be observed (Figure 7 H).

DISUSSION

In this study, we explored the expression of some extracellular matrix proteins in the hippocampus of mice with recurrent limbic seizures. We could show that specific proteins from the extracellular matrix were upregulated in the dentate gyrus (Table 1). Whilst no changes in the expression of either Laminin or Fibronectin were observed, a strong

upregulation of Tenascin-C was found. In addition, we could show the upregulation of the proteoglycans Phosphacan and Neurocan and of the sugar epitope HNK-1.

The up-regulation of ECM proteins is not a consequence of lesions

The putative implication of ECM proteins in the morphological changes observed in epilepsy models have been subject of various analysis Upregulation of TN-C (Niquet et al., 1995 ; Ferhat et al., 1996 ; Nakic et al., 1996), Neurocan (Kurazono et al., 2001 ; Matsui et al., 2002) have been observed, when the upregulation of Phosphacan have only been described in one mouse model (Naffah-Mazzacoratti et al., 1999 ; Kurazono et al., 2001 ; Matsui et al., 2002; Wu et al., 2002). However, in these animals models, such morphological changes were often associated to lesion or massive neuronal losses. Since ECM proteins are often upregulated when neuronal lesions occurs, the exact role of ECM in the histopathological changes were often difficult to explain. In our model, we, and others, have shown a clear distinction between the initial and immediate cell death and the granule cell dispersion that occurs several days after the injection (Bouilleret et al., 1999). In most studies, systemic injection of kainate in rat or mice, lead to immediate and repetitive severe seizures, associated with massive neuronal losses in most of the area of both hippocampi. On the contrary the domoate mice model shows relatively discrete and unilateral neuronal losses and a progressive dispersion of granule cell layer in the dentate gyrus. And our results clearly show that ECM proteins up-regulation occurs far from cell death area and from the mechanical lesion associated to the injection canula.

Finally, even if the astrocytic reactivity is observed in the whole hippocampus, we found that up-regulation of ECM proteins is strictly associated with the dentate gyrus where the histopathological changes take place. Thus, the observed expression of proteins from the ECM seems to be clearly linked to the histopathological changes associated with epileptogenesis.

Biomechanical implication of ECM proteins expression in the dispersion of the granule cells layer

In the process of the dispersion of the granule cells, the cell bodies increase in size and are becoming more spaced in the expanding layer. Hence, the dispersion of the granule cell layer increases steadily for months until it finally comes to occupy the entire space formally occupied by the hippocampus. These morphological characteristics remains specific to this mouse model but are also observed in human tissues. Compared to the ECM in other tissues,

the ECM of the CNS has a relatively dynamic and fluid structure, characterised by the absence of collagen fibres and an abundance of proteoglycans. This "looser" structure of the ECM in the CNS may reflect the extensive cellular rearrangement, which occur during development and maintenance of the tissue, including migration of precursors from zones of proliferation, and the plasticity of process growth and interaction. Based on our observations, up regulation of the ECM proteins in the expanding granule cell layer, we propose a variation in the above model. Here we suggest that biomechanical force which leads to the dispersion results from a hydrodynamic swelling of the tissue, rather than from an external "pull" due to the contraction of trophic factors. Hence, we observe that there is an increase in levels of glycosaminoglycans and charged oligosaccharides, such as HNK-1, all of which can interact with water molecules to form gels like the glycocalyx and mucous-like material. By capturing water, these ECM molecules could increase the relative water pressure of the granule cell layer and hence, if there is less resistance from the surrounding necrosing tissue, the volume of the granule cell layer. Such tissue swelling elsewhere in the body is observed in many wound reactions and it has been clearly shown that this is associated with hydrodynamic ECM changes. In this model the expansion of the granule cell layer is thought to occur due to the hypertrophy of the surrounding hippocampal tissue which serves to draw the granule cell layer out. In the swelling, the granule cells remain connected to their respective targets, but their cell bodies are slowly pushed apart as they become more spaced and it is probable that in response they extend their axons and dendrites to maintain their synaptic connections. It's noteworthy that a strong upregulation of glycosaminoglycan chains are measured in the human patients (Perosa et al., 2002a ; Perosa et al., 2002b)

Inhibition of cell adhesion during the dispersion of granule cell layer

The staining pattern observed in the granule cell layer indicates an increase in TN-C, Phosphacan, and HNK-1 in the extracellular matrix surrounding the granule cells and this increase coincide in time with the dispersion of the granule cell layer. As TN-C, Phosphacan and Neurocan are known to regulate cell migration and are ligands for adhesion molecules during neuronal development, it is likely that these molecules are directly implicated in the regulation of the process of dispersion.

Neurocan and Phosphacan could play a direct role in cell dispersion by acting on neuronal adhesion. Indeed, Neurocan as well as Phosphacan interact through their core protein with the neuronal receptors L1 and N-CAM (Grumet et al, 1993; Milev et al., 1994; Friedlander et al., 1994). In vivo, Neurocan is cleaved in two products, named Neurocan-N

and Neurocan-C, according to the terminal part present in each product. Biochemical studies have shown that Neurocan-C, which is recognized by the antibody we used in this study, was the more efficient for binding N-CAM (Retzler et al., 1996a). Further experiments have shown that both proteoglycans inhibit adhesion between neurones by interfering with L1 and N-CAM homophilic binding (Grumet et al, 1993, Milev et al., 1994). Thus, Neurocan Phosphacan could play a crucial role in the dispersion of the granule cell layer by inhibiting adhesiveness between neurones by interacting with L1 and NCAM.

In this human TLE model, it has been shown that PSA-NCAM as upregulated (Bouilleret et al., 1999). The expression of PSA-NCAM has been explained on others models to be a marker of plasticity; the hypothesis being that the presence of PSA interfere with the homophilic binding of N-CAM, reducing adhesiveness, thus leading to the possibility of structural changes (Bruses et Rutishauser, 2001).

Thus, NCAM carrying PSA as well as Phosphacan and Neurocan could inhibit neuronal adhesion, this process would be necessary for the onset of dispersion.

ECM up-regulation could trigger neuronal sprouting in the epileptic circuit

In various epileptic models following injection of glutamate receptor agonist, intense synaptic rearrangement has been described. Such rearrangement may contribute, or initiate, the epileptic circuit that generate recurrent seizures. ECM molecules are key regulators of axon and dendrites growth, and the upregulation of TN-C and Phosphacan in the molecular layer, a place of intense sprouting, lets suppose than these molecules regulate the remodelling of the dendritic tree of the granule cells. Indeed, in the molecular layer the dendrites of the granule cells present NCAM, PSA-NCAM and the beta1 Integrin (Schuster et al., 2001), which are neuronal receptors for ECM proteins involved in the regulation of neurite growth.

In adult hippocampi from rodents, F3/Contactin is expressed by granule cells and transported onto axonal and dendrites membranes (Virgintino et al., 1999). The upregulation of Tenascin-C is then relevant because it has been demonstrated that it mediates in vitro neurite outgrowth promotion of hippocampal neurones through the Contactin/F3 receptor (Rigato et al., 2002). Thus, TN-C could enhance mossy fiber sprouting by interacting with F3/contactin.

The core protein of Phosphacan, recognized by the antibody KAF13, is upregulated in the molecular layer. On the other hand, the sugar epitope 473, present in the GAGs chains of Phosphacan, is not seen in this layer. As purified Phosphacan is inhibitory for neurite growth of granular cells (Wu et al., 2000), when the sugar epitope 473 is a promoter of neurite growth

of hippocampal neurones (Garwood et al., 1999), such a distribution seems in contradiction with the observation of the sprouting of dendrites of granular neurones. An explanation could be that Phosphacan is cleaved by proteases. A decreased mossy fibre sprouting was observed in tissue plasminogen activator null mice after injection of kainate in the amygdala, and this decrease was found to be due to an accumulation of the non-cleaved form of Phosphacan (Wu et al., 2000). Another explanation could come from the expression in the molecular layer of an isoform of Phosphacan which do not carry GAGs chains (Garwood et al., manuscript in press).

ECM proteins regulate neuronal activity

Recently, study of the TN-C and Neurocan null mutants has shown evidence for the implication of TN-C in the modulation of long term potentiation in the hippocampus (Zhou et al., 2001; Evers et al., 2002; Strekalova et al., 2002). Similar results have been obtained for mice deficient in enzyme necessary for the biosynthesis of HNK1 (Senn et al., 2002; Yamamoto et al., 2002) or after administration of antibodies directed against this carbohydrate (Saghatelyan et al., 2000; Strekalova et al., 2001). It has been shown that the extracellular domains of RPTPbeta, which are identical to Phosphacan, can interact with voltage dependant sodium channels and modulate their activities (Rattcliffe et al. 2001).

Hence, since changes of synaptic contact and synaptic strength are meant to occur in the context of the reorganization of the epileptic hippocampus, the correlation between these events and the upregulation of extracellular molecules may imply a putative role for HNK-1, TN-C, Neurocan and Phosphacan in synaptic plasticity during epileptogenesis.

ECM proteins could be active regulators of epileptogenesis

In this study, we could show that specific proteins from the ECM are upregulated in the hippocampus of epileptic mice. The expression of these proteins is correlated in space and time with the histopathological changes associated with the epileptic activity.

As these ECM proteins are putative regulators of cell adhesion and migration, fiber sprouting and synaptic plasticity, they could play a direct role in the regulation of the cellular changes observed in the dentate gyrus and then be indirectly involved in the onset of seizures.

References

Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G (1999) Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. Neuroscience 89:717-729.

Bruses JL, Rutishauser U (2001) Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. Biochimie 83:635-643.

Clement AM, Nadanaka S, Masayama K, Mandl C, Sugahara K, Faissner A (1998) The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. J Biol Chem 273:28444-28453.

Evers MR, Salmen B, Bukalo O, Rollenhagen A, Bosl MR, Morellini F, Bartsch U, Dityatev A, Schachner M (2002) Impairment of L-type Ca2+ channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. J Neurosci 22:7177-7194.

Faissner A, Clement A, Lochter A, Streit A, Mandl C, Schachner M (1994) Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. J Cell Biol 126:783-799.

Ferhat L, Chevassus-Au-Louis N, Khrestchatisky M, Ben-Ari Y, Represa A (1996) Seizures induce tenascin-C mRNA expression in neurons. J Neurocytol 25:535-546.

Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M (1994) The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. J Cell Biol 125:669-680.

Garwood J, Schnadelbach O, Clement A, Schutte K, Bach A, Faissner A (1999) DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. J Neurosci 19:3888-3899.

Gates MA, Thomas LB, Howard EM, Laywell ED, Sajin B, Faissner A, Gotz B, Silver J, Steindler DA (1995) Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. J Comp Neurol 361:249-266.

Gotz B, Scholze A, Clement A, Joester A, Schutte K, Wigger F, Frank R, Spiess E, Ekblom P, Faissner A (1996) Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. J Cell Biol 132:681-699.

Grumet M, Flaccus A, Margolis RU (1993) Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. J Cell Biol 120:815-824.

Grumet M, Milev P, Sakurai T, Karthikeyan L, Bourdon M, Margolis RK, Margolis RU (1994) Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. J Biol Chem 269:12142-12146.

Guilhem D, Dreyfus PA, Makiura Y, Suzuki F, Onteniente B (1996) Short increase of BDNF messenger RNA triggers kainic acid-induced neuronal hypertrophy in adult mice. Neuroscience 72:923-931.

Haas CA, Rauch U, Thon N, Merten T, Deller T (1999) Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. J Neurosci 19:9953-9963.

Husmann K, Faissner A, Schachner M (1992) Tenascin promotes cerebellar granule cell migration and neurite outgrowth by different domains in the fibronectin type III repeats. J Cell Biol 116:1475-1486.

Jones PL, Jones FS (2000) Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. Matrix Biol 19:581-596.

Kiernan BW, Gotz B, Faissner A, ffrench-Constant C (1996) Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms. Mol Cell Neurosci 7:322-335.

Kiss JZ, Troncoso E, Djebbara Z, Vutskits L, Muller D (2001) The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. Brain Res Brain Res Rev 36:175-184.

Kruse J, Mailhammer R, Wernecke H, Faissner A, Sommer I, Goridis C, Schachner M (1984) Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. Nature 311:153-155.

Kurazono S, Okamoto M, Sakiyama J, Mori S, Nakata Y, Fukuoka J, Amano S, Oohira A, Matsui H (2001) Expression of brain specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the developing and adult hippocampus of Ihara's epileptic rats. Brain Res 898:36-48.

Maeda N, Hamanaka H, Oohira A, Noda M (1995) Purification, characterization and developmental expression of a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, 6B4 proteoglycan/phosphacan. Neuroscience 67:23-35.

Matsui F, Kawashima S, Shuo T, Yamauchi S, Tokita Y, Aono S, Keino H, Oohira A (2002) Transient expression of juvenile-type neurocan by reactive astrocytes in adult rat brains injured by kainate-induced seizures as well as surgical incision. Neuroscience 112:773-781.

Mikkonen M, Soininen H, Kalvianen R, Tapiola T, Ylinen A, Vapalahti M, Paljarvi L, Pitkanen A (1998) Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex. Ann Neurol 44:923-934.

Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK, Grumet M, Margolis RU (1994) Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. J Cell Biol 127:1703-1715.

Miura R, Ethell IM, Yamaguchi Y (2001) Carbohydrate-protein interactions between HNK-1-reactive sulfoglucuronyl glycolipids and the proteoglycan lectin domain mediate neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. J Neurochem 76:413-424.

Naffah-Mazzacoratti MG, Arganaraz GA, Porcionatto MA, Scorza FA, Amado D, Silva R, Bellissimo MI, Nader HB, Cavalheiro EA (1999) Selective alterations of glycosaminoglycans synthesis and proteoglycan expression in rat cortex and hippocampus in pilocarpine-induced epilepsy. Brain Res Bull 50:229-239.

Nakic M, Mitrovic N, Sperk G, Schachner M (1996) Kainic acid activates transient expression of tenascin-C in the adult rat hippocampus. J Neurosci Res 44:355-362.

Nakic M, Manahan-Vaughan D, Reymann KG, Schachner M (1998) Long-term potentiation in vivo increases rat hippocampal tenascin-C expression. J Neurobiol 37:393-404.

Niquet J, Jorquera I, Faissner A, Ben-Ari Y, Represa A (1995) Gliosis and axonal sprouting in the hippocampus of epileptic rats are associated with an increase of tenascin-C immunoreactivity. J Neurocytol 24:611-624.

Perosa SR, Porcionatto MA, Cukiert A, Martins JR, Amado D, Nader HB, Cavalheiro EA, Leite JP, Naffah-Mazzacoratti MG (2002a) Extracellular matrix components are altered in the hippocampus, cortex, and cerebrospinal fluid of patients with mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia 43 Suppl 5:159-161.

Perosa SR, Porcionatto MA, Cukiert A, Martins JR, Passeroti CC, Amado D, Matas SL, Nader HB, Cavalheiro EA, Leite JP, Naffah-Mazzacoratti MG (2002b) Glycosaminoglycan levels and proteoglycan expression are altered in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. Brain Res Bull 58:509-516.

Rauch U, Feng K, Zhou XH (2001) Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. Cell Mol Life Sci 58:1842-1856.

Retzler C, Gohring W, Rauch U (1996a) Analysis of neurocan structures interacting with the neural cell adhesion molecule N-CAM. J Biol Chem 271:27304-27310.

Retzler C, Wiedemann H, Kulbe G, Rauch U (1996b) Structural and electron microscopic analysis of neurocan and recombinant neurocan fragments. J Biol Chem 271:17107-17113.

Riban V, Bouilleret V, Pham-Le BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A (2002) Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience 112:101-111.

Rigato F, Garwood J, Calco V, Heck N, Faivre-Sarrailh C, Faissner A (2002) Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced fibronectin type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/contactin. J Neurosci 22:6596-6609.

Saghatelyan AK, Gorissen S, Albert M, Hertlein B, Schachner M, Dityatev A (2000) The extracellular matrix molecule tenascin-R and its HNK-1 carbohydrate modulate perisomatic inhibition and long-term potentiation in the CA1 region of the hippocampus. Eur J Neurosci 12:3331-3342.

Sakurai T, Lustig M, Nativ M, Hemperly JJ, Schlessinger J, Peles E, Grumet M (1997) Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta. J Cell Biol 136:907-918.

Schachner M, Martini R (1995) Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. Trends Neurosci 18:183-191.

Scheffler B, Faissner A, Beck H, Behle K, Wolf HK, Wiestler OD, Blumcke I (1997) Hippocampal loss of tenascin boundaries in Ammon's horn sclerosis. Glia 19:35-46.

Schnapp LM, Hatch N, Ramos DM, Klimanskaya IV, Sheppard D, Pytela R (1995) The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. J Biol Chem 270:23196-23202.

Schuster T, Krug M, Stalder M, Hackel N, Gerardy-Schahn R, Schachner M (2001) Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. J Neurobiol 49:142-158.

Senn C, Kutsche M, Saghatelyan A, Bosl MR, Lohler J, Bartsch U, Morellini F, Schachner M (2002) Mice deficient for the HNK-1 sulfotransferase show alterations in synaptic efficacy and spatial learning and memory. Mol Cell Neurosci 20:712-729.

Strekalova T, Wotjak CT, Schachner M (2001) Intrahippocampal administration of an antibody against the HNK-1 carbohydrate impairs memory consolidation in an inhibitory learning task in mice. Mol Cell Neurosci 17:1102-1113.

Strekalova T, Sun M, Sibbe M, Evers M, Dityatev A, Gass P, Schachner M (2002) Fibronectin domains of extracellular matrix molecule tenascin-C modulate hippocampal learning and synaptic plasticity. Mol Cell Neurosci 21:173-187.

Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sorensen JC, Onteniente B (1995) Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. Neuroscience 64:665-674.

Suzuki F, Makiura Y, Guilhem D, Sorensen JC, Onteniente B (1997) Correlated axonal sprouting and dendritic spine formation during kainate-induced neuronal morphogenesis in the dentate gyrus of adult mice. Exp Neurol 145:203-213.

Virgintino D, Ambrosini M, D'Errico P, Bertossi M, Papadaki C, Karagogeos D, Gennarini G (1999) Regional distribution and cell type-specific expression of the mouse F3 axonal glycoprotein: a developmental study. J Comp Neurol 413:357-372.
Extracellular molecules are upregulated in a murine model of temporal lobe epilepsy

Vutskits L, Djebbara-Hannas Z, Zhang H, Paccaud JP, Durbec P, Rougon G, Muller D, Kiss JZ (2001) PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. Eur J Neurosci 13:1391-1402.

Wu YP, Siao CJ, Lu W, Sung TC, Frohman MA, Milev P, Bugge TH, Degen JL, Levine JM, Margolis RU, Tsirka SE (2000) The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. J Cell Biol 148:1295-1304.

Yamamoto S, Oka S, Inoue M, Shimuta M, Manabe T, Takahashi H, Miyamoto M, Asano M, Sakagami J, Sudo K, Iwakura Y, Ono K, Kawasaki T (2002) Mice deficient in nervous system-specific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. J Biol Chem 277:27227-27231.

Zhou XH, Brakebusch C, Matthies H, Oohashi T, Hirsch E, Moser M, Krug M, Seidenbecher CI, Boeckers TM, Rauch U, Buettner R, Gundelfinger ED, Fassler R (2001) Neurocan is dispensable for brain development. Mol Cell Biol 21:5970-5978.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 Histopathological changes and astrocytic reactivity

A-B : Cresyl-violet coloration of the hippocampus of treated mice at 14dpi. A : ipsilateral hippocampus, B : contralateral hippocampus. The dispersion of the granular cell layer in the ipsilateral hippocampus is already begun, seen as a slightly increase in the width of the granule cell layer.

C-D : Immunostaining for the astrocytic GFAP marker in the hippocampus of treated mice at 14dpi. C : ipsilateral hippocampus, D : contralateral hippocampus. The ipsilateral hippocampus show a strong astrocytic reactivity, revealed by the increase in GFAP staining. Objective x10.

Figure 2 Immunostaining for Tenascin-C

A, C, E, G : ipsilateral hippocampus ; B, D, F, H : contralateral hippocampus A,B : 48hpi ; C, D : 7dpi ; E,F : 14dpi; G,H : 21dpi ; objective x10. From 7dpi to 21dpi, an increase in TN-C immunoreactivity is seen in the hilus, granular cell layer and the molecular layer.

Figure 3 Immunostaining for Tenascin-C and GFAP

Immunostaining for Tenascin-C (red) and GFAP (green) at 14 dpi

A : ipsilateral hippocampus ; B : contralateral hippocampus ; objective x10.

B, C : contralateral hippocampus ; E,F : ipsilateral hippocampus ; objective x40.

When the astrocytic reactivity, seen with the increase in GFAP signal, occurs in the whole ispilateral hippocampus, the upregulation of Tenascin-C is localized in the dentate gyrus of the ipsilateral hippocampus.

Figure 4 Immunostaining for Phosphacan

A, C, E : ipsilateral hippocampus ; B, D, F : contralateral hippocampus ; objective x10.

A, B, C, D : Immunohistochemistry with the antibody KAF13.

E, F : Immunohistochemistry with the antibody 473HD.

A, B : 7dpi ; C, D, E, F : 14dpi.

At 14dpi, an upregulation of Phosphacan expression is observed. The KAF13 antibody shows an localization in all parts of the dentate gyrus, but the 473HD antibody do not reveal any signal in the molecular layer.

Figure 5 Immunostaining for Phosphacan and HNK-1 at 14 dpi

A, B : ipsilateral hippocampus ; objective x40.

A : Immunohistochemistry with the antibody KAF13.

- B : Immunohistochemistry with the antibody 473HD.
- C, D, E, F : Immunohistochemistry with the antibody 412 directed against HNK-1.

C, E : ipsilateral hippocampus ; D, F : contralateral hippocampus

C, D : objective x10 ; E, F : objective x40 on confocal microscope.

A clear extracellular staining is seen for phosphacan and HNK-1 in the dispersing granular layer. The sugar epitope HNK-1, recognized by the 412 antibody, shows an upregulation in the dentate gyrus, with particularly strong staining in the molecular layer (E).

Figure 6 Phosphacan expression

Phosphacan, but not RPTPbeta is expressed in the adult hippocampus and cortex.

Figure 7 Immunostaining for Neurocan

A, C, E : ipsilateral hippocampus ; B, D, F : contralateral hippocampus ; objective x10. A, B : 7dpi ; C, D : 14dpi ; E, F : 21dpi.

Neurocan is upregulated in the dentate gyrus of the ipsilateral hippocampus from 7 to 21 dpi, but it is absent of the molecular layer.

G : contralateral hippocampus at 48hpi, objective x20 on confocal microscope ; H : ipsilateral hippocampus at 14dpi ; objective x40 on confocal microscope.

Neurocan is expressed by granular neurons and neurons from the hilus in normal conditions (G) as well as when the dispersion of neurons occurs (H).



Figure 1



Figure 2



Figure 3



Figure 4



Figure 5



Figure 6



Figure 7

HNK1	I	I	+	+
Neurocan	I	+	+	+
Phosphacan	ı	I	+	+
Laminin	I	ı	ı	I
Fibronectin	I	I	I	
Tenascin-C	I	+	+	+
Cellular events	Neuronal apoptosis In CA1, CA3 and hilus	Increased expression of BDNF	Dispersion of the granule cell layer	Sprouting in the molecular layer
Type of seizures	Kaïnate induced seizure		Chronic limbic seizures	
Time Post- injection	48hpi	7dpi	14dpi	21dpi

Table 1

ETUDE DE PSI, UNE NOUVELLE ISOFORME DE PHOSPHACAN/RPTPβ

ETUDE DE PSI, UNE NOUVELLE ISOFORME DE PHOSPHACAN/RPTPβ

Manuscrit 5

"Phosphacan Short Isoform, a novel non-proteoglycan variant of phosphacan/RPTP β , that can also interact with neuronal receptors and promote neurite outgrowth"

1. Introduction

Phosphacan est un protéoglycan de la matrice extracellulaire du système nerveux central qui est impliqué dans les interactions neurone-glie (cf. chapitres 4.2. et 5.3. de l'introduction). Des études ont montré son rôle dans la régulation de la croissance axonale et l'étude de souris déficientes pour le gène codant pour Phosphacan/RPTP β ont dévoilé un rôle dans la myélinisation (cf. chapitre 5.4. de l'introduction générale). Dans cette étude l'existence d'une quatrième isoforme est montrée.

2. Mise en évidence d'une nouvelle isoforme de Phosphacan/RPTP β : PSI

Dans des études précédentes, un anticorps monoclonal nommé 473HD dirigé contre un protéoglycan du SNC nommé DSD-1 Protéoglycan (DSD-1-PG) a été produit. Dans le but d'identifier DSD-1-PG, le criblage d'une banque d'ADN complémentaire a été réalisée. Comme l'anticorps 473HD reconnaît un épitope situé dans les GAGs, le criblage a été réalisé avec un anticorps polyclonal (KAF13) dirigé contre le corps protéique de DSD-1-PG. DSD-1-PG a ainsi été identifié comme étant l'homologue murin du protéoglycan Phosphacan/RPTPβ (Garwood et al., 1999). Chez le rat et la souris, phosphacan/RPTPβ correspond à trois isoformes : phosphacan, protéoglycan secrété ; et RPTPβ qui correspond à deux isoformes transmembranaires (figure 1).

Le criblage de la banque a de plus révélé un clone correspondant à une quatrième isoforme de ce gène.

3. Caractérisation de la nouvelle isoforme

L'analyse du clone obtenu par criblage de la banque d'ADN complémentaire montre que la nouvelle isoforme correspond à la partie N-terminale suivi du domaine Fibronectin de type III et de la moitié de la région « spacer » de Phosphacan (figure 1) ; la nouvelle isoforme a été nommée *Phosphacan Short Isoform* (PSI). Son expression *in vivo* est confirmée par northern blot (figure 3).

PSI a été étudié au niveau protéique. On observe par western blot une bande à 90kD (figure 4). Une purification par chromatographie et l'obtention de séquences peptidiques montrent que cette bande correspond à PSI. La séquence de PSI ne contient pas de région d'attachement de GAGs et une digestion à la chondroitinase ne modifie pas la bande à 90kD observée en western blot. PSI n'est donc pas un protéoglycan. Mais une digestion à la N-glycosidase montre un changement de taille en western blot, indiquant que PSI est glycosylée (figure 5).

Un résultat intriguant est que PSI est détecté dans la fraction membranaire des lysats. Une extraction avec des détergents est nécessaire pour isoler la protéine. Une analyse de la séquence peptidique de PSI ne révélent cependant pas de site consensus de fixation de motif GPI. De plus, la protéine F3, qui est liée à la membrane par un motif GPI, est extraite de la fraction membranaire en présence de détergents comme le NP40, mais pas en présence d'urée, qui est un agent chaotropique, alors qu'un traitement à l'urée suffit pour solubiliser PSI (figure 4). Ces données indiquent que PSI pourrait être rattachée à la membrane par des interactions avec des récepteurs membranaires. PSI pourrait ainsi être un constituant de la matrice péricellulaire (cf. chapitre 3.3. de l'introduction).

4. PSI interagit avec F3 et L1 et régule la croissance neuritique

Il a été montré que Phosphacan/RPTPβ interagit avec les CAMs F3/contactine, L1 et TAG-1/axonine-1 (Milev et al., 1994 ; Peles et al., 1995 ; Milev et al., 1996). L'interaction avec

TAG-1 se fait au niveau des GAGs, cette interaction n'a donc pas été testée. L'interaction avec F3 et L1 se fait sur la partie N-terminale de Phosphacan/RPTPβ, ce qui laisse supposer que PSI pourrrait interagir avec ces protéines. Des immunoprécipitations ont donc été réalisées. Les résultats obtenus montrent que PSI interagit avec les CAMs F3 et L1.

Phosphacan régule la croissance neuritique de différents types neuronaux, et F3 et L1 sont des récepteurs impliqués dans le crontrôle de la croissance axonale (Kamiguchi et Lemmon, 1997). Les effets de PSI sur la croissance neuritique a donc été testée. Pour cela, une protéine bactérienne de séquence peptidique identique à PSI est utilisée comme substrat de culture. On observe que PSI est promotrice de la croissance neuritique des neurones corticaux, mais la quantification des résultats montre que l'effet promoteur de Phosphacan (observée avec du Phosphacan purifié) est supérieur à celui observé avec PSI (figure 9 et table 1).

5. PSI est exprimée par les neurones corticaux

5.1. Méthodologie

La séquence peptidique de PSI est identique à une partie de la séquence des autres isoformes (figure 1). Par conséquent, il n'est pas possible d'obtenir un anticorps spécifique de PSI. Par conséquent, il a été choisi de réaliser des hybridation *in situ*. Nous avons analysé l'expression de PSI aux stades postnataux, car on observe un pic d'expression de PSI durant cette période (figure 7).

Afin de comparer l'expression de Phosphacan/RPTPβ et de PSI, nous avons généré quatre sondes : 4-form, qui reconnaît toutes les isoformes ; 3-form, qui reconnaît toutes les isoformes à l'exception de PSI ; PSI, qui reconnaît PSI ; PTP, qui reconnaît RPTPβ (figure 10). La séquence choisie pour la sonde spécifique de PSI est complémentaire de la partie 3'-UTR de l'ARNm codant PSI, ceci afin d'obtenir une spécificité pour l'isoforme (figure 3). Le clonage de PSI a permis la connaissance de cette séquence 3'-UTR, qui est seule spécifique de PSI en comparaison aux autres isoformes. Un problème posé par l'utilisation de cette séquence est que la sonde sens correspondante est complémentaire de l'ARNribosomal 28S. Par conséquent, nous avons

considéré d'autres sondes sens de même taille comme contrôle négatif (cf. chapitre 3.3. de la section méthodes). Pour les autres sondes, une sonde sens a été utilisée comme contrôle.

5.2. Expression dans le cortex

L'anticorps KAF13 qui reconnaît les quatres isoformes, montre une distribution extracellulaire dans l'ensemble du cortex (figure 11B). Phosphacan/RPTP β est présent dans toutes les couches corticales, y compris la couche moléculaire.

La sonde 4-form montre une expression uniformément répartie dans les couches corticales, à l'exception de la couche moléculaire qui ne montre pas de cellules exprimant phosphacan/RPTPß (figure 11 D). Cette observation est en accord avec la distribution de la protéine, observée avec l'anticorps KAF13, et avec les observations présentes dans la littérature. L'absence de signal en hybridation *in situ* dans la couche moléculaire est normal puisque cette couche ne contient pas de cellules mais des fibres. La présence de la protéine dans cette couche pourrait être due soit à une diffusion de phosphacan, soit à une expression des cellules Cajal-Retzius, qui sont présentes dans la couche moléculaire durant le développement embryonnaire puis disparaissent durant la période postnatale. Phosphacan, secrété par ces cellules, pourrait rester présent dans cette couche corticale.

La sonde 3-form révéle un profil d'expression par l'ensemble des cellules du cortex similaire à celui obtenu avec la sonde 4-form, mais on remarque une diminution du signal (figure 11 F). Ces résultats indiquent que au moins une isoforme (phosphacan, sRPTPß ou IRPTPß) est exprimée dans le cortex postnatal. Cependant, bien que 3-form reconnaisse 3 isoformes, le marquage ne représente sans doute que l'expression de phosphacan, puisque l'expression de RPTPß est restreinte à la zone sous-ventriculaire (Canoll et al., 1996; Snyder et al., 1996 ; figure 13).

Les hybridation *in situ* réalisées avec la sonde PSI montrent une expression dans le cortex postnatal (Figure 11 H). On observe une expression dans toutes les couches cellulaires, à l'exception de la couche moléculaire. L'observation de la répartition des cellules exprimant PSI dans le tissu permettent de penser que PSI est exprimée par les neurones. L'observation de la morphologie des cellules confirme cette hypothèse (Figure 12). Le signal correspondant à

l'ARNm codant PSI est localisé dans le corps cellulaire des neurones autour du noyau et dans la partie proximale de l'arborisation dendritique. La localisation de l'ARNm codant PSI dans la partie proximale de la dendrite primaire n'est cependant pas suffisante pour conclure à une translocation de l'ARNm ou à une localisation de la protéine dans les dendrites.

On observe que le signal obtenu avec la sonde PSI est réparti autour du noyau, formant un croissant ou un cercle, alors que le marquage obtenu avec la sonde 4-form correspond à des points. Du fait de cette différence, le marquage obtenu avec PSI semble plus fort que celui obtenu avec la sonde 4-form, mais cela n'implique pas que le nombre de cellules marquées avec la sonde PSI soit supérieur au nombre de cellules marquées avec la sonde 4-form. La différence de marquage est sans doute due, en plus du fait que les sondes ont des séquences différentes, à la méthode de détection. Pour chaque sonde, une réaction enzymatique permet de révéler le signal et le temps de révélation est différent pour chaque sonde. La méthodologie employée pourrait donc expliquer la différence entre les formes de signal obtenues avec les sondes 4-form et PSI.

L'observation d'une expression par les neurones du cortex au 7^{eme} jour postnatal est en accord avec l'observation de neurones exprimant le gène LacZ sous la dépendance du promoteur de phosphacan/RPTP β dans le cortex au 7^{eme} jour postnatal (Shintani et al. 1998). L'observation de l'expression du gène rapporteur a été interprétée comme correspondant à une expression de RPTP β par les neurones. Cette interprétation est appuyé par l'observation d'un marquage avec l'anticorps 6B4 (qui reconnaît toutes les isoformes de phosphacan/RPTP β) localisé sur la membrane des neurones corticaux en culture. Cependant, ce marquage pourrait être expliqué par l'interaction de phosphacan, secrété par les astrocytes en culture, avec des récepteurs membranaires.

Les hybridation *in situ* de Canoll et al. montrent que durant la période postnatal, phosphacan est exprimé dans les couches corticales, mais que RPTP β est exprimé par des cellules localisées dans la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux ; nous avons obtenu des résultats similaires (figure 13). Une sonde qui reconnaît les deux formes transmembranaires RPTP β montre dans des expériences d'hybridation in situ que l'expression des deux isoformes est restreinte autour des ventricules latéraux. Si l'analyse de l'expression du gène rapporteur LacZ sous la dépendance du promoteur de Phosphacan/RPTP β montre une expression neuronale, nous pensons, à la connaissance de nos propres travaux, que cette observation correspond à

l'expression de PSI. Nous excluons donc une expression RPTP β par les neurones corticaux et concluons que PSI est exprimé par les neurones dans le cortex postnatal.

5.3. Expression dans le cervelet

Dans le cervelet, les expériences d'immunohistochimie réalisées avec l'anticorps KAF13 montrent que phosphacan/RPTPß est distribué dans l'ensemble des structures. On observe une localisation dans la matière blanche, la couche granulaire en formation, la couche des cellules de Purkinje et dans la couche moléculaire (figure 11 A). L'observation par hybridation in situ réalisée avec les sondes 4-form et 3-form montre par contre une expression de Phosphacan/RPTPβ dans la couche de Purkinje, la couche granulaire interne et la substance blanche, mais pas dans la couche moléculaire (figure 11 C et E). La couche moléculaire, au stade développemental étudié, est formée de fibres de Bergmann, qui sont les prolongements radiaires des astrocytes dont les corps cellulaires sont localisés dans la couche de Purkinje. Les neurones en grains, qui proviennent d'une zone de prolifération située sous les méninges, migrent le long des fibres de Bergmann pour se positionner dans la couche granulaire interne. Nos résultats montrent que les neurones en grains en migration n'expriment pas RPTP β , puisque l'on observe pas de signal en hybridation in situ dans la couche moléculaire. L'observation de la protéine phosphacan/RPTPß pourrait correspondre soit à une diffusion de phosphacan dans la couche moléculaire, soit à une expression de RPTPß par les astrocytes localisés dans la couche de Purkinje et à une translocation de la protéine sur la membrane des fibres de Bergmann.

Les hybridation *in situ* utilisant la sonde spécifique de la nouvelle isoforme ne révélent aucun signal dans le cervelet (figure 11 G). Bien que PSI soit exprimé dans le cortex, elle n'est pas exprimée dans le cervelet, à l'opposé des autres isoformes.

Afin de confirmer la différence d'expression de PSI entre le cortex et le cervelet, des extraits protéiques de cortex et de cervelet de rats au 7^{ème} jour postnatal ont été analysés par western blot (figure 14). La présence d'une bande à 84kD dans les extraits protéiques du cortex confirme l'expression observée en hybridation *in situ*. La bande n'est pas retrouvée dans les extraits de cervelet, ce qui confirme que PSI n'est pas exprimé dans le cervelet durant la période postnatal. Comme cela a déjà été discuté (cf. 3.), PSI se trouve dans la fraction membranaire et

est absente de la fraction soluble. L'observation de la tenascine-C dans la fraction soluble et de NCAM dans la fraction membranaire permet de vérifier la qualité des extraits.

La différence d'expression observée entre le cortex et le cervelet est difficile à interpréter. Elle pourrait s'expliquer par la différence entre le développement entre le cortex et le cervelet. Dans le cortex postnatal, la migration des neurones est achevée et on peut considérer que les neurones sont dans un stade de maturation. Le développement du cervelet se fait plus tardivement, une migration neuronale et la croissance axonale des neurones en grains se situe durant la période postnatal. Il est possible que PSI ne soit exprimée que par les neurones en maturation, ce qui expliquerait l'absence d'expression dans le cervelet.

5.4. PSI est exprimée par les neurones en maturation

Des expériences d'immunohistochimie montrent une expression de phosphacan/RPTP β dans le neuroépithélium au 17^{ème} jour embryonnaire (figure 19). L'analyse du western blot réalisé sur des lysats de cerveaux à différents âges montre que phosphacan est exprimé dès le 16^{ème} jour embryonnaire. Par contre, PSI n'apparaît clairement qu'au premier jour postnatal (figure 7). Des expériences d'hybridation *in situ* réalisées sur des stades embryonnaires ne révélent pas d'expression de PSI (observation personnelle). Cette expression postnatale correspond à une expression neuronale observée par hybridation *in situ* (figure 11 et 12). PSI semble n'être exprimée par les neurones que pendant la période postnatale. Durant cette période, la migration neuronale et la croissance axonale des neurones corticaux est déjà achevée. PSI semble donc être exprimée par les neurones en cours de maturation, durant la période de myélinisation et de synaptogenèse.

6. PSI régule négativement l'effet promoteur de phosphacan

6.1. PSI présente dans le milieu de culture bloque les effets de phosphacan sur la croissance neuritique

En 1998, Peles et al. - en prenant l'exemple de F3/contactine qui interagit avec le Ng-CAM et la tenascine-C sur les boucles Immunoglobulines 1 et 2, et avec la tenascine-R et le phosphacan/RPTP β sur les boucles Immunoglobulines 2 et 3 - rappelaient que les molécules de la MEC étaient des ligands compétiteurs, et que cette compétition pouvait être un niveau de régulation important des fonctions de ces molécules.

La mise en évidence de l'isoforme PSI laisse supposer qu'un mécanisme analogue pourrait réguler les fonctions de Phosphacan et de PSI. Nous avons montré que Phosphacan et PSI ont des récepteurs communs (figure 8), et régulent la croissance neuritique avec des effets quantitatifs différents (figure 9 et tableau 1). Enfin, nous avons observé l'expression neuronale de PSI (figure 11 et 12). Nous pouvons donc supposer que les neurones pourraient réguler les effets de Phosphacan en secrétant PSI. Plus précisement, PSI, secrétée par les neurones, en interagissant avec les récepteurs L1 ou F3, pourrait empêcher l'interaction de phosphacan avec ces récepteurs et donc empêcher son action sur la croissance neuritique.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé un test de croissance neuritique. Un substrat de poly-ornithine seul (substrat minimum) est utilisé comme contrôle négatif, et un substrat de phosphacan comme contrôle positif. Les conditions de culture testées sont d'une part une culture où phosphacan et PSI sont utilisés comme substrat mixte, d'autre part une culture où phosphacan est utilisé comme substrat et PSI est présent dans le milieu de culture. Ces deux conditions de cultures sont répétées avec la GST à la place de PSI, afin de contrôler les effets non spécifiques de la GST, puisque PSI correspond dans l'expérience à une protéine de fusion couplée à la GST. L'ensemble des résultats sont présentés dans les figures 15 et 16.

On observe que phosphacan purifié augmente la croissance neuritique moyenne en comparaison au substrat minimum. Le substrat mixte de phosphacan et de PSI augmente la croissance neuritique de façon comparable à un substrat de phosphacan, par rapport au substrat neutre (figure 15).

Lorsque les neurones sont cultivés sur un substrat de phosphacan, avec PSI diluée dans le milieu, on observe une diminution significative de la croissance moyenne des neurites par rapport à celle observée sur un substrat de phosphacan. Une diminution est aussi observée avec la GST seule, mais la diminution est quantitativement moins grande. De plus, il y a une différence statistiquement significative entre la croissance neuritique sur substrat de phosphacan en présence de GST et en présence de PSI. Par conséquent, même si la GST montre un effet non spécifique, on observe bien une diminution significative de la croissance neuritique sur substrat de phosphacan de substrat de phosphacan en présence de PSI.

phosphacan en présence de PSI dans le milieu de culture. En comparaison à un substrat minimum, on observe une augmentation de la croissance neuritique sur un substrat de phosphacan ; cet effet est totalement annulé lorsque PSI est présente dans le milieu, ce qui n'est pas le cas lorsque la GST est présente dans le milieu (figure 17).

L'effet observé avec PSI diluée dans le milieu n'est pas observé lorsque PSI et le phosphacan sont présentés comme substrat mixte. Ce résultat peut s'expliquer si on considère que les deux protéines sont alors réparties sur la surface de culture et ne peuvent pas être en compétition pour un même récepteur et qu'elles sont toutes deux promotrices de la croissance neuritique. Cependant, la mobilité des protéines sur le substrat - qui consiste en des interactions avec la poly-ornithine – reste un paramètre mal défini des tests de croissance neuritique.

Nous pouvons donc conclure de cette expérience que PSI, lorsqu'elle est présente dans le milieu de culture, bloque l'effet promoteur de phosphacan sur la croissance neuritique. Ces résultats préliminaires semblent confirmer notre hypothèse d'une inhibition des effets de phosphacan par PSI par compétition pour des récepteurs communs.

6.2. Problèmes soulevés

6.2.1. Interaction homophilique entre PSI et phosphacan

La compétition pour des récepteurs communs est un mécanisme possible, mais il faut aussi envisager la possibilité d'une interaction homophilique. L'interaction homophilique entre phosphacan et PSI pourrait empêcher ceux-ci d'interagir avec les récepteurs. L'interaction homophilique entre les autres isoformes n'a jamais été montrée, mais l'interaction entre PSI et les autres isoformes n'a pas été testée. Une interaction homophilique entre PSI et Phosphacan pourrait en effet empêcher l'interaction de ceux-ci avec les récepteurs neuronaux. Cependant, si une interaction homophilique entre PSI et phosphacan était possible, et/ou si celle-ci empêchait l'interaction des protéines avec les récepteurs neuronaux, on devrait observer une différence significative entre le substrat de phosphacan et le substrat mixte, puisque des interactions homophiliques neutraliseraient phosphacan et PSI lors de la préparation du substrat. Cependant, il est aussi possible que l'élément GST, couplé à PSI, empêche cette interaction.

6.2.2. Quel récepteur est impliqué ?

Des expériences pourraient être réalisées afin de déterminer le type de récepteur impliqué dans la régulation de la croissance neuritique. On sait que Phosphacan et PSI interagissent avec F3/contactine et L1, et que ces récepteurs sont exprimés par les neurones corticaux en culture (figure 18). L'utilisation d'anticorps dirigés contre ces récepteurs dans les tests de croissance neuritique permettrait de déterminer si F3, ou L1, ou les deux récepteurs, interviennent dans la promotion de la croissance neuritique par phosphacan.

6.2.3. Expression neuronale de PSI en culture

Un autre élément inconnu dans cette expérience est l'expression d'isoformes par les neurones eux-mêmes. Des expériences d'immunocytochimie ne révélent pas d'expression de PSI par les neurones en culture (observation personnelle avec l'anticorps KAF13). Cependant, PSI étant une protéine secrétée, ce résultat négatif ne permet pas de conclure à l'absence d'expression de PSI. Il faudrait réaliser des western blots sur des lysats de neurones issus de culture afin d'observer la présence ou l'absence de PSI. Pour réaliser ces lysats, les cultures devraient être faites en présence d'un antimitotique comme l'Ara-C afin d'éliminer les astrocytes potentiellement présents. En parallèle, une culture non traitée à l'Ara-C devrait être testée pour vérifier que l'expression de PSI par les neurones n'est pas sous la dépendance de facteurs astrocytaires.

L'analyse des résultats présentée dans la partie 5. montre cependant que les neurones du neuroépithélium embryonnaire n'expriment pas PSI. Par conséquent, il est probable que les neurones corticaux en culture qui proviennent d'embryon au 17 ème jour n'expriment pas PSI.

7. Proposition d'un modèle expliquant les fonctions de PSI dans le cortex postnatal

Les résultats apportés par nos études permettent de proposer un modèle expliquant le rôle que pourrait jouer PSI dans la régulation de la croissance axonale (figure 20).

7.1. Durant le développement embryonnaire, phosphacan participe à la régulation de la croissance axonale

Phosphacan pourrait participer à la promotion de la croissance axonale dans le développement embryonnaire. En effet, phosphacan est présent dans le neuroépithélium (figure 19) et augmente la croissance neuritique des neurones corticaux en culture (figure 9 et tableau 1). Phosphacan interagit avec les récepteurs F3 (Peles et al., 1995) et L1 (Milev et al., 1994) qui sont exprimés par les neurones corticaux (figure 18) et participent à la régulation de la croissance axonale. Durant cette période, PSI n'est pas exprimée (figure 7).

7.2. Durant la période postnatale, les neurones bloquent l'action de phosphacan en exprimant PSI

Durant la période postnatale, phosphacan est présent dans le cortex (figure 11 E) et les neurones expriment PSI (figure 11 et 12). La présence de PSI bloque les effets de phosphacan sur la croissance neuritique des neurones corticaux (figure 17). Comme PSI interagit avec F3 et L1 (figure 8), PSI est un ligand compétiteur de phosphacan. Il est probable que PSI empêche l'action de phosphacan en bloquant les séquences d'interaction de F3 et L1 pour phosphacan.

7.3. Mécanismes moléculaires potentiels

Il peut paraître paradoxal que PSI diluée dans le milieu inhibe l'effet promoteur de phosphacan, alors que PSI utilisée comme substrat est promoteur de la croissance neuritique. Une telle observation a été faite pour la tenascine-C et la laminine. Il a ainsi été montré que la tenascine-C est promotrice de la croissance neuritique lorsqu'elle est présentée comme substrat, mais une inhibition de la croissance est observée lorsque la tenascine-C est présente dans le

milieu de culture (Lochter et al., 1991). Une explication pourrait venir du fait que la croissance neuritique nécessite une adhésion au substrat du cône de croissance (cf. chapitre 6 de l'introduction) ; en présence de protéine diluée, le cône de croissance pourrait interagir avec la protéine mais cette interaction ne pourrait pas avoir un effet sur le cytosquelette qui permette la progression du cône de croissance. Cette hypothèse permettrait aussi d'expliquer pourquoi PSI est promotrice de la croissance lorsqu'elle est présentée comme substrat et inhibitrice de la croissance lorsqu'elle est diluée dans le milieu de culture. Cette hypothèse peut aussi s'appliquer aux effets cités pour la tenascine-C.

Une hypothèse alternative doit cependant être considérée. Il est possible que phosphacan n'agisse pas sur le cytosquelette mais corresponde à un signal instructeur qui favorise la promotion de la croissance du neurite. La présentation d'une protéine dans le milieu de culture pourrait activer des récepteurs localisés sur l'ensemble de la surface cellulaire. L'interaction avec des récepteurs sur la surface cellulaire pourrait entraîner une activation de signaux non localisés au niveau du cône de croissance et perturber la mise en place de la polarité du neurone, donc aboutir à une inhibition de la croissance. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'un substrat de laminine entraîne une différentiation morphologique des neurones (présence d'un long axone et de dendrites) alors qu'en présence de laminine diluée dans le milieu de culture les neurones ont une morphologie primaire (une seule neurite courte est observée). Cependant, une observation exactement inverse est faite avec la fibronectine (Chamak et Prochiantz, 1989).

Contrairement au cas de la tenascine-C et de la laminine, les effets de PSI pourraient être corrélés avec les observations physiologiques. En effet, phosphacan semble exprimé par les cellules gliales et PSI est exprimée par les neurones. Phosphacan est une protéine de la MEC, alors que PSI est secrétée mais reste liée à la membrane plasmique. Il semble donc que PSI ne soit pas integrée au complexe moléculaire formé par les protéines de la MEC ; ceci pourrait impliquer qu'elle n'est pas la possibilité d'agir sur le cytosquelette comme phosphacan pour permettre la croissance neuritique.

8. Conclusions et perspectives

La mise en évidence d'une quatrième isoforme de Phosphacan/RPTPß oblige à une réinterprétation des données de la littérature concernant les fonctions et mécanismes d'action de Phosphacan.

8.1. Les neurones en maturation bloquent l'action de phosphacan en secrétant PSI

Les résultats présentés nous permettent de proposer un modèle expliquant une fonction de PSI. Durant le développement embryonnaire, phosphacan est exprimé et participe à la régulation de la croissance axonale en interagissant avec les récepteurs L1 et F3. Dans la période postnatale, les neurones en maturation expriment PSI qui pourrait interagir avec les récepteurs L1 et F3 pour bloquer l'action de phosphacan sur les neurones.

L'expression du récepteur TAG-1/axonine-1 par les neurones corticaux n'as pas été étudiée. La présence de ce récepteur sur la membrane des neurones apporterait un niveau de régulation supplémentaire, puisqu'il interagit avec les chaîne glycosaminoglycans de phosphacan et n'interagit donc pas avec PSI. Ainsi, PSI pourrait bloquer l'interaction de phosphacan avec L1 et F3, et phosphacan n'interagirait plus qu'avec TAG-1. PSI pourrait donc non pas bloquer, mais modifier l'action de phosphacan sur les neurones.

8.2. PSI pourrait participer à la régulation de la myélinisation

PSI est exprimée durant la période postnatale, lorsque les précurseurs d'oligodendrocytes issus des zones ventriculaires migrent dans le SNC pour myéliniser les axones. La myélinisation est un processus qui inclut la formation du nœud de Ranvier. Cette étape du développement est notamment régulée par les protéines de la MEC (cf. chapitre 5.4. de l'introduction).

PSI pourrait participer à la régulation de la localisation de F3 dans le nœud de Ranvier. Il a été montré que localisation de F3 dans le noeud de Ranvier est perturbée en présence de protéines de fusion correspondant au domaine CAH de Phosphacan (Rios et al., 2000), et ce domaine est présent dans la séquence de PSI. Par conséquent, une expression neuronale de PSI pourrait apporter un élément de régulation supplémentaire.

PSI pourrait aussi participer à la modulation de l'activité des canaux sodiques, principalement localisés dans le nœud de Ranvier. En effet, le domaine CAH de RPTP β interagit avec la sous-unité α des canaux sodiques (Ratcliffe et al., 2000) (cf. chapitre 5.5. de l'introduction) ; PSI étant une protéine exprimée par les neurones (figure 12) et associée à la membrane plasmique (cf. 3.), elle pourrait interagir avec les canaux sodiques via le domaine CAH.

L'étude de phosphacan/RPTPβ dans la formation des nœuds de Ranvier et les défauts de myélinisation observés chez les souris déficientes pour le gène codant phosphacan/RPTPβ devrait être changée à la lumière de l'existence de la nouvelle isoforme PSI.

Manuscrit 5

"Phosphacan Short Isoform, a novel nonproteoglycan variant of phosphacan/RPTP-β,
that can also interact with neuronal receptors and promote neurite outgrowth"

Jeremy Garwood, Nicolas Heck, Frank Reichardt et Andreas Faissner

Manuscrit accepté pour publication dans *Journal of Biological Chemistry*

JBC Papers in Press. Published on April 16, 2003 as Manuscript M211721200 - 1 -Phosphacan Short Isoform

Phosphacan Short Isoform, a novel non-proteoglycan variant of phosphacan/RPTP- β , interacts with neuronal receptors and promotes neurite outgrowth.

Jeremy Garwood, Nicolas Heck, Frank Reichardt¹, and Andreas Faissner²

Laboratoire de Neurobiologie du Développement et de la Régénération, CNRS Centre de Neurochimie, 67084 Strasbourg, France,

¹Max Planck Institute for Medical Research, 69120 Heidelberg, Germany,

²Department of Cell Morphology and Molecular Neurobiology, Ruhr-University, 44780 Bochum, Germany.

Author to whom correspondence and proofs should be sent:

Dr. J. Garwood

Telephone: +33-3 88 45 66 53. Fax: +33-3 88 41 17 80.

e-mail: garwood@neurochem.u-strasbg.fr

Running title: Phosphacan Short Isoform

Summary

Phosphacan, one of the principal proteoglycans in the extracellular matrix of the central nervous system, is implicated in neuron-glia interactions associated with neuronal differentiation and myelination. We report here the identification of a novel truncated form of phosphacan, Phosphacan Short Isoform (PSI), that corresponds to the N-terminal carbonic anhydrase- and fibronectin typeIII-like domains, and half of the spacer region. The novel cDNA transcript was isolated by screening of a neonatal brain cDNA expression library using a polyclonal antibody raised against phosphacan. Expression of this transcript in vivo was confirmed by Northern blot hybridisation. Analysis of brain protein extracts reveals the presence of a 90 kD glycosylated protein in the PBS-insoluble 100,000g fraction which reacts with antisera against both phosphacan and a recombinant PSI protein, and that has the predicted N-terminal sequence. This protein is post-translationally modified with oligosaccharides, including the HNK-1 epitope, but, unlike phosphacan, it is not a proteoglycan. The expression of the PSI protein varies during CNS development in a fashion similar to that observed for phosphacan, being first detected around E16 and then showing a dramatic increase in expression to plateau around the second week postnatal. Both the native and recombinant PSI protein can interact with the IgCAMs, F3/contactin and L1, and in neurite outgrowth assays, the PSI protein can promote outgrowth of cortical neurons when used as a coated substrate. Hence, the identification of this novel isoform of phosphacan/RPTP- β provides a new component in cell-cell and cell-ECM signaling events in which these proteins have been implicated.

Introduction

Differentiation and morphogenesis of neural tissues involve a diversity of interactions between neural cells and their environment (1). Although the organisation of the extracellular matrix (ECM) in the vertebrate central nervous system (CNS) is not well understood it is marked by the relative abundance of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) and hyaluronan (2,3).

Previously we have characterised DSD-1-PG, one of the more abundant of the soluble CSPGs in the postnatal brain, showing this to be the mouse homolog of phosphacan, and demonstrating that it can have opposing effects upon neurite outgrowth according to the neuronal lineage (4,5).

Although phosphacan occurs in the CNS as a large CSPG (>800 kD; (4), it is in fact a secreted splice variant of an even larger transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP), RPTP- β (6); also known as PTP- ζ (-zeta); (7). Hence phosphacan corresponds to the entire extracellular part of the long RPTP- β receptor (the relative structures of the proteins are illustrated in Figure 1). These proteins are characterised by a carbonic anhydrase-like (CA) domain at their extracellular N-terminus. A third splice variant, the short RPTP- β receptor form, contains the same intracellular phosphatase domains as the long receptor but, unlike phosphacan and the long RPTP- β , it is distinguished by the absence of a 850 aa highly glycosylated sequence, the IS region, which possesses many of the predicted glycosaminoglycan (GAG) attachment sites.

In the CNS, phosphacan and the RPTP- β receptors have punctual spatiotemporal expression patterns which suggest potential roles for these proteins in various developmental processes, including cell migration(8), differentiation(9), synaptogenesis(10), synaptic function(11), and myelination(12) (13), and phosphacan is also upregulated upon wounding and regeneration in the CNS (14-16).

In vitro functional studies have provided evidence for such roles in the development and maintenance of the CNS, and there have been a number of reports of the effects of phosphacan on process outgrowth from neuronal cultures. These have shown that the proteoglycan can either promote or inhibit neurite outgrowth dependent upon the neuronal type tested and the conditions under which it is presented. For example, we have previously shown that phosphacan has outgrowth-promoting properties on mesencephalic and hippocampal neurons (4), whereas it is inhibitory for laminin-promoted outgrowth from neonatal dorsal root ganglion (DRG) explants (5).

Biochemical studies have demonstrated a number of potential binding partners for phosphacan, both in the ECM, such as the tenascins, TN–C (17,18) and TN–R (19), and on the cell surface, such as the immunoglobulin cell adhesion molecules (IgCAMs), F3/contactin (20), and NrCAM (21). In addition, a number of growth factors can bind to phosphacan, including bFGF (22) and HB-GAM (19). Interaction sites on phosphacan have been characterised at three levels (13): firstly, there are the long negatively-charged CS GAG polymer chains, which can bind, for example, to TAG-1/Axonin-1(23), and the cytokines, amphoterin(19), midkine(24), and HB-GAM/pleiotrophin(19,25). Secondly, on the core glycoprotein, there are other classes of glycosylation, represented by oligosaccharides carrying epitopes such as HNK-1 (sulfated glucuronic acid), and Lewis-X (sialyl-Lewis-X)(5), which have also been implicated in IgCAM interactions (17). Thirdly, there is the primary protein sequence, which includes the CA, and a fibronectin type III-like (FNIII), domain, but the remaining 80% of the molecule bears no strong homology to other characterised protein database structures.

Here we report the identification and characterisation of a novel short isoform of phosphacan. This new isoform corresponds to the first third of phosphacan, and although it is glycosylated, it is not a proteoglycan. It is not as readily extracted from brain tissue as phosphacan, perhaps due to stronger interactions with the cell surface. A recombinant protein

- 5 - Phosphacan Short Isoform

corresponding to the new isoform sequence can, like phosphacan, also promote neurite outgrowth from cortical neurons. Hence regulated expression of this protein may introduce an extra level of complexity to the proposed functional interactions of phosphacan and the RPTP- β receptor forms during CNS development and regeneration.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies

Monoclonal antibody (mAb) 473HD is a rat IgM antibody directed against the chondroitin sulfate DSD-1 epitope (4,26); 324 is a rat IgG against the cell adhesion molecule L1 (27), 412 is a rat IgG recognizing both sulfated and non-sulfated epitopes of the HNK-1 carbohydrate (28). Mouse mAb 4-121 against chick F11 cross-reacts with mouse F3/contactin (29), and was provided by F. Rathjen (Max Delbruck Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany). 3F8 is a mouse mAb against rat phosphacan (9,30) which cross-reacts with mouse phosphacan (5) and it is available from the Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242).

Polyclonal sera were all from rabbit: KAF13 was raised against the purified DSD-1-PG (4), and has been used to clone all forms of RPTP- β from mouse brain expression libraries (5); KAF14 was raised against purified tenascin-C (TN-C) from post-natal mouse brains (31); polyclonal F3/contactin-1367 was raised against amino acids 37–50 (peptide KGFG-PIFEEQPINT) of F3/contactin coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) (32); anti-PSI was raised against the purified recombinant GST-PSI protein described below using standard immunisation protocols (4).

Antibody Screening of cDNA expression libraries

A mouse brain cDNA expression library was screened using the polyclonal Ab, KAF13, at 1 μ g/ml, as described previously (5). The library used was BALB c neonatal whole brain Oligo(dT) and random-primed Uni-ZAP XR 1 (Stratagene GmbH, Heidelberg, Germany). Screening 3 x 10⁶ recombinant phages, yielded four positive clones, corresponding to bases 1144-1509 and 1032-3591 of phosphacan / long RPTP- β and 1186-7850 of short RPTP- β . The fourth cDNA clone contained the truncated ORF corresponding to a shorter form of

phosphacan. This begins at base 1276 and ends with a termination codon at 1792. This is followed by a 3'-UTR of 1988 bases. A Marathon cDNA amplification kit (Clontech, Heidelberg, Germany) was used to generate P0 and P7 total mouse brain cDNA libraries from 1 μ g poly(A)⁺ RNA. Using PCR amplification of this cDNA, bands from the ORF to 3'-UTR were cloned and sequenced (sense primers:- 1: 5' ATG CGA ATC CTG CAG AGC TTC CTC, 1700: 5' GCC TCC TTA AAC AGT GGC T; antisense primers:- 1891: 5' CTA TCC AGC TGA AGA GTC ATC GGC, 2120: 5' ACT TAG AAC TGG TGC GGA C).

Northern blot analysis

Poly(A)⁺RNA was prepared from 1g of mouse brain from different developmental stages using a Fast-Track 2.0 mRNA Isolation Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). It was separated on formaldehyde/1% agarose gels, then blotted by capillary action onto Hybond Nylon-Membrane (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Germany). Blots were pre-hybridised for 1 hr, and then hybridised overnight, at 50°C for DNA probes, and at 65°C for riboprobes. Prehybridisation was in hybridisation buffer without probe (7% SDS, 50% deionised formamide, 5x SSC, 50mM sodium phosphate pH7, 0.1% N-lauroyl sarcosine, 2% blocking reagent (Roche Diagnostics, Meylan, France)). Washing for DNA probes was in three changes of wash buffer (40mM sodium phosphate pH7.2, 1% SDS, 1 mM EDTA) at 68° C for 40 minutes, and for riboprobes, at 65° C, 2 x 5 mins in 2x SSC (where 1x SSC = 0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH7), and in 0.1x SSC, 3 x 15 mins. Signals were revealed with Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Germany) and amplifying screens at -80° C. The DNA probe for the 5'-ORF of all RPTP- β isoforms (1-1785; Figure 1) was labelled with ³²P-dCTP by random priming. Due to homology in the 3'-UTR with the complementary 28S rRNA sequence, it was not possible to employ a DNA probe without a strong cross-reaction with rRNA since sequences from the sense strand hydridise to 28S rRNA. Hence, it was necessary to employ an antisense riboprobe which only

hybridised to the sense strand of the PSI transcript. This corresponded to bases 2653-3784 of the 3'-UTR of the PSI transcript and was synthesized with incorporation of radioactive α -³⁵S-UTP (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Germany) using T7 RNA polymerase (MBI Fermentas GmbH, St Leon Rot, Germany) and the linearised pBluescript II plasmid (Stratagene GmbH, Heidelberg, Germany) containing the PSI cDNA. A riboprobe against β -actin was used as an indicator of relative RNA concentrations (bases 739-970).

Tissue fractionation

P7 mouse brains were homogenised in different buffers to test the efficiency of different extraction conditions. Protease inhibitors were used throughout (1mM PMSF; 1 μM Trypsin Inhibitor; 0.1μM Aprotinin; 1μM Pepstatin; 5μM Leupeptin; 1μM Antipain; 1mM Benzamidine; 1mM EDTA). Initially, 20 brains were homogenised in PBS on ice with a mechanical dounce. Nuclei and insoluble debris were removed by centrifugation at 600g for 20 mins. Half of this supernatant was detergent-solubilised by addition of 1% NP40 and mixing at 4°C for 1 hr. The remaining 600g PBS supernatant was ultracentrifuged at 100,000g for 1 hr at 4°C to precipitate PBS-insoluble material including total cellular membranes. This PBS-insoluble pellet was subsequently resuspended in 1% NP40/PBS. As an alternative to detergent-solubilisation with NP40, 10 brains were homogenised in 60mM n-octyl-β-D-glucopyranoside, 50mM Tris pH8, 50mM sodium acetate, then centrifuged at 100,000g for 1 hr at 4°C. Finally, for urea extraction, 10 brains were homogenised in 8M urea, 10mM sodium acetate pH6, and then centrifuged at 100,000g for 1 hr at 4°C. Protein determination used the DC Assay kit (Bio-Rad SA, Creteil, France).

Deglycosylation studies

Protein fractions were incubated for 4 hrs at 37° C in 40mM Tris pH8, 40mM sodium acetate with 0.4 U/100µg peptide-N-glycosidase F (EC 3.5.1.52, Roche Diagnostics, Meylan,

France), 2mU/100μg keratanase (endo-β-galactosidase, EC 3.2.1.103, Seikagaku Kogyo, Tokyo), or 20mU/100μg chondroitinase ABC lyase (EC4.2.2.4, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany).

Partial Protein Purification and Protein sequencing

Fifty P7 mouse brains were homogenised in 1% NP40/PBS (10mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄-2H₂O, pH 7.4, 150mM NaCl) in the presence of protease inhibitors (1mM PMSF, 1.5 µM antipain, 1µM ortho-phenanthroline, 1µM pepstatin, 1µM aprotinin, 1µM leupeptin, 1mM benzamidine, 2mM EDTA). The homogenate was centrifuged at 20,000g for 15mins at 4° C, then ammonium sulphate was added to the supernatant to a final concentration of 1.5M (35% saturation). Precipitated proteins were removed by centrifugation at 20,000g for 1 hr at 4° C followed by filtration through 0.45µm filter units. This supernatant was loaded onto a Methyl HIC (hydrophobic interaction chromatography) column (Bio-Rad SA, Creteil, France) in a Biologic Duo-Flow gradient chromatography system (Bio-Rad SA, Creteil, France), equilibrated with 1.5M AmSO₄/PBS. The column was washed until the baseline was attained and then eluted with a linear gradient from 1.5M to 0M AmSO₄/PBS. The 90kD protein eluted at around 1M AmSO₄. The eluate was diluted by addition of 2xbinding buffer (20mM Tris pH7.4, 0.5M NaCl, 1mM MnCl₂, 1mM CaCl₂) and then loaded onto a Concanavilin A-Sepharose affinity chromatography column (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Germany). The column was washed with 20 volumes of binding buffer before being eluted with elution buffer (0.5M methyl- α -D-mannopyranoside, 20mM Tris pH7.4, 0.5M NaCl). Sample buffer was added to this eluate which was then separated on 10% SDS-PAGE. The proteins were transferred by electroblotting onto ProBlott PVDF membrane (Applied Biosystems SA, Courtaboeuf, France). Bands were revealed by Ponceau Red colouration and the 90kD band was confirmed by alignment with an adjacent strip which was revealed using
immunodetection with pAbs KAF13 and anti-PSI. The N-terminal protein sequence of the 90kD KAF13-positive band was determined by automatic Edman degradation on an Applied Biosystems 473A microsequencer.

Developmental expression blot

Whole brains from mice at different developmental stages were homogenised on ice in PBS with protease inhibitors. The homogenate was centrifuged at 600g for 20 mins at 4°C, then the supernatant was further centrifuged at 100,000g for 1 hr at 4°C. The pellet was resuspended in PBS/20mM n-octyl- β -D-glucopyranoside with protease inhibitors.

Preparation of recombinant PSI protein

The recombinant PSI protein was generated by expression in E.coli of a plasmid vector containing the PSI cDNA sequence fused in frame to glutathione-S-transferase (GST). The PSI cDNA was amplified by PCR using primers 5'-ATG CGG ATC CTG CAG AGC TTC C (which introduces a BamH1 restriction site just after the initiation codon by changing the 'A' at the sixth base into a 'G') and 5'-CTA TCC AGC TGA AGA GTC ATC GGC (which includes the termination code in the PSI transcript). The PCR cDNA product was purified from an agarose gel and digested with BamH1 before being ligated into the plasmid vector, pGEX-5X-3 (Amersham-Pharmacia), which had been pre-digested with the restriction endonucleases, BamH1 and SmaI. Competent E.coli cells (TOP10F'; InVitrogen) were transformed and clones selected. The correct insertion of the PSI cDNA sequence into the vector was verified by DNA sequencing of the entire construct. For recombinant protein expression, the plasmid-bearing bacterial clone was grown in Luria-Bertani broth supplemented with 50µg/ml ampicillin at 37°C to an OD595nm of 0.8, when protein expression was induced by addition of IPTG to a final concentration of 0.05mM and the culture was transferred to 24°C for a further 3 hrs. Bacteria were pelletted, then lysed in

PBS/1% NP40 with 50µg/ml lysozyme. The PSI-GST recombinant protein was purified by affinity chromatography using a HiTrap glutathione column (Amersham-Pharmacia). The GST control protein was produced in the same way using bacteria transformed with the same plasmid vector but without insert.

GST pull-down

Purified GST and GST-PSI protein was incubated with glutathione-agarose beads ($2\mu g/10\mu l$ pre-swollen beads; Pharmacia) in PBS/1mM DTT/0.5% NP40 for 1hr at rt with mixing, and then washed three times with PBS. 20 μ l beads were incubated with the 1 mg ($2\mu g/\mu l$) P7 PBS-insoluble 100,000g brain fraction in PBS, 1mM DTT, 0.5% NP40, 0.5% n-octyl- β -D-glucopyranoside, 1mM EDTA, plus protease inhibitors at rt with mixing for 1hr, and then placed on ice for 30mins before washing with 3 x 1 ml ice-cold PBS. The beads were finally boiled in SDS-PAGE sample buffer and the proteins separated on 10% SDS-PAGE gels before transfer onto PVDF membrane.

Immunoprecipitation

Antibodies (2µg) were added to 2mg (2µg/µl) P7 mouse brain PBS-insoluble 100,000g fraction solubilised in 50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 40mM glucose, 1% n-octyl-β-D-glucopyranoside, 0.3% polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween20) plus protease inhibitors and incubated at 4°C with mixing overnight. Subsequently, 50µl 50% pre-swollen bead slurry was added for a further 1hr mixing at 4°C:- ProteinA-Sepharose (Sigma) was used to precipitate the rabbit polyclonal antisera, and Anti-Rat Ig-Sepharose (Sigma) was employed for the rat antibodies. The beads were then precipitated by centrifugation and washed by three rounds of resuspension and precipitation in RIPA buffer (TBS/1%NP40/0.1% SDS/0.5% deoxycholate) before being boiled in SDS-PAGE sample

buffer. Proteins were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane before immunodetection. For coimmunoprecipitation, the 100,000g PBS-insoluble mouse brain fraction solubilised in 50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 40mM glucose, 1% n-octyl-β-D-glucopyranoside, 0.1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate plus protease inhibitors was incubated with 2µg mAb 324 (anti-L1), or mAb 4-121 (anti-F3/contactin) overnight with mixing at 4°C. 50µl 50% slurry of anti-mouse IgG-Agarose (for anti-F3/contactin; Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) or anti-rat IgG-Agarose (for anti-L1; Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) were then added and incubated with mixing for 2 hrs at 4°C. The beads were precipitated by centrifugation and then resuspended and reprecipitated three times with 20mM Tris pH7.4 before being boiled with SDS-sample buffer. Eluted proteins were separated on 10% SDS-PAGE and electroblotted to PVDF membranes.

Phosphacan purification

Phosphacan was purified from detergent-free physiological saline buffered brain lysates from postnatal day 7 to 14 mice as described previously using a combination of affinity chromatography with the mAb, 473HD, bound to Sepharose resin, and anion-exchange chromatography (4). It was quantitated using the protein assay (Bio Rad Laboratories, Munich, Germany) and by the determination of uronic acid equivalents (33).

Cell Culture

Neuronal cell cultures were established from embryonic day 17 (E17) mouse brains. The cerebral hemispheres were dissected in PBS and the meninges removed. Dissociation was achieved by addition of 0.25% trypsin at 37°C for 10 min, followed by passage through a sieve with 48µm pores. The resulting cell suspension was plated on coverslips at a density of 7,000 cells/cm² in minimal Eagle's medium (MEM; Gibco-BRL, Life technologies, France)

supplemented with the N2 mixture, namely 5 μ g/ml insulin, 20 nM progesterone, 100 μ m putrescine, 30 nM selenite (34), 1 mM pyruvate, 0.1% (w/v) ovalbumin, and 100 μ g/ml transferrin (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). The cultures were kept in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

Neurite outgrowth assays

E17 mouse cortical neurons were plated on supports coated with different substrates: glass coverslips were treated with 15 µg/ml poly-L-lysine in 0.1 M borate buffer, pH 8.2, for 1 hr at 37°C. The coverslips were then washed with water and dried. Purified phosphacan (50µg/ml uronic acid equivalents) or recombinant proteins (50µg/ml) were coated for 4 hours at 37°C. After coating, the coverslips were washed three times with PBS. After 24 hrs of culture, neurons were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes. After permeabilization with 0.1% Triton X-100 for 3 mins. and a blocking step with 3% BSA in PBS, cells were stained with a mAb directed against the neuronal marker, β 3-tubulin (mouse; Sigma; 2 hrs. incubation in 3% BSA/PBS), then revealed with a cy3-conjugated antibody (goat anti-mousecy3; Jackson Labs; 30 mns. Incubation in 3% BSA/PBS). The coverslips were then mounted on slides in Mowiol. Neurons were observed using a DMRB microscope (Leica GmbH., Germany), pictures were taken with an axiocam camera (Zeiss GmbH., Germany). A first parameter considered was the fraction of process-bearing cells (with at least a process longer than one neuronal cell body) from at least 100 neurons per experiment, chosen at random. Subsequently the neurite lengths of the longest neurite on each process-bearing neuron was measured and morphometric analysis was performed using the ImageTool software (UTHSCSA; USA). Three independent experiments were performed and the data were analysed with the Kyplot software (Kyence Inc., Japan) using one-way ANOVA statistics $(\alpha=0.05)$, followed by a Tukey test.

Results

Antibody screening of brain cDNA expression libraries yields a novel splice variant of Phosphacan/RPTP-β

The cDNA corresponding to phosphacan was previously cloned from a mouse cDNA expression library using KAF13, a polyclonal antibody (pAb) raised against the entire proteoglycan purified from postnatal mouse brain (5). In addition to clones corresponding to phosphacan and the long and short receptor forms of RPTP- β , the antibody also recognises a clone expressing a novel truncated form of the extracellular domain.

In this cDNA clone, the open reading frame (ORF) is identical to the other three isoforms upto base +1787, but then terminates at +1792 with a stop codon (Figure 2). It encodes a protein of 597 residues. The ORF is followed by a 2 kb 3'-untranslated region (3' UTR) which has homology with rRNA sequences on the complementary strand, and finishes with a putative polyadenylation signal. This 3'-UTR is different from those for phosphacan and for the two RPTP- β receptor transcripts. The 5'end of the clone was confirmed by RT-PCR analysis employing primers from the 5'end and from the 3'-UTR to generate the complete ORF region.

By comparison with the three known splice variants of RPTP- β , the truncated protein, which we designate Phosphacan Short Isoform (PSI), represents 37% of phosphacan and the extracellular part of the long RPTP- β receptor form, and 78% of the extracellular portion of the short RPTP- β receptor (Figure 1). The PSI protein shares the same N-terminal region, with the signal peptide (first 23 residues) followed by the carbonic anhydrase-like (CA) and fibronectin type III (FNIII) domains present in the other forms plus an additional 188 residues of the S region. This latter region lies between the FNIII domain and the splice site for the short receptor form, which occurs at residue 762. The expression of the PSI transcript was investigated by Northern blot analysis of $poly(A)^{+}RNA$ from E15 and P0 mouse brains, detected with probes against the ORF and 3'-UTR regions (Figure 3). In addition to previously characterised bands at around 6.5 kb, 8 kb, and 9.5kb, corresponding respectively to the short RPTP- β receptor, phosphacan, and the long RPTP- β receptor transcript (35), a band is detected with the ORF probe at around 4 kb, which as predicted is also hybridised by the probe against the 3'-UTR of the PSI transcript.

In vivo expression of a protein corresponding to the Phosphacan Short Isoform Transcript

Previously, we have worked with phosphacan, the soluble secreted proteoglycan isoform of RPTP-β. This protein can be readily extracted from brain tissue using detergent-free physiological buffers (4). It was originally characterised by the presence of a chondroitin sulphate epitope, DSD-1, which is recognised by the mAb, 473HD (hence the original name, DSD-1-PG). As is shown in Figure 4a), most of the 473HD-bearing proteoglycan is present in the PBS-soluble 100,000g supernatant (Mr>500kD), although there is also material in the PBS-insoluble 100,000g pellet fraction, which contains all of the cell membranes. This protein band corresponds to the transmembrane, long RPTP-β receptor form, which contains the whole of the phosphacan sequence in its extracellular half and is also a CSPG. Analysis of these brain extracts with an antibody against tenascin-C (TN-C) (Figure 4c), another major component of the neural ECM, reveals a similar profile, the majority of the secreted glycoprotein being extracted with PBS.

KAF13, the anti-phosphacan pAb employed for the expression cloning of the PSI cDNA was used to analyse Western blots of these brain extracts for the corresponding protein (Figure 4b). Phosphacan and the long RPTP- β are visualised as large proteoglycan species (>500kD) in the PBS-soluble and insoluble fractions respectively. Protein species around 250kD and 200kD are present in all fractions, although these are considerably larger than the

size of the predicted PSI protein (67kD), and since they are present in the PBS-soluble fraction, they are unlikely to correspond to the short RPTP- β transmembrane receptor form. Instead it has been suggested that they represent less glycosylated forms of the phosphacan core protein (36). Based on its amino acid sequence, the PSI protein should be secreted into the extracellular environment, but there was no evidence of a smaller protein species <180kD recognised by pAb KAF 13 in this fraction. However, a smaller KAF 13-positive protein band around 90kD was detected in brain tissue extracted with detergent and urea-containing buffers (open arrow). This 90kD protein could be extracted with the detergents, NP40 or octylglucoside, but was absent from the PBS-soluble fraction, being precipitated by centrifugation at 100,000g. It was also possible to extract this 90kD protein with urea, suggesting that it was associated with the PBS-insoluble fraction, which includes the cell membranes, through non-lipid molecular interactions. Sequence analysis using several computer logarithms (e.g. Prosite(37) and GPI Modification Site Prediction(38)) did not indicate the presence of any known lipid-binding domains in the PSI protein. In addition, F3/contactin, a receptor protein which is associated with the cell membrane through lipid interactions (GPI anchor) was also found in the detergent extracts and the PBS-insoluble 100,000g fraction but, unlike the 90kD protein, it was not found in the urea extract (Figure 4d).

The 90 kD PSI protein is glycosylated but it is not a proteoglycan

To further test whether the 90 kD protein corresponds to the PSI cDNA, the presence of glycosylation was investigated using glycosidases (Figure 5). To determine the presence of GAG chains, protein fractions were treated with GAG lyases. Digestion of the PBS-insoluble 100,000g fraction with Chondroitinase ABC (ChABC) removes the CS GAGs from the CSPGs. The "core protein" of the long RPTP- β receptor form, recognised by pAb KAF 13 (indicated by a bar in Figure 5), now migrates as a smaller, although still heavily glycosylated, species around 300-400kD. The mAb, 3F8, recognises an epitope on phosphacan and the long RPTP- β receptor (but not on a keratan sulfate variant of phosphacan, called phosphacan-KS, (6,9,30) nor on the short RPTP- β receptor(39)) and detects both the undigested long RPTP- β receptor at the top of the separating gel, and the "core protein" of long RPTP- β following digestion of the CS GAGs with ChABC (presumably the 3F8 epitope is to some extent masked by the CS GAGs since the signal is much stronger for the core protein), but it does not detect any other protein in this fraction. Hence, the PSI protein does not seem to bear the 3F8 epitope. Keratanase digestion (to remove KS GAG chains) does not appear to result in any significant deglycosylation of the long RPTP- β receptor. Meanwhile the 90 kD protein (arrow) detected with KAF13 shows no shift on either ChABC or keratanase treatment, and hence, as predicted for PSI, it does not appear to be a proteoglycan. However, the presence of other carbohydrate modifications on PSI is probable since the Nterminal region of phosphacan is glycosylated (17)(Milev et al., 1995), and there is a difference between the migration of the 90 kD protein on SDS-PAGE and the calculated size from the primary PSI sequence (around 67 kD). To test for the presence of N-linked carbohydrates, the membrane fraction was treated with peptide-N-glycosidase F. As expected, this results in a significant reduction in the size of the 90 kD protein detected by KAF13 by around 15-20 kD, indicating that the 90 kD band is indeed a glycoprotein (Figure 5). This indicates that without sugars, the 90kD protein migrates at around 70kD which would be the expected size of the PSI protein sequence. A weaker band around 190kD is also shifted down by N-glycosidase F treatment and may correspond to the short RPTP- β receptor form which is not a proteoglycan and does not carry the 3F8 epitope, but does contain the entire PSI sequence in its extracellular part.

In order to further confirm the identity of the 90kD protein, a new polyclonal antisera was raised against a bacterially expressed recombinant PSI protein. This anti-PSI sera also clearly recognised the 90kD protein detected by the anti-phosphacan sera, KAF13 (Figure 6a).

In addition, it appears that the HNK-1 carbohydrate epitope is also present on the 90kD protein. This sugar has been found on a range of extracellular proteins in the CNS, including CAMs, TN-C and TN-R, and we have previously shown it to be present on phosphacan (5). As further confirmation of the recognition of the 90kD HNK-1 positive protein by the anti-phosphacan and anti-PSI sera, immunoprecipitation experiments were performed. These showed that both the anti-phosphacan and anti-PSI sera recognised the 90kD protein precipitated from brain extracts by the anti-HNK-1 mAb, and that the 90kD band precipitated by both anti-PSI and anti-phosphacan carried the HNK-1 epitope (Figure 6b). Hence, the 90kD band precipitated by HNK-1 is recognised by both anti-phosphacan and anti-PSI, while HNK-1 recognises the 90kD protein precipitated by both of these polyclonal sera.

Purification and protein analysis confirms the identity of the 90kD band as Phosphacan Short Isoform.

To confirm the identity of the 90kD protein band, it was further enriched from brain detergent extracts, and protein sequence was obtained. Given the presence of the other splice variants of phosphacan/RPTP- β , which share common epitopes with PSI, it was necessary to follow the purification steps by Western blot analysis of fractions using both pAb KAF 13 and anti-PSI. Following a series of pilot assays, a relative enrichment of the 90 kD protein was obtained using a combination of hydrophobic interaction and Concanavalin A lectin-affinity chromatography. The protein was finally separated on SDS-PAGE and transferred to sequencing grade PVDF membrane. Based on alignment with the KAF 13-positive band, the 90 kD protein corresponding to the candidate isoform was excised and subject to Edman degradation which yielded an N-terminal sequence: xxRQQRKLVEEI. This corresponds to the predicted start of all of the RPTP- β splice variants following cleavage of the 23 amino acid signal peptide (6). Thus, in conclusion, we have found a protein which has the biochemical properties predicted for the protein product of the PSI transcript.

Developmental expression of the Phosphacan Short Isoform protein

A developmental profile of PSI protein expression in mouse brain indicates that it is already present by E16 and that, like phosphacan (5,40), its expression levels rise steadily to plateau in the first and second weeks post-natal, before decreasing a little in the adult (Figure 7). This peak of expression correlates with the phase of myelination in the developing CNS, a process in which phosphacan/RPTP- β has been implicated (12,41,42). There are several other bands seen on the blot at higher molecular masses (around 180 kD, and >400kD). These could correspond to the receptor forms of RPTP- β which may also show developmental regulation, both with respect to their relative levels of expression and also in terms of the degree of glycosylation present on the core proteins (5,40).

Binding partners for Phosphacan Short Isoform

The association of the secreted PSI protein with the PBS-insoluble 100,000g brain fraction suggests that it is complexed with material in this fraction. The 100,000g fraction contains all of the cellular membranes and hence it is possible that PSI is retained in this fraction due to interactions with membrane-bound receptor proteins. A number of neuronal receptor proteins have already been identified for phosphacan, including the Ig-CAMs:- NCAM, NrCAM, L1/NgCAM, (19,21) F3/contactin (20), and TAG-1/axonin-1 (23). In addition, studies with recombinant protein constructs corresponding to different parts of the phosphacan protein sequence have shown that the CA domain can bind to F3/contactin (20), and can also be immunoprecipitated as a complex with a third transmembrane protein, Caspr (42), while the S region upto residue 630 binds to NCAM, NrCAM, and L1/Ng-CAM (21). Since the PSI protein sequence contains the entire CA and FNIII domains, and 188 of the 223 amino acids (84%) of the S region used in the mapping studies, a similar interaction profile might be expected. Immunoprecipitation studies of brain membrane extracts suggest that the PSI

protein can indeed be co-precipitated with L1 and F3/contactin (Figure 8a). Further evidence for such interactions came from binding experiments with a recombinant PSI protein. The PSI protein was expressed as a glutathione-S-transferase (GST) recombinant construct in E. coli, and attached to glutathione-agarose beads prior to incubation with mouse brain extracts. After washing the beads, the proteins which had been "pulled-down" were assessed on Western blots. These showed that, compared to the GST control protein, there was an interaction of the GST-PSI protein with both F3/contactin and L1 (Figure 8b). Hence, these results confirm the previous reports of interactions between the N-terminal domains of phosphacan/RPTP- β and the IgCAMs, F3/contactin (20) and L1 (21), and support the possibility that, in addition to phosphacan and the extracellular domains of the receptor forms of RPTP- β , the PSI protein might also interact in vivo with such cell membrane receptor molecules. In addition, these results indicate that the interactions between the PSI protein and these cell adhesion molecules can occur in the absence of glycosylation.

PSI recombinant protein and phosphacan promote neurite outgrowth from cortical neurons

One of the most studied functional effects of phosphacan has been its influence upon process outgrowth from neurons, a process which it may influence as an ECM component in differentiating cortical layers and along axon tracts, as well as in CNS lesions. It has previously been shown that phosphacan can promote outgrowth from cortical neurons (43), and that the N-terminal domains of phosphacan can also promote outgrowth, some of these effects being mediated via the IgCAMs, F3/contactin and NrCAM (20,21). Based upon these studies, it seems likely that PSI can also affect neurite outgrowth. In order to investigate this, the effects of a recombinant PSI protein on outgrowth from embryonic (E17) mouse cortical neurons were compared to those obtained with the purified phosphacan proteoglycan. The PSI protein was expressed as a GST recombinant construct and purified using glutathione affinity chromatography. As can be seen in Table 1 and Figure 9, there was a significant promotion of neurite outgrowth by the PSI-GST protein relative to both the poly-L-lysine control and the GST protein alone, although the promotion on the phosphacan substrate was more robust. It is possible that the native phosphacan can exert stronger effects than the PSI construct due to the presence of additional promotory signals which may occur either in the much larger phosphacan protein sequence, or in the extensive additional glycosylation, including the GAG chains, present on the proteoglycan.

Nevertheless, it appears that the PSI protein sequence is capable of promoting neurite outgrowth from cortical neurons and that this effect can be obtained without eukaryotic posttranslational modifications.

Discussion.

A new isoform of phosphacan: Phosphacan Short Isoform.

In this paper, we describe evidence for a new isoform of phosphacan/RPTP- β . The novel PSI transcript was cloned from a brain cDNA expression library using anti-phosphacan sera, and its expression in vivo confirmed by Northern blot hybridisation. Using the same antisera, we have searched brain extracts for the protein corresponding to the translation product of the PSI transcript and have identified a 90kD glycoprotein which fulfils the expected biochemical criteria. The deglycosylated protein has the predicted size and N-terminal peptide sequence. It is also recognised by antisera raised against the recombinant PSI protein, and bears the HNK-1 sugar epitope, which is also found on phosphacan. Hence, it appears that the 90kD protein does indeed correspond to the product of the PSI transcript.

However, ECM proteins can be subject to proteolysis and an alternative explanation for the 90kD protein we have characterised might be that it is a proteolytic breakdown product of phosphacan/RPTP- β . There are several reasons, besides the existence of the PSI transcript, why this is unlikely to be the case. For a start, an analysis of the phosphacan protein sequence for potential cleavage sites by known proteases (PeptideCutter program (44)) indicates that it could be digested into relatively small peptides, especially in the Nterminal region. In addition, the only reported in vivo demonstration of proteolytic cleavage of phosphacan is for the tissue plasminogen activator and plasmin (45), where it was shown that I¹²⁵-radiolabelled phosphacan could be digested by pure plasmin in vitro, but no digestion product was observed in the range 40-150kD. Moreover, a clear demonstration of in vivo proteolysis of phosphacan compared to transgenic mice null for either tissue plasminogen activator or plasminogen was only observed in the hippocampus following sclerotic changes induced by kainate injections (45). Hence, there does not seem to be a constitutive large-scale cleavage of phosphacan under non-pathological conditions, unlike the situation which is readily observed for another prominent CNS-specific CSPG, neurocan. Neurocan has been shown to be subject to a specific processing generating large N- and C-terminal fragments (46). However, this processing is developmentally regulated and can be readily observed both in vivo and in vitro, even occurring in astrocytic cell cultures which have been extensively supplemented with protease inhibitors (47).

In addition, although it has been previously suggested that a 180kD protein species which reacts with anti-phosphacan sera may be a proteolytic product, this was because it was not recognised by the mAb 3F8 (48). We observe similar bands migrating around 200-250kD (Figure 4b), and another explanation might be that the 180kD band corresponds to a form of mostly unglycosylated phosphacan (36) in which the 3F8 epitope is either hidden by a small oligosaccharide or, indeed, it has even been suggested that 3F8 may itself be a sugar epitope (40). In addition, this 180kD band was found in cell-conditioned media (48), unlike the 90kD band which we have shown to be in the PBS-insoluble fraction. Hence, on balance, it seems unlikely that the 90kD protein which we have characterised results from a proteolytic cleavage event.

Molecular interactions of PSI and phosphacan

The identification of a novel isoform of phosphacan/RPTP- β provides a new component in the cell-cell and cell-ECM signaling events in which these proteins have been implicated. Compared to ECM structures in other tissues, the ECM of the CNS appears to have a relatively 'loose' supramolecular organisation. As such, many ECM components can be readily extracted from the CNS using physiological buffers, whereas the use of chaotropic reagents such as urea and guanidium hydrochloride is often necessary to dissociate ECM components from structures in other tissues (1). Phosphacan is a large CSPG which can be quantitatively recovered from brain tissue using detergent-free physiological buffers(4). By contrast, the smaller PSI protein remains associated with the PBS-insoluble material, which includes the total cell membrane fraction. The PSI protein can be solubilised from this fraction using either detergent or urea, suggesting that, although it is strongly associated with this fraction, it is not directly associated with lipids. In addition, there is no evidence of any lipid-binding domains in the PSI sequence. Consequently, it appears likely that the PSI protein is bound with PBS-insoluble proteins in this fraction. Based on previous reports of binding partners for phosphacan, several membrane-bound members of the IgCAM superfamily might account for such interactions. Thus, the transmembrane IgCAMs, L1/NgCAM, NrCAM, and NCAM-180, and the GPI-anchored IgCAMs, F3/contactin, and TAG-1/Axonin, have all previously been shown to bind to phosphacan(20,21,23,49). The PSI protein comprises the CA and FNIII domains, and half of the S region and as such it could also be involved in the interactions which have already been shown for these parts of phosphacan. Hence, it has been shown that F3/contactin binds to the CA domain (20), whereas NCAM, L1/NgCAM, and NrCAM have all been shown to interact with the S region (21). Indeed of the neuronal IgCAMs found to interact with phosphacan, only TAG-1/Axonin-1, which binds to phosphacan via the CS GAG chains (23), interacts principally with parts of the molecule which are absent from the PSI protein.

Here we demonstrate that both the native and recombinant PSI protein can interact with L1/NgCAM and F3/contactin, and thus it seems likely that both the PSI protein and phosphacan could interact with the same receptor proteins at sites that are common to both isoforms. Therefore, it is possible that where the PSI protein and phosphacan are coexpressed they may compete for common receptors.

The retention of PSI in the PBS-insoluble fraction of postnatal brain under conditions in which phosphacan is readily extracted suggests that in fact the PSI protein may be more tightly bound to such membrane receptors than phosphacan. This weaker association of phosphacan with the membrane fraction could also be due to additional binding interactions with PBS-soluble factors via other sites present on the phosphacan molecule. Hence binding interactions have been described between the CS GAG chains on phosphacan and growth factors such as HB-GAM/pleiotrophin(19,25), midkine(24), and amphoterin(19), and perhaps such molecular binding interactions could modify binding interactions at other sites on the proteoglycan. In addition, the high negative charge and steric bulk of the CS GAG chains may in themselves represent factors which lower the relative affinity of phosphacan for the membrane compared to the PSI protein.

Phosphacan Short Isoform and Neurite outgrowth promotion

Previously we have shown that the phosphacan proteoglycan can have opposing effects upon neurite outgrowth dependent upon the neuronal lineage: which may be mediated either via the CS GAG chains (4) or the core glycoprotein (5). Similarly, promotion was found from E16 cortical neurons on a phosphacan substrate which was neutral in the same study for outgrowth from E16 thalamic neurons (43), whereas phosphacan was inhibitory for outgrowth from E17 cerebellar neurons (25), and P6-P8 retinal ganglion cells (50).

In this study, we have found that a recombinant PSI protein can promote neurite outgrowth from E17 cortical neurons. Previous studies have implicated both the GAG chains and the glycosylated core protein (following either enzymatic digestion, or as a result of eukaryotic expression of recombinant constructs), but evidence is presented here that, even in the absence of any glycosylation or other eukaryotic post-translational modification, there are interaction sites on the PSI protein which can promote neurite outgrowth.

Studies with recombinant Fc fusion proteins containing the different domains of phosphacan have previously demonstrated that the CA domain can support neuronal adhesion and neurite outgrowth by binding to F3/contactin on the surface of neurons (20), and NrCAM has been shown to promote outgrowth via interactions with the S region. Both of these effects could be blocked by specific antibodies directed against F3/contactin and NrCAM (20,21). Our co-immunoprecipitation and GST pull-down studies indicate that both the native and recombinant PSI protein can, as predicted, interact with L1/NgCAM and F3/contactin, hence

it is possible that the outgrowth promotion observed is due to binding interactions between neural IgCAM receptors and the PSI protein.

Phosphacan is subject to extensive glycosylation, with upto 16 predicted Nglycosylation and 41 potential O-glycosylation sites. By comparison, PSI, which lacks the large 850 aa IS region and the C-terminal half of the S region, contains only 8 of the predicted N-glycosylation and 3 of the potential O-glycosylation sites, and it is not substituted with GAG chains. Consequently, the range of possible interactions of the PSI protein is reduced compared to phosphacan and this might explain the weaker outgrowth promotion observed in our study. Nevertheless, it seems that even without carbohydrate modifications, the PSI protein sequence can still promote process outgrowth from cortical neurons.

Phosphacan Short Isoform and Phosphacan as regulators of the tyrosine phosphatase activity of the RPTP- β receptor forms.

It has been suggested that phosphacan/RPTP- β isoforms are involved in a complex *in vivo* neuron-glia cross-talk via interactions with other receptor molecules and ECM proteins (13). The expression of the PSI protein could also intervene in such processes by competing selectively for ligands. A similar relationship has already been proposed for interactions between the secreted phosphacan proteoglycan and the transmembrane receptor forms of RPTP- β . Hence extracellular sites common to the different isoforms could compete for similar extracellular ligands and thereby modulate the nature of the cytoplasmic tyrosine phosphatase signal from the RPTP- β receptor forms (51). Alternatively, they could interact in either cis or trans with other cell surface receptor molecules, affecting the respective signaling responses of these molecules (21). Thus, our identification of a novel truncated isoform of phosphacan representing 78% of the shorter extracellular region of the short RPTP- β receptor protein could be a complementary element to the competitive ligand model that has already been proposed for the larger extracellular domains of phosphacan and the long RPTP- β

receptor. In addition, although both phosphacan and the long RPTP- β receptor are modified by the addition of CS GAG chains, the PSI protein and the short RPTP- β receptor are not proteoglycans. Hence, the expression of PSI suggests the possibility that both of the RPTP- β receptor forms have their own respective complementary secreted forms, and that these could serve as competitive regulators of their ligand interactions and consequently of their intracellular enzymatic activity.

A possible functional interaction between the different isoforms of phosphacan/RPTP- β might occur during myelination since it has been shown that the CA domain, common to all four isoforms, can interact with F3/contactin in a neuronal signaling complex which has been localised in vivo at paranodal junctions between axons and paranodal loops of myelinating glia (42). It has also recently been shown that the recombinant CA domain can block the localisation of this complex to the paranodes (52), suggesting that the complex may be targeted via ECM interactions with phosphacan/RPTP- β expressed by myelinating glia. Additionally a significant role for phosphacan/RPTP- β in myelination has been suggested by studies on mice deficient for the RPTP- β gene which indicate that, although there is no gross abnormality in the overall brain architecture, there is a fragility in the myelin sheaths of CNS neurons (12), and there is impaired recovery from demyelinating lesions in these mice (41).

Acknowledgements

The authors would like to thank Daniela Schnörr and Valerie Calco for technical assistance, Dr Marie-Helene Metz-Boutigue (INSERM U338) for the protein sequencing, and Drs E. Mohier, F. Pfrieger, N. Grant, and S. Lecat for ongoing encouragement. This work was supported by the CNRS, the German Research Council (DFG, Fa 159/11-1,2,3), the International Spinal Research Trust, and the Association pour la Recherche contre le Cancer. J.G. was awarded a Poste rouge from the CNRS during part of this work.

REFERENCES

- Garwood, J., Heck, N., Rigato, F., and Faissner, A. (2002) in *The neuronal microenvironment* (Walz, W., ed), pp. 109-158, Humana Press, New Jersey, USA
- 2. Maleski, M., and Hockfield, S. (1997) *Glia* **20**, 193-202
- 3. Rauch, U. (1997) Cell Tissue Res 290, 349-356
- Faissner, A., Clement, A., Lochter, A., Streit, A., Mandl, C., and Schachner, M. (1994) J Cell Biol 126, 783-799
- Garwood, J., Schnadelbach, O., Clement, A., Schutte, K., Bach, A., and Faissner, A. (1999) *J Neurosci* 19, 3888-3899
- Maurel, P., Rauch, U., Flad, M., Margolis, R. K., and Margolis, R. U. (1994) Proc Natl Acad Sci U S A 91, 2512-2516
- 7. Krueger, N. X., and Saito, H. (1992) Proc Natl Acad Sci U S A 89, 7417-7421
- Maeda, N., Nishiwaki, T., Shintani, T., Hamanaka, H., and Noda, M. (1996) *J Biol Chem* 271, 21446-21452
- 9. Meyer-Puttlitz, B., Junker, E., Margolis, R. U., and Margolis, R. K. (1996) *J Comp Neurol* **366**, 44-54
- Haunso, A., Celio, M. R., Margolis, R. K., and Menoud, P. A. (1999) *Brain Res* 834, 219-222
- 11. Murai, K. K., Misner, D., and Ranscht, B. (2002) Curr Biol 12, 181-190
- Harroch, S., Palmeri, M., Rosenbluth, J., Custer, A., Okigaki, M., Shrager, P., Blum,
 M., Buxbaum, J. D., and Schlessinger, J. (2000) *Mol Cell Biol* 20, 7706-7715
- Garwood, J., Rigato, F., Heck, N., and Faissner, A. (2001) *Restor Neurol Neurosci* 19, 51-64

- Barker, R. A., Dunnett, S. B., Faissner, A., and Fawcett, J. W. (1996) *Exp Neurol* 141, 79-93
- 15. Laywell, E. D., and Steindler, D. A. (1991) Ann NY Acad Sci 633, 122-141
- Deller, T., Haas, C. A., Naumann, T., Joester, A., Faissner, A., and Frotscher, M. (1997) *Neuroscience* 81, 829-846
- Milev, P., Meyer-Puttlitz, B., Margolis, R. K., and Margolis, R. U. (1995) *J Biol Chem* 270, 24650-24653
- Milev, P., Fischer, D., Haring, M., Schulthess, T., Margolis, R. K., Chiquet-Ehrismann, R., and Margolis, R. U. (1997) *J Biol Chem* 272, 15501-15509
- Milev, P., Chiba, A., Haring, M., Rauvala, H., Schachner, M., Ranscht, B., Margolis,
 R. K., and Margolis, R. U. (1998) *J Biol Chem* 273, 6998-7005
- Peles, E., Nativ, M., Campbell, P. L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D. O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G. D., and et al. (1995) *Cell* 82, 251-260
- Sakurai, T., Lustig, M., Nativ, M., Hemperly, J. J., Schlessinger, J., Peles, E., and Grumet, M. (1997) J Cell Biol 136, 907-918
- Milev, P., Monnerie, H., Popp, S., Margolis, R. K., and Margolis, R. U. (1998) *J Biol Chem* 273, 21439-21442
- Milev, P., Maurel, P., Haring, M., Margolis, R. K., and Margolis, R. U. (1996) *J Biol Chem* 271, 15716-15723
- 24. Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., and Noda, M. (1999) *J Biol Chem* **274**, 12474-12479
- 25. Maeda, N., and Noda, M. (1998) J Cell Biol 142, 203-216.
- Clement, A. M., Nadanaka, S., Masayama, K., Mandl, C., Sugahara, K., and Faissner,
 A. (1998) *J Biol Chem* 273, 28444-28453
- 27. Rathjen, F. G., and Schachner, M. (1984) EMBO J 3, 1-10

- Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C., and Schachner, M. (1984) *Nature* **311**, 153-155
- Brummendorf, T., Hubert, M., Treubert, U., Leuschner, R., Tarnok, A., and Rathjen,
 F. G. (1993) *Neuron* 10, 711-727
- Rauch, U., Gao, P., Janetzko, A., Flaccus, A., Hilgenberg, L., Tekotte, H., Margolis,
 R. K., and Margolis, R. U. (1991) *J Biol Chem* 266, 14785-14801
- 31. Faissner, A., and Kruse, J. (1990) Neuron 5, 627-637
- 32. Koch, T., Brugger, T., Bach, A., Gennarini, G., and Trotter, J. (1997) *Glia* **19**, 199-212
- 33. Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen, G. (1973) Anal Biochem 54, 484-489
- 34. Bottenstein, J. E., and Sato, G. H. (1979) Proc Natl Acad Sci U S A 76, 514-517
- Canoll, P. D., Petanceska, S., Schlessinger, J., and Musacchio, J. M. (1996) J Neurosci Res 44, 199-215
- Inatani, M., Tanihara, H., Oohira, A., Honjo, M., Kido, N., and Honda, Y. (2000) Invest Ophthalmol Vis Sci 41, 1990-1997
- 37. Bairoch, A., Bucher, P., and Hofmann, K. (1997) Nucleic Acids Res 25, 217-221
- 38. Eisenhaber, B., Bork, P., and Eisenhaber, F. (1999) J Mol Biol 292, 741-758
- Ratcliffe, C. F., Qu, Y., McCormick, K. A., Tibbs, V. C., Dixon, J. E., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2000) *Nat Neurosci* 3, 437-444
- Meyer-Puttlitz, B., Milev, P., Junker, E., Zimmer, I., Margolis, R. U., and Margolis, R.
 K. (1995) *J Neurochem* 65, 2327-2337
- Harroch, S., Furtado, G. C., Brueck, W., Rosenbluth, J., Lafaille, J., Chao, M., Buxbaum, J. D., and Schlessinger, J. (2002) *Nat Genet* 32, 411-414
- Peles, E., Nativ, M., Lustig, M., Grumet, M., Schilling, J., Martinez, R., Plowman, G.
 D., and Schlessinger, J. (1997) *EMBO J* 16, 978-988

- 43. Maeda, N., and Noda, M. (1996) Development 122, 647-658
- Barrett, A., Rawlings, N., and Woessner, J. (1998) *Handbook of proteolytic enzymes*,Academic Press, NJ
- Wu, Y. P., Siao, C. J., Lu, W., Sung, T. C., Frohman, M. A., Milev, P., Bugge, T. H., Degen, J. L., Levine, J. M., Margolis, R. U., and Tsirka, S. E. (2000) *J Cell Biol* 148, 1295-1304
- 46. Rauch, U., Feng, K., and Zhou, X. H. (2001) Cell Mol Life Sci 58, 1842-1856
- 47. Asher, R. A., Morgenstern, D. A., Fidler, P. S., Adcock, K. H., Oohira, A., Braistead, J. E., Levine, J. M., Margolis, R. U., Rogers, J. H., and Fawcett, J. W. (2000) J *Neurosci* 20, 2427-2438
- 48. Sakurai, T., Friedlander, D. R., and Grumet, M. (1996) J Neurosci Res 43, 694-706
- Milev, P., Friedlander, D. R., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Flad, M., Margolis, R. K., Grumet, M., and Margolis, R. U. (1994) *J Cell Biol* 127, 1703-1715
- 50. Inatani, M., Honjo, M., Otori, Y., Oohira, A., Kido, N., Tano, Y., Honda, Y., and Tanihara, H. (2001) *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 1930-1938
- Adamsky, K., Schilling, J., Garwood, J., Faissner, A., and Peles, E. (2001) Oncogene
 20, 609-618
- Rios, J. C., Melendez-Vasquez, C. V., Einheber, S., Lustig, M., Grumet, M., Hemperly, J., Peles, E., and Salzer, J. L. (2000) *J Neurosci* 20, 8354-8364
- Faissner, A., Teplow, D. B., Kubler, D., Keilhauer, G., Kinzel, V., and Schachner, M. (1985) *Embo J* 4, 3105-3113

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic comparison of the Phosphacan Short Isoform protein with the known forms of phosphacan/RPTP-β.

All four isoforms share a common N-terminal sequence including the carbonic anhydrase (residues 38-292) and fibronectin type III (312-401) domains. While the other forms contain the S region between the FNIII domain and the splice site for the short RPTP- β (402-762), the PSI protein ends 196 residues after the FNIII domain. Phosphacan and the long RPTP- β receptor form in addition contain the IS region with the GAG attachment sites. Both receptor forms possess a single-pass transmembrane domain and two cytoplasmic protein tyrosine phosphatase domains. pAb KAF 13 (anti-phosphacan) recognises extracellular epitopes common to all four isoforms. The predicted molecular masses of the proteins based on their primary amino acid sequences are indicated. However, these proteins are subject to extensive post-translational glycosylation, e.g. phosphacan occurs as a CSPG with a Mr>800kD (4).

Figure 2. Nucleotide sequence of Phosphacan Short Isoform cDNA.

The 3.8kb sequence is shown together with the deduced 597 amino acid sequence of the 1.8kb open reading frame; * indicates the stop codon; the underlined sequence, the potential polyadenylation site. The schema below illustrates the fragments used to compile the sequence; >,< are the PCR primers. The dotted lines represent the sequences used to make the probes used in the Northern analysis. The accession number for this sequence in the EMBL database is AJ428208.

Figure 3. Northern blot analysis.

Blot shows whole brain $poly(A)^+$ RNA from embryonic day 15 (E15), and postnatal day 0 (P0). This was probed with a 5'-ORF probe covering the region common to the four isoform transcripts (left panel) and an antisense riboprobe for the 3'-UTR of the PSI transcript (right panel). In addition to the bands for phosphacan and the two RPTP- β receptor forms, there is an additional band around 4kb which is hybridised by both the 5'-ORF and the 3'-UTR probes. A β -actin probe was employed as a marker of relative RNA concentration (bottom).

Figure 4. Western blot analysis of different brain protein extracts.

P7 mouse brains were homogenised and fractionated with different buffers as indicated. NP40:- 1% NP40/PBS; PBS/100,000g:- supernatant (s/n) and pellet following homogenisation in PBS and centrifugation at 100,000g; octyl-glucoside:- 60mM n-octyl-b-Dglucopyranoside/50mM Tris, 50mM NaAcetate,pH8; urea:- 8M urea/10mM NaAcetate, pH6. a) mAb 473HD recognises the DSD-1 CS GAG epitope on phosphacan and the long RPTP- β receptor form; b) in addition to phosphacan and the RPTP- β receptor forms, the pAb KAF 13 recognises a band migrating around 90 kD (arrow) in all of the extracts except the PBSsoluble 100,000g supernatant; c) TN-C was detected with pAb KAF 14; d) F3/contactin detected with anti-F3/contactin pAb.

Figure 5. Deglycosylation studies of brain protein extracts.

The PBS-insoluble, 100,000g pellet fraction from Figure 4 was digested with Chondroitinase ABC, N-glycosidase F, or keratanase, prior to separation on SDS-PAGE and blotting onto PVDF membrane. The 90kD band detected by pAb KAF 13 (arrow) is shifted down by N-glycosidase F treatment. A band around 190kD (circle) corresponds to the short RPTP- β receptor and is also shifted down by N-glycosidase F treatment. The core protein of the long RPTP- β receptor at around 350-400kD (bar) is obtained following ChABC digestion. In the

right-hand panel, the mAb 3F8 against an epitope on phosphacan/long RPTP- β recognises the ChABC-digested core protein of long RPTP- β (bar) but neither the 90kD band nor the short RPTP- β receptor.

Figure 6. The 90kD protein is recognised by antibodies against the PSI protein sequence and the HNK-1 carbohydrate epitope.

a) Western blot of Concanavalin A affinity-purified protein fraction revealed with the pAbs KAF13 and anti-PSI, and the mAb 412 against the HNK-1 epitope. The 90kD protein (arrow) reacts with all three Abs and yields an N-terminal sequence corresponding to the PSI transcript. b) Immunoprecipitation of the 90kD protein (arrow) by anti-PSI, KAF13, and 412 (anti-HNK-1). Western blot showing proteins precipitated from the PBS-insoluble 100,000g fraction using the indicated Abs (IP), and revealed using the Abs indicated below the figure (Blot). Controls were performed without addition of antibody.

Figure 7. Developmental expression of PSI.

The detergent-solubilised 100,000g PBS pellets (membrane-associated fractions) from whole mouse brains at the developmental stages shown (50µg per lane) were separated on 10% SDS-PAGE and blotted onto PVDF. The blot was revealed with pAb KAF 13. The PSI band (arrow) shows an expression profile which peaks in the second week postnatal. Higher bands around 190kD and >500kD correspond to the short RPTP- β and long RPTP- β receptor forms, and the size variations probably reflect differences in the extent of glycosylation on the core proteins (30).

Figure 8. Interaction of native and recombinant PSI protein with the IgCAMs, L1 and F3/contactin.

a) P7 brain protein lysate was incubated with anti-L1 or anti-F3/contactin mAbs overnight and then mixed with anti-IgG-coupled agarose beads. The proteins precipitated with the beads were separated on 10% SDS-PAGE, blotted to PVDF, and revealed with pAb KAF 13. The lysate lane is the lysate without precipitation. Controls are the protein precipitated by the anti-IgG beads in the absence of antibody. b) PSI recombinant protein interacts with IgCAMs in GST pull-down experiments: Western blots showing the retention of F3/contactin (140kD) and L1/NgCAM (135, and 200kD; (53)) by the GST-PSI recombinant protein. Lysate is the protein extract without treatment; GST is the control lane with GST protein alone. Blots revealed with anti-F3 pAb, and 324 (anti-L1) mAb.

Figure 9. Neurite outgrowth assay of cortical neurons grown on Phosphacan and Phosphacan Short Isoform.

Left-hand panel: Cortical neurons from mouse cerebrum (E17) were cultivated for 24 hours on poly-L-lysine (A), poly-L-lysine + phosphacan (B), poly-L-lysine + GST (C), and poly-Llysine + phosphacan short isoform-GST (D). Immunofluorescent images of neurons marked with anti- β 3-tubulin. Scale bar, 50 μ m. Right-hand panel: Summary of neurite outgrowth assays on cortical neurons comparing the effect of phosphacan, Phosphacan Short Isoform-GST (PSI-GST), and glutathione-S-transferase (GST) coated on poly-L-lysine. The percentage stimulation versus the poly-L-lysine control. Three independent experiments were analyzed, and the mean values of the neurite lengths were compared by Tukey-test. n.s., nonsignificant; *0.05>p>0.01; ***p<0.001. Error bars represent the SE.





ATG CGA ATC CTG CAG AGC TTC CTC GCG TGC GTT CAG CTC CTG TGC CTG TGT CGC CTG GAC TGG GCC TAT GGA 72 MRILQSFLACVQLLCLCRLDWAYG24 TAC TAC AGA CAA CAG AGG AAA CTT GTT GAA GAG ATT GGC TGG TCC TAC ACA GGA GCA CTA AAT CAA AAA AAT 144 Y R Q Q R K L V E E I G W S Y T G A L N Q K N 48 TGG GGA AAG AAA TAT CCA ATG TGT AAT AGC CCA AAG CAG TCT CCT ATT AAT ATT GAC GAA GAT CTT ACA CAA 216 WGKKYPMCNSPKOSPINIDEDLTO72 GTC AAT GTG AAT CTT AAG AAG CTG AAA TTT CAG GGT TGG GAA AAA GCG TCC TTG GAA AAC ACG TTC ATT CAC 288 VNVNLKKLKFOGWEKASLENTFIH96 AGC ACT GGG AAA ACA GTG GAA ATA AAT CTC ACT AAT GAC TAC TAT CTC AGT GGA GGA CTT TCA GAA AAG GTC 360 T G K T V E I N L T N D Y Y L S G G L S E K V 120 TTC AAG GCA AGC AAG ATA ACT TTC CAC CGG GGA AAA TGC AAT GTG TCA TCT GAA GGA TCG GAA CAT AGC TTA 432 FKASKITFHRGKCNVSSEGSEHSL144 GAA GGA CAG AAG TTC CCA CTG GAG ATG CAA GTC TAC TGC TTT GAT GCG GAC AGA TTT TCC AGT TTT GAG GAA 504 E G O K F P L E M O V Y C F D A D R F S S F E E 168 GCA GTT AAA GGA AAA GGA AGA TTA AGG GCT TTA TCC ATT TTA TTT GAG GTT GGA GAT GAA GAA AAT TTG GAT 576 V K G K G R L R A L S I L F E V G V E E N L D 192 TAC AAA GCC ATT ATT GAT GGA ACT GAG AGT GTT AGT CGT TTT GGA AAG CAG GCT GCT TTA GAT CCA TTC GTC 648 I D G T E S V S R F G K Q A A L D P F 216 K A Ι V TTG CAG AAC CTC CTG CAA AAC TCC ACT GAC AAG TAT TAC ATT TAC AAT GGA TCA TTG ACA TCC CCT CCC TGC 720 L O N L L O N S T D K Y Y I Y N G S L T S P P C 240 ACA GAC ACC GTG GAA TGG ATT GTT TTT AAG GAT ACA GTT AGC ATC TCT GAA AGC CAG CTG GCT GTA TTT TGT 792 T D T V E W I V F K D T V S I S E S Q L A V F C 264 GAA GTT CTC ACA ATG CAA CAG TCT GGG TAT GTC ATG TTG ATG GAT TAC TTA CAA AAC AAT TTC CGA GAA CAA 864 E V L T M O O S G Y V M L M D Y L O N N F R E O 288 CAG TAC AAG TTT TCC AGG CAG GTG TTT TCC TCA TAT ACT GGA AAG GAA GAG ATC CAC GAA GTA GTG TGT AGT 936 QYKFSRQVFSSYTGKEEIHEVVCS312 TCA GAA CCA GAA AAT GTG CAA GCT GAC CCT GAG AAT TAC ACC AGC CTT CTG GTC ACA TGG GAA AGA CCT CGG 1008 SEPENVOADPENYTSLLVTWERPR 336 GTC GTT TAT GAC GCC ATG ATT GAG AAG TTT GCA GTT CTG TAC CAG CCA CTG GCG GGA AAT GAC CAA GCC AAG 1080 V V Y D A M I E K F A V L Y O P L A G N D O A K 360 CAT GAG TTC TTA ACA GAT GGC TAT CAG GAC TTG GGT GCC ATT CTC AAT AAT TTA CTA CCT AAC ATG AGT TAC 1152 E F L T D G Y Q D L G A I L N N L L P N M S Y Η 384 GTT CTT CAA ATA GTG GCC GTA TGC TCT AAT GGT TTA TAT GGA AAG TAC AGT GAC CAA CTG ATA GTG GAC ATG 1224 VLQIVAVCSNGLYGKYSDQLIVDM 408 CCC ACT GAA GAT GCC GAA CTT GAC CTT TTT CCT GAA TTA ATT GGG ACT GAA GAA ATA ATC AAG GAG GAA GAA 1296 PTEDAELDLFPELIGTEEIIKEEE432 TAT GGA AAA GAC AAT GAA GAA GAC ACT GGC TTG AAT CCT GGT AGA GAC AGT GTC ACA AAC CAA ATA AGG AAA 1368 Y G K D N E E D T G L N P G R D S V T N O I R K 456 AAG GAA CCC CAG GTT TCT ACC ACG ACT CAC TAT AAT CAC ATG GGG ACT AAA TAC AAT GAA GCC AAG ACT AAC 1440 KEPQVSTTTHYNHMGTKYNEAKTN 480 CGA TCT CCA ACA AGA GGA TCT GAA TTC TCT GGA AAG AGT GAT GTT CCC AAC ACT TCC CCG AAT TCT ACT TCC 1512 R S P T R G S E F S G K S D V P N T S P N S T S 504 CAA CAT GTT GCT GAA TTC GAA ACA GAA AGA GGA ATT TCC TTG CCT TCT CAG ACT GGA ACT AAC CTG CCA CCA 1584 O H V A E F E T E R G I S L P S O T G T N L P P 528 CAC AAT GTG GAA GGC ACT TCA GCC TCC TTA AAC AGT GGC TCT AAA ACT CTC TTT ATC TTC CCA CAG ATG AAC 1656 N V E G T S A S L N S G S K T L F I F P Q M N Η 552 TTG TCT GGG ACT GCA GAA TCC TTA AAT ACG GTT CCC ATA ACA GAG TAC AAA GAG GTT TCT GCT GAC GTC AGT 1728 LSGTAESLNTVPITEYKEVSADVS576 GAG GAA GAA AAC TTC CTG ACT GAT TTC AAG CTC GAT ACG GGA GCC GAT GAC TCT TCA GCT GGA TAG TAGGTA 1800 E E E N F L T D F K L D T G A D D S S A G * 597 GGGACAGTGGGAATCTCGTTCATCCATTCATGCGCGTCACTAATTAGATGACGAGGCATTTGGCTACCTTAAGAGAGTCATAGTTACTCCCGCCGTTTAC ${\tt CCGCGCTTCTTGAATTTCTTCACATTCAGAGCACTGGGCAGAAATCACATCGCGTCAACACCCGCCGCGGGCCTTCGCGATGCTTTGTTTTAAT$ ${\tt GCGCGCGCCCCAGACCCAGCCCTTAGAGCCAATCCTTATCCCGAAGTTACGGATCCGGCTTGCCGACTTCCCTTACCTACATTGTTCCAACATGCCAGA$ GGCTGTTCACCTTGGAGACCTGCTGCGGATATGGTACGCCCGGCGCGAGATTTACACCCTCTCCCCCCGGATTTTCAAGGGCCAGCGAGAGCTCACCGGA CGCGCGAACCGCGACGCTTTCCAAGGCACGGGCCCCTCTCTCGGGGCGAACCCATTCCAGGGCGCCCTGCCCTTCACAAAGAAAAGAGAAACTCTCCCCGG GGCTCCCGCCGGCTTCTCCGGGGATCGGTCGCGTTACCGCACTGGGGACCTCGCGGCGCCCATCTCCGCCACTCCGGGGATCTGAACCCGACTCCC TTTCGATCGGCCGAGGGCAACGGAGGCCATCGCCCGTCCTTCGGAACGGCACTCGCCCATCTCTCAGGAACTGACCCATGTTCAACTGCTGTTCACATGG AACCCTTCTCCACTTCGGCCTTCAAAGTTCTCGTTTGAATATTTGCTACTACCACCAAGATCTGCACCTGCGGTGGCTCCACCAGGGCCTGCGCCCCTAG GGGACGGGCCCCCGCTACGCACCCCCGACGCGCGCCGCCCCCGCGCCGCCGCCCGCTCCCGTCCCGACTGCCGGCTGACTTGGAACCCGGGTATGGG ${\tt CCCGACGCTCCAGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGTTGATTCGGCAGGTGAGTTTGTACACACTCCTTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCCTG$ CTGTCTATATCAACCAACACCTTTTCTGGGGTCTGATGAGCGTCGGCATCGGGCGCCTTAACCCGGCGTTCGGTTCATCCCAGCGCCAGTTCTGCTTACC AAAAGTGGCCCACTAGGCACTCGCATTCCACGCCCGGCTCCACGCCAGCGAGCCGGGCTTCTTACCCATTTAAAGTTTGAGAATAGGTTGAGATCGTTTC GGCCCCAAGACCTCTAATCATTCGCTTTACCGGATAAAACTGCGTACGTCGGGGAAAAAAAGGGCGAGACTCGTGCCGAATTC 3784

Figure2

>1	1700>	<1891<2120	
5'-ORF		3'-UTR	



Figure 3



Figure 4



Figure 5



Figure 6



Figure 7



Figure 8



Figure 9

Table 1. Summary of neurite outgrowth assayscomparing the effects on cortical neurons of PSIrecombinant protein and phosphacan coated on

poly-L-lysine.

Substrate	Total no. of analyzed	Mean neurite
	neurons	length (µm)
		+/-SE
Poly-L-lysine	479	76.6+/-1.7
Phosphacan+	463	98.5+/-2.2
Poly-L-lysine		
GST+	428	76.6+/-1.6
Poly-L-lysine		
PSI-GST+	458	83.6+/-1.8
Poly-L-lysine		

Total number of analyzed neurons out of three independent experiments.

SE, standard error.
MATERIEL SUPPLEMENTAIRE



Figure 10

Schéma résumant les spécificités de chaque sonde sur chacune des isoformes.
4-form reconnaît les 4 isoformes
3-form reconnaît toutes isoformes sauf PSI
PSI est spécifique de PSI
PTP reconnaît les deux isoformes de RPTPβ



Figure 11 (page précédente)

Etude par immunohistochimie et hybridation *in situ* de l'expression de Phosphacan/RPTP β chez le rat au 7ème jour postnatal. Barre = 250µm. A,B : Anticorps KAF13

C,D : Sonde spécifique des 4 isoformes (4-form)

E,F : Sonde spécifique de Phosphacan et RPTP β (3-form)

G,H : Sonde spécifique de PSI (PSI)



Figure 12

PSI est exprimée par les neurones du cortex de rat au 7ème jour postnatal. Les expériences d'hybridation *in situ* montrent que PSI est exprimée par des cellules dont la disposition dans le tissu et la morphologie correspondent à celles des neurones pyramidaux. Les fléches indiquent des exemples de neurones pyramidaux, dont la morphologie caractéristique est représentée par le schéma. Barre = 25µm.



Figure 13

Les formes transmembranaires RPTP β sont exprimées autour des ventricules latéraux dans la période postnatale. Durant cette période, cette zone correspond à la prolifération des cellules gliales.

La restriction de la localisation d'expression de RPTP β permet de conclure que les neurones corticaux n'expriment pas RPTP β .

Cerveau de rat P0, objectif x20.



Figure 14

PSI est exprimée dans le cortex mais pas dans le cervelet chez le rat au 7ème jour postnatal.

Le western blot montre une bande à 84kD, indiquée par une flèche, qui correspond à PSI.

L'observation de la tenascine-C et de NCAM confirme la séparation des fractions solubles et membranaires. PSI est associée à la fraction membranaire.



Substrat minimum (poly-ornithine seule)

- Substrat de phosphacan
- Substrat de phosphacan avec la GST dans le milieu de culture
- Substrat de phosphacan avec PSI dans le milieu de culture
- Substrat mixte de phosphacan et GST
- Substrat mixte de phosphacan et PSI

Figure 15

On observe les résultats suivants :

- 1. Phosphacan augmente la croissance neuritique par rapport au substrat neutre.
- 2. La présence de la GST ou de PSI dans le milieu de culture entraîne une diminution de l'effet promoteur du substrat de phosphacan.
- Un substrat mixte de phosphacan et GST ou de phosphacan et PSI entraîne une promotion de la longeur neuritique similaire à celle observée sur un substrat de phosphacan seul.

Histogramme des longueurs des neurites (moyenne +/- SEM). Une analyse plus détaillée des effets de PSI dans le milieu de culture est présentée dans le figure 17.

	PLL	DSD	DSD+GST dilué	DSD+PSI dilué	DSD+GST substrat	DSD+PSI substrat
PLL	/	***	***	NS	***	***
DSD		/	**	***	NS	NS
DSD+GST dilué			/	*	*	NS
DSD+PSI dilué				/	***	**
DSD+GST substrat					/	NS
DSD+PSI substrat						/

Figure 16

Ce tableau présente l'ensemble de l'analyse statistique. Une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur montre une différence significative entre des conditions (P<=0.001). Un test post-hoc a été réalisé afin de comparer les conditions les unes par rapports aux autres (test de comparaison multiple de Tukey). Les résultats pertinents sont présentés dans les figures 15 et 17.



Substrat minimum (poly-ornithine seule)

- Substrat de phosphacan
- Substrat de phosphacan avec la GST dans le milieu de culture
- Substrat de phosphacan avec PSI dans le milieu de culture

Figure 17

Si l'on compare les mesures faites sur substrat de phosphacan, on observe que La présence de la GSt ou de PSI dans le milieu de culture diminuent l'effet du substrat de phosphacan. Cependant, la comparaison des effets en présence de la GST et de PSI montrent une différence significative indiquant que la diminution de l'effet de phosphacan est plus forte en présence de PSI qu'en présence de la GST seule.

Si l'on compare les mesures faites sur substrat neutre avec celles obtenues en présence de la GST ou de PSI dans le milieu, on observe que la présence de la GST n'empêche pas un effet promoteur du substrat de phosphacan. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre un substrat neutre et un substrat de phosphacan lorsque PSI est présente dans le milieu de culture. La présence de PSI bloque complétement l'effet promoteur de phosphacan.





Les neurones corticaux en culture expriment L1. Des résultats similaires ont été obtenus pour F3/contactine. Barre = 50µm



Figure 19

L'anticorps KAF13 dirigé contre toutes les isoformes de phosphacan/RPTP β montre une expression dans la plaque corticale (A, x10) et la zone sous ventriculaire (B, x20) du cortex au 19ème jour embryonnaire.



Figure 20

Modèle proposé pour expliquer les fonctions de PSI dans le développement du cortex cérébral.

- A. Durant la période embryonnaire, phosphacan, exprimé par les astrocytes, interagit avec les récepteurs F3 ou L1 pour augmenter la croissance axonale.
- B. Durant la période postnatale, les neurones secrétent PSI. En interagissant avec les récepteurs F3 et L1, PSI pourrait empêcher l'interaction de phosphacan avec ces récepteurs et donc bloquer les effets de phosphacan sur les neurones.

ETUDE DE PHOSPHACAN/RPTPβ DANS LES LESIONS

ETUDE DE PHOSPHACAN/RPTPβ DANS LES LESIONS

Manuscrit 6

"Regulation of RPTPß/Phosphacan expression and glycosaminoglycan epitopes in injured brain and cytokine-treated glia"

1. Introduction

Lors de l'apparition de lésions dans le SNC, on observe une absence de régénération des axones. Cette observation peut s'expliquer par la présence de facteurs environnementaux inhibiteurs. L'absence de facteurs neurotrophiques, l'expression de protéines inhibitrices de la croissance axonale et la formation d'une membrane basale agissant comme frontière physique et/ou chimique ont été proposés pour expliquer l'absence de régénération (Bähr et Bonhoeffer, 1994).

Au niveau du site de lésion, on observe une réactivité astrocytaire, une activation de la microglie et la présence de cellules exprimant le protéoglycan NG2, qui peuvent être considérées comme des précurseurs d'oligodendrocytes. On observe une invasion du site de lésion par les cellules de méninges et la formation d'une membrane basale contre laquelle les astrocytes réactifs forment une *glia limitans*. Il été proposé que cette membrane basale empêche la régénération (Stichel et al. 1999 ; Shearer et Fawcett 2001).

Les astrocytes réactifs présents autour de la lésion forment la *glial scar*. La réactivité astrocytaire évaluée par l'observation de l'immunoréactivité de la GFAP est associée avec un profil d'expression différent de celui observé pour les astrocytes du SNC sain. Ce profil d'expression est sans doute dépendant de la présence de cytokines dans le site de lésions.

Les astrocytes réactifs expriment des protéines de la MEC (Fawcett et Asher, 1999) tels que Neurocan (Asher et al. 2000), ou NG2 (Levine 1994). Il a été proposé que ces protéoglycans soient en partie responsable de l'absence de régénération, puisqu'ils inhibent la croissance neuritique (Dou et Levine, 1994) et qu'un traitement de la lésion à la chondroitinase permet une régénération partielle (McKeon et al. 1995).

2. But de l'étude

Des études montrent que les protéoglycans de type chondroitine sulfate participent à l'inhibition de la régénération des axones dans les lésions du SNC. Le protéoglycan phosphacan est exprimé dans les lésions du cortex cérébral (McKeon et al. 1995) et du cortex enthorinal (Deller et al. 1997) et il a été proposé qu'il participe à l'inhibition de la régénération (cf. manuscrit 8). Dans le but de caractériser l'implication potentielle de phosphacan/RPTP β dans l'absence de régénération du SNC, nous avons étudié le profil d'expression des différentes isoformes dans les lésions, l'influence des cytokines présentes dans les lésions sur l'expression de ces isoformes en culture et l'effet de phosphacan sur la croissance neuritique.

3. Résultats

Des rats adultes ont subi une lésion mécanique au niveau du cortex. Des analyses par western blot, PCR et immunohistochimie montrent une baisse de l'expression de la protéine – à l'exception de sRPTP β - entre 1 et 7 jours postlésion mais une augmentation du niveau d'ARNm pour toutes les isoformes. L'épitope DSD-1, porté par une chaîne glycosaminoglycan de phosphacan et IRPTP β , est surexprimé après 7 jours postlésion.

Un changement d'expression de cytokines est observé dans les lésions. Il est sans doute à l'origine des changements d'expression des protéines de la matrice. Afin de connaître les effets des différentes cytokines présentes dans les lésions, l'expression de phosphacan/RPTP β a été étudiée dans des cultures d'astrocytes traitées par des cytokines. L'*Epidermal Growth Factor* (EGF) provoque une forte augmentation du niveau d'expression de phosphacan/RPTP β , tandis que *Interferon* γ (INF γ) et *Tumor Necrosis Factor* α (TNF α) réduisent l'expression de phosphacan mais pas de RPTP β .

Afin de déterminer si phosphacan influe la régénération des axones dans les lésions, son effet sur la croissance des neurites de neurones corticaux a été examiné en culture. Phosphacan stimule la croissance neuritique et cet effet semble dépendant des chaînes glycosaminoglycans. Par contre un substrat de la laminine et phosphacan est inhibiteur de la croissance en comparaison d'un substrat de laminine, cet effet ne dépendant que du corps protéique de Phosphacan.

4. Conclusion

Phosphacan/RPTP β est exprimé dans les sites de lésions dans le SNC. On observe une baisse d'expression la première semaine après lésion suivie d'une augmentation d'expression. La baisse d'expression observée est sans doute due à la présence dans le site de lésion des cytokines inflammatoires INF γ et TNF α . Ces cytokines sont en effet surexprimées dans les lésions et elles inhibent l'expression de phosphacan/RPTP β en culture. Après une semaine, phosphacan/RPTP β est à nouveau exprimé. Dans cette période, il pourrait participer à l'inhibition de la régénération puisque qu'il inhibe la croissance des neurites en présence de laminine, et que cette protéine est exprimée dans les lésions.

Phosphacan/RPTPβ est donc un protéoglycan exprimé dans les lésions du SNC et pourrait participer à l'inhibition de la régénération.

Manuscrit 6

"Regulation of RPTPß/Phosphacan expression and glycosaminoglycan epitopes in injured brain and cytokine-treated glia"

Alexandre Dobbertin, Kate Rhodes, Jeremy Garwood, Francesca Properzi, Nicolas Heck, John Rogers, James Fawcett et Andreas Faissner

Manuscrit en révision pour publication dans *Molecular and Cellular Neuroscience*

Regulation of RPTPB/Phosphacan expression and glycosaminoglycan epitopes in injured brain and cytokine-treated glia

Alexandre Dobbertin^{1,2}, Kate E. Rhodes¹, Jeremy Garwood³, Francesca Properzi¹, Nicolas Heck³, John H. Rogers¹, James W. Fawcett¹ and Andreas Faissner²

¹ Physiological Laboratory, University of Cambridge, CB2 3EG Cambridge, and Centre for Brain Repair, Forvie Site, Cambridge CB2 2PY, United Kingdom

² Department of Cell Morphology and Molecular Neurobiology, Ruhr University of Bochum, 44780 Bochum, Germany

³ Laboratoire de Neurobiologie du Développement et de la Régénération, Centre de Neurochimie du CNRS, 67084 Strasbourg, France

Running title: RPTP^β/phosphacan regulation in brain injury and glia

Correspondence should be addressed to:

A. Faissner, Ruhr-University, Department of Cell Morphology and Molecular Neurobiology, NDEF 05/593 Universitätsstrasse 150, 44780 Bochum, Germany, tel. +49 (0) 234 32 28851, fax. +49 (0) 234 32 14313, E-mail: andreas.faissner@ruhr-unibochum.de

ABSTRACT

Several chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) are upregulated after CNS injury and are thought to limit axonal regeneration in the adult mammalian CNS. Therefore, we examined the expression of the secreted CSPG phosphacan and of its long and short receptor protein tyrosine phosphatase β (RPTP β) isoforms, after a knife lesion to the cerebral cortex and after treatment of glial cultures with regulatory factors. Western Blot, RT-PCR and immunohistochemical analysis of injured and uninjured tissue revealed a transient decrease of phosphacan protein levels, but not of short RPTPB, in the injured tissue from 1 to 7 days postlesion. In contrast, RPTPB/phosphacan mRNA levels were slightly augmented. Different from the core glycoprotein, the phosphacan chondroitin sulfate (CS) glycosaminoglycan epitope DSD-1 was upregulated after 7 days postlesion. Phosphacan was expressed by cultivated astrocytes and oligodendrocyte precursors in similar amounts but was more glycanated in oligodendrocyte precursors, which produce more of DSD-1 epitope than astrocytes. Epidermal growth factor/transforming growth factor α increased strongly the astrocytic expression of all RPTPB/phosphacan isoforms, while interferon γ and tumor necrosis factor α reduced phosphacan but not the receptor forms. Examining the effects of phosphacan on axon growth from rat E17 cortical neurons, we found that phosphacan stimulates outgrowth in a largely CS dependent manner, while it blocks the outgrowth-promoting effects of laminin through an interaction that is not affected by removal of the CS chains. These results demonstrate complex injury-induced modifications in phosphacan expression and glycanation that may well influence axonal regeneration and repair processes in the damaged CNS.

<u>Key words</u>: cerebral cortex, CNS injury, glial scar, chondroitin sulfate proteoglycan, extracellular matrix, regeneration, EGF, TNF α , IFN γ , TGF β 1

INTRODUCTION

Chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) are extracellular matrix (ECM) glycoproteins made up of a core protein to which attached chondroitin sulfate are (CS)glycosaminoglycan chains. In the developing CNS, they often localize to territories thought to act as barriers to migrating neurons or growing axons (Snow et al., 1990; Hoffman-Kim et al., 1998). Various lines of evidence suggest that CSPGs also strongly contribute to the failure of axonal regeneration after CNS injury. Both CS markers and several CSPG core proteins are markedly upregulated at sites of CNS injury (McKeon et al., 1991, 1995, 1999; Bovolenta et al., 1993; Levine, 1994; Davies et al., 1997, 1999; Fawcett and Asher, 1999; Haas et al., 1999; Jaworski et al., 1999; Lemons et al., 1999; Thon et al., 2000; Asher et al., 2000, 2002). Part of the inhibitory nature of these molecules resides in the CS chains, since digestion of the chains with chondroitinase ABC, which cleaves CS chains, or interference with their synthesis can make CSPGs less inhibitory in vitro (McKeon et al., 1995; Smith-Thomas et al., 1995; Zuo et al., 1998) and treatment of the injured brain or spinal cord with chondroitinase ABC promotes axon regeneration (Yick et al., 2000; Moon et al., 2001; Bradbury et al., 2002)

There are several different CSPGs expressed in the CNS with potentially different mechanisms of action. For some CSPGs, axon growth inhibition is mediated by the core protein independently of the CS chains. Moreover, some CSPGs can even stimulate neurite growth or differentiation and display opposing effects depending on their neuronal targets (Dou and Levine, 1994; Friedlander et al., 1994; Maeda and Noda., 1996; Yamada et al., 1997; Garwood et al., 1999; Schmalfeldt et al., 2000), and CS chains of different compositions also have different effects on axon growth (Letourneau et al., 1994; Clement et al., 1998). This emphasizes the importance of determining the postlesional expression and the influence on different neuronal populations of each individual CSPG in order to understand their respective roles in inhibition of axonal regeneration.

Receptor protein tyrosine phosphatase ß (RPTPß)/phosphacan is a nervous system restricted-CSPG expressed essentially by glia in three spliced variants: two receptor forms and the secreted isoform phosphacan. The mouse homolog of phosphacan is DSD-1/ Proteoglycan which shares 97% homology with rat

phosphacan (Faissner et al., 1994; Garwood et al., 1999). The receptor forms are predominantly found in glial progenitors of the proliferative zones and their expression declines during early brain development whereas phosphacan increases dramatically at perinatal ages and remains highly expressed in the adult (Maurel et al., 1994; Canoll et al., 1996; Sakurai et al., 1996; Margolis et al., 1996). RPTPB/phosphacan binds to cell adhesion molecules including NCAM and F3/contactin and ECM proteins such as tenascin-C and -R. RPTPß forms promote cell adhesion, neurite growth and migration (Peles et al., 1995; Sakurai et al., 1997; Maeda and Noda, 1998). Phosphacan could oppose RPTPB by competing for binding sites but it can also directly inhibite or stimulate neurite outgrowth through its core glycoprotein or CS chains according to neuron types (Garwood et al., 1999; Inatani et al., 2001). Hence, modifications in the expression and glycanation of the different RPTPB/phosphacan isoforms after injury could influence CNS repair. In this report, we have analyzed the postlesional expression of the different RPTPB/phosphacan isoforms and of phosphacan glycosaminoglycan epitopes after a cerebral cortex stab wound injury and examined their expression by various glial cell types and the effects of injury-related cytokines on their production. Finally, we have explored the influence of phosphacan on neurite outgrowth from cortical neurons.

MATERIALS AND METHODS

Cytokines, ECM molecules and primary antibodies

Recombinant cytokines: human Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1), rat Interleukin 1 β (IL1 β), rat Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), human Epidermal Growth Factor (EGF), human Transforming Growth Factor α (TGF α), human Platelet Derived Growth Factor-AB (PDGF-AB), rat Tumor Necrosis Factor α (TNF α) and rat Interferon γ (IFN γ) were from R&D Systems (Abingdon, Oxon, UK). Human basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), mouse Interleukin 6 (IL6) and human Leukemia Inhibitory factor (LIF) were from Boehringer Mannheim-Roche (Lewes, UK).

ECM molecules: Laminin-1 (laminin or LAM in the text) isolated from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma was purchased from Sigma. Phosphacan was purified from detergent-free saline-buffered brain lysates from postnatal day 7 to 14 mice as described previously using a combination of affinity chromatography with the monoclonal antibody bound to 473HD Sepharose resin and anion-exchange chromatography (Faissner et al., 1994). For the use in neurite outgrowth assays, it was sterilized by passage through filters with low proteinbinding capacity (Osmonics, Roth, Karlsruhe, Germany) and quantified by the determination of uronic acid equivalents using chondroitin sulfate C (Sigma) as a reference (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973).

Primary antibodies: the mouse monoclonal antibody raised against glial fibrillary acidic protein (GFAP) was from Chemicon (Harrow, UK) while the polyclonal anti-GFAP antibody was from Dako (Ely, UK). 3F8 (mouse monoclonal IgG1, supernatant) and 3H1 (mouse monoclonal IgG2b, supernatant) antibodies were developed by Margolis RU and Margolis RK and obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. 3F8 recognizes an oligosaccharide epitope on phosphacan while 3H1 detects a keratan sulfate epitope on phosphacan-KS (Rauch et al., 1991; Maurel et al., 1994). The monoclonal anti-RPTPß antibody was from Transduction Laboratories (Lexington, KY). The rabbit polyclonal antibody KAF13 DSD-1 recognizing Proteoglycan and RPTPB/phosphacan and the rat monoclonal antibody 473HD which recognizes a chondroitin

sulfate epitope on phosphacan, called DSD-1, have been described previously (Faissner et al., 1994; Clement et al., 1998; Garwood et al., 1999). The mouse monoclonal IgM A2B5 antibody (an O2A cell marker, supernatant) was from American Type Culture Collection, Manassas, VA. The mouse monoclonal 1G2 anti-neurocan antibody was a gift from Dr. A. Oohira. Rabbit polyclonal and mouse monoclonal (supernatant, D3110) anti-NG2 antibodies were gifts from Dr. J. Levine. The monoclonal anti- β -tubulin isotype III (clone SDL.3D10) was from Sigma.

Surgical procedures

Adult female Sprague Dawley rats (Charles River, Margate, UK) weighing approximately 200g were anesthetized under halothane (1ml/100g + 0.4ml intraperitoneal injection) and the lesions were performed unilaterally on the right-hand side of the brain with the other hemisphere serving as a control in the manner described in Asher et al. (2000). Animals were allowed to survive for 1 to 28 days after the operation before they were terminally anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbitone (Euthatal, 3ml/kg) and decapitated. The brains were rapidly removed and immediately dissected or frozen on dry ice and stored at -70°C or prepared for frozen sectioning. Alternatively, for preparing fixed brain sections, animals were perfused with paraformaldehyde (PAF) 4% before decapitation. Brains were then postfixed for 4 h in PAF 4% and then transferred to PBS Sucrose 30%. All procedures were conducted in compliance with the UK Animals Scientific Procedures Act 1986.

Immunohistochemistry immunocytochemistry and

Microtome sections (40 μ m) were cut from fixed brains. They were incubated in TBS-Triton 0.2% (TBS-T) +3% sheep serum for 1h at room temperature. The sections were then double immunostained with either a combination of mouse monoclonal anti-GFAP (1:400) or anti-NG2 (1:4) and the polyclonal KAF13 antibody (1:100) or a combination of polyclonal anti-GFAP (1:300) or polyclonal anti-NG2 (1:250) and 3F8 (1:4) diluted in TBS-T + 1% sheep serum overnight at room temperature. After 3 washes (10 min) in TBS, sections were incubated with sheep biotinylated anti-mouse immunoglobulins (1:200; Amersham, Little Chalfont, Bucks, UK) and donkey FITC- conjugated anti rabbit immunoglobulins (1:50; Jackson Immunoresearch, Luton, UK) in TBS-T + 1% sheep serum for 4h at room temperature. Finally, after washing, the sections were incubated for 1h with Cy3-streptavidin (1:500, Amersham) and bis-benzimide (1:5000, Sigma) to label the cell nuclei. The sections were mounted in glycerol/TBS (9:1) containing 2.5% (w/v) 1,4 diazabicyclo[2,2,2]octane (DABCO) and 20 mM sodium azide, pH8.6 (DABCOglycerol). The cryostat sections (12 μ m) were incubated in PBS containing 3% BSA (PBS/BSA) for 1h at room temperature or PBS/BSA + 0.02% Triton for fixed tissue and stained for 1-2 h with primary antibodies diluted in PBS/BSA at the same dilutions as above and 473HD was used at 1:200. After 3 washes of 10 min in PBS Tween 0.05%, the sections were incubated with the secondary antibodies at the same dilutions as above for 1h at room temperature. Finally, after washing, the sections were incubated with Cy3-streptavidin and bisbenzimide and mounted as above.

Astrocytes and O2A cells were grown on poly-D-lysine-coated glass coverslips at low density in the same medium and conditions as below, excepted that astrocytes were not treated with Ara-C as they were not confluent. Astrocytes 4% paraformaldehyde, were fixed with incubated for 30 min in PBS containing 10% FCS and 0.01% Triton before double labeling in same buffer with the monoclonal anti-GFAP (1:400) and the polyclonal KAF13 (1:100) antibodies. Cells were then incubated for 1 hr with rhodamine-conjugated anti-rabbit (1:50; Dako) and fluorescein-conjugated anti-mouse Ig (1:50; Dako) and mounted in DABCO-glycerol. Living O2A cells were labeled with the mouse monoclonal IgM A2B5 antibody (1:2) at room temperature after they were placed in Leibovitz's L-15 medium (Life Technologies) containing 2% FCS (L-15/FCS). After washing in L-15/FCS, cells were incubated with fluorescein-conjugated anti-mouse IgM (1:50; Jackson Immunoresearch) in L-15/FCS. Finally, O2A cells were washed three times in L-15 and once in PBS and fixed in cold (-20°C) methanol for 2 min. KAF13 staining was performed on methanol-fixed cells as described above. In all cases specificity of the signals was checked by replacing primary antibodies with non immune rabbit (Dako) or mouse immunoglobulins (Sigma, Dorset, UK).

Cell cultures

Astrocytes

The cells were prepared from the brains of newborn to 2 day-old Sprague-Dawley rats. The

cerebral cortices were freed of meninges and collected in Ca²⁺- and Mg²⁺- free Hank's Balanced Salts Solution (HBSS; Life Technologies, Paisley, UK). The tissue was then cut in small pieces before treatment with trypsin 0.1% in HBSS for 20 min at 37°C. After addition of DNAse (Sigma) and centrifugation, the tissues were triturated in HBSS containing 1% BSA, 0.002% DNAse and 0.05% trypsin inhibitor. Finally, the cells were resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies) containing 10% fetal calf serum (FCS, Harlan Sera Lab, Loughborough, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml UK), streptomycin and 2.5 µg/ml amphotericin B (Fungizone) (all from Sigma) (DMEM FCS 10 %) and dispended (1-2 brains/flask) into 75 cm^2 poly-D-lysine (Sigma)-coated tissue culture flasks (Iwaki, Japan). The medium was replaced next day and subsequently every third day with fresh DMEM FCS 10%.

Between the 8th and 12th days, the cultures were shaken overnight to remove the macrophages and progenitor cells. The adherent cells were passaged into 10 cm diameter poly-D-lysinecoated dishes (Nunc) at a density of 1-2 10⁶ per dish and maintained in 10 ml DMEM FCS 10% until confluence for about 4 days. The medium was then replaced with serum-free medium containing 6.25 µg/ml insulin, 6.25 µg/ml transferrin, 6.25 ng/ml selenious acid, 1.25 mg/ml BSA, 5.35 µg/ml linoleic acid (as ITS+, Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) and 20 µM of the DNA synthesis inhibitor, cytosine –1-β-D arabinofuranosid (Ara-C, Fluka, Dorset, UK). After 4 days in this medium astrocyte monolayers were invariably free of any contaminating progenitor cells, and in particular of any O2A cells as checked by immunostaining. Remaining microglia-like cells were eliminated by treatment with 10 mM L-leucine methyl ester (Sigma) for 30 min. The cells were grown for an additional day in the same serum-free medium without Ara-C. The astrocyte monolayers were then cultivated in 5 ml of the serum-free medium containing the cytokines or growth factors under investigation for 1 to 6 days according to the experiment. Unless stated otherwise, all cytokines or growth factors were tested at a final concentration of 10 ng/ml except for IL6 which was used at 2 ng/ml.

O2A cells

Cultures enriched for O2A progenitor cells were derived from the cells detached from the monolayer during the shaking of the primary cultures. The cell suspension was filtered through 35 and 15 µm nylon mesh and then preplated on uncoated tissue culture plastic (2 x 45 min) to deplete it of macrophages and astrocytes. The nonattached cells were then seeded in poly-D-lysine-coated 35mm diameter wells at a density of $1-2 \ 10^5$ in 1.5 ml of DMEM FCS10%. The cells were allowed to adhere for 2h and the medium was changed to serum-free DMEM supplemented with ITS+, 10 ng/ml bFGF and 10 ng/ml PDGF-AB. After 48h the medium was replaced with the same medium containing the cytokines or growth factors under investigation for 48h.

Neurons

Cerebral cortices were dissected from embryonic day 17 (E17) Sprague-Dawley rats. After removing the striatum and hippocampus, the cerebral cortices were freed of meninges, collected in HBSS, cut in small pieces before treatment with 0.025% trypsin in HBSS for 20 min at 37°C. After addition of DNAse and centrifugation, the tissues were triturated in HBSS containing 1% BSA, 0.002% DNAse and 0.05% trypsin inhibitor. After washing, the cells were resuspended in culture medium consisting of a 1:1 mixture of DMEM and Ham's F12 medium (DMEM/F12) containing 1% N2 supplement (Life Technology), 20U/mlpenicillin and 20 µg/ml streptomycin. The cells were plated at a density of 10^4 cells/cm² in 350 µl per 16mm well containing the coated glasscoverslips. The cells were estimated to be 98% pure neurons judging from morphological and immunocytochemical staining with anti-BIII tubulin antibodies.

Neurite outgrowth assays and morphometry

For preparation of coated substrates, glass coverslips were incubated with 15 µg/ml poly-Dlysine 1h at 37°C in a humidified atmosphere and washed three times with PBS. Subsequently laminin was coated at 5 µg/ml in 100 µl PBS per coverslip for 2h at 37°C and phosphacan was coated at 5µg/ml uronic acid equivalents in 100 µl PBS per coverslip overnight at 37°C in the incubator. In some experiments laminin-coated coverslips were further coated with phosphacan overnight as above. After coating, the coverslips

were washed three times with PBS and transferred to 16 mm plastic culture wells. Chondroitinase ABC (protease-free; Glyko, Oxon, UK) treatment of the coated substrates was subsequently performed with 300 µl of enzyme diluted at 0.05 U/ml in PBS pH8 + BSA 0.01% at 37°C for 3h. The overnight adsorption of various concentrations (0.25 to 8 µg/ml uronic acid equivalents; 100 µl per coverslip) of phosphacan to the poly-D-lysine- or laminincoated substrates was checked by ELISA and saturating coating was found from 4 µg/ml uronic acid equivalents of phosphacan. The efficiency of chondroitinase ABC treatment in removing the CS chains was confirmed using the 473HD antibody in an ELISA assay and the integrity of the substrate after chondroitinase ABC digestion was checked using KAF13. The ELISA was performed as following. The coverslips were blocked for 1h in 5% non-fat dried milk in PBS-0.05% Tween 20 at 37°C. All subsequent steps were performed with this blocking buffer at 37°C. The coverslips were then incubated with 250 µl of KAF13 (1:200) or 473HD (5 µg/ml) for 1h30. All were washed four times for 10 min with PBS-Tween 20 before incubation with peroxydase-conjugated antirabbit Ig or anti-rat IgM (dilutions 1/5000 and 1/10000 respectively; Amersham). After 4 washes with TBS-Tween 20, the coverslips were incubated with the substrate o-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD; (Sigma). The reaction was stopped by adding 3M H₂SO₄ and the colored product was quantified with an ELISA reader at 492 nm. Neurons were fixed after 24h of culture with 4% paraformaldehyde, gently washed with PBS, permeabilized with PBS sheep serum 10% Triton 0.1% and stained using a primary monoclonal antibody raised against βIII tubulin (1:200) and a peroxydaseconjugated anti-mouse Ig (dilution 1:100; Amersham) before revelation with diaminobenzidine (DAB; Sigma). For quantitative morphometry only singly growing cells were measured and only neurites exceeding one cell diameter in length were taken into account. Neurite outgrowth was determined as the fraction of process-bearing cells from at least 100 neurons per coverslip chosen at random and given in percentage. Neurons extending processes were further analysed by measuring the length of their longest neurite using the system Quantimet 500 MC (Leica). Samples of 100 randomly selected neurons were investigated per well. The data were statistically evaluated using non parametric statistics by comparing the distribution of the longest neurites with the Mann-Whitney U-test.

Cell counting

At the end of some experiments, astrocyte and O2A cell cultures were fixed in cold methanol (-20°C) for 2 min. The nuclei of fixed cells were stained with a solution of bis-benzimide (Sigma) diluted 1:5000 in PBS for 30 min at room temperature. After washing and mounting in DABCO-glycerol, blue stained cell nuclei were counted under a fluorescence microscope.

Sample preparation for SDS-PAGE Brain tissue

The brains were dissected while defrosting. A 8-10 mg piece of tissue containing the lesion was excised from the brain while a similar-sized piece was dissected from the same location on the contralateral cortex. The tissue was immediately placed in 1 ml ice-cold extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7) containing protease inhibitor cocktail (Roche) and 2 µg/ml pepstatin. It was then homogenized in a Teflon-glass Dounce homogenizer for 6 min, followed by ultracentrifugation at 100 000g for 20 min at 4°C. The supernatant containing the soluble proteins was frozen at -70°C and represents the first Tris-buffered saline extract and is further called saline extract. One additional extract was made from the pellet in the same way to wash out all soluble material and is called second Tris-buffered saline extract. The pellet was then rehomogenized in the same extraction buffer containing, additionally, 1% Triton X-100 and incubated after extensive vortexing, in a shaker at 4°C for 1 h. After centrifugation, the supernatant containing the detergent-extracted membraneous proteins was collected and frozen. This is called the Triton extract. The protein content of the extracts was determined using the bicinchoninic acid protein assay reagent (Pierce, Chester, UK) using BSA to generate the standard curve. When glycosaminoglycanlyase digestion was performed, samples were buffered at pH 8 by adding Tris 400 mM, sodium acetate 400 mM (10x) containing proteases inhibitors and were digested with 0.05 U/ml of protease-free chondroitinase ABC (chABC) (Glyko, Oxon, UK) for 4h at 37°C.

Cell lysates and conditioned medium

At the end of the experiment the conditioned medium was removed from the cells, placed at 4°C and supplied with a mixture of protease

inhibitors (EDTA (5 mM), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; 1 mM; Sigma), iodoacetamide (0.1 mM) (Fluka), soybean trypsin inhibitor, aprotinin, leupeptin and pepstatin (all at 5 µg/ml and from Sigma) before centrifugation at 1000 g for 10 min to remove cell debris. For the preparation of the cell lysates, the cell monolayers were washed twice in PBS 1X and lysed in solubilization buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 0.5% (v/v) Nonidet-40 (NP-40) and 0.05% (w/v) NaN3, pH 7.4) supplemented with the same mixture of protease inhibitors as above. Cells were then scraped off the culture dish, transferred to tubes, kept on ice for a further 30 min and finally centrifuged at 12000 g to remove insoluble material.

Treatments with chondroitinase ABC were performed as above. In some cases chondroitinase ABC-digested samples were buffered at pH 7 and subsequently digested with 1 U/ml of protease-free keratanase (Seikagaku, Japan) for 3h at 37°C.

Electrophoresis and Western Blot

Proteins were separated by SDS-PAGE in 4 or 5% polyacrylamide gels under reducing conditions, before electrophoretic transfer (300 mA, 1.25h) onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham). The blots were blocked for 1h in 5% non-fat dried milk in TBS-0.05% Tween 20. All subsequent steps were performed with this blocking buffer at room temperature. The blots were then incubated with the primary antibodies: 3F8 (1:50), 3H1 (1:50), anti-RPTPB (1:500), KAF13 (1:1000), 1G2(1:50) or 473HD (1:300; 4-5µg/ml) for 1-2h. Blots were then incubated with peroxydaseconjugated anti-mouse Ig (dilution 1/10000; Amersham) or anti-rabbit IgG (dilution 1/10000; Amersham) or anti-rat IgM (dilution 1/10000, Jackson Immunoresearch) antibodies before exposure to the chemiluminescent substrate ECL or ECL Plus (Amersham). No signal was observed when the primary antibody was omitted. The relative amounts of protein in a given band was estimated by densitometry using the logiciel Bio-1D (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France) after scanning of the autoradiographs with Duoscan T1200 (Agfa).

RNA isolation

The brains were immediately dissected in RNAse-free conditions. A 8-10 mg piece of tissue containing the lesion was excised from the brain while a similar-sized piece was dissected

from the same location on the contralateral cortex. The tissue was then frozen in dry ice before homogenization in a 4M guanidinium thiocyanate solution, followed by mixing with 2M sodium acetate pH4, water-saturated phenol and chloroform/isoamyl alcohol (49:1 v/v) according to the method described by Chomczynski and Sacchi (1987). After two rounds of ethanol precipitation, purified RNA was resuspended in DEPC-treatred water and quantified by spectrophotometry.

Semi-quantitative RT-PCR analysis

For the reverse transcription, 2.5 µg of total RNA and 500 ng of hexameric random primers (Amersham Pharmacia Biotech) were mixed in a total volume of 29 µl. This was incubated at 65°C for 5 minutes and then cooled slowly to room temperature. The reactions were heated at 37°C before the addition of 10 µl of First Strand buffer (Life Technologies Inc.), 2.5 µl 0.1 M dithiothreitol, 2.5 µl 10 mM dNTPs, 1 µl of RNase inhibitor, and 2.5 µl of M-MuLv reverse transcriptase (200 IU/ml) (Life Technologies Inc.). The reactions were incubated for 50 min at 37°C, then at 95°C for 5 minutes. Amplification of isoform-specific **RPTP**β/phosphacan transcripts was performed using 2 µl of reverse transcriptase reaction per 20 µl of PCR reaction with 500 nM of the appropriate sense and antisense primers (see below). The reaction conditions were as follows: 60 mM Tris/HCl pH8.8, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs and 1 IU of Taq polymerase (AGS Gmbh, Heidelberg, Germany) per reaction. Cycling was performed using a thermocycler (PE-9600, Applied Biosystems) starting with a 3 minute denaturation step at 94°C, followed by 23-45 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 55°C and 90 seconds at 72°C, and a final extension step at 72°C for 7 minutes. Quantification of final PCRs products from 1% agarose gels pictures used the NIH Image software (Scion Image, USA). Relative RNA concentrations were quantified using the housekeeping gene, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) which was amplified using the sense 5'-GAG TAT GTC GTG GAG TCT AC and antisense 5'-TGA GCT TCC CGT TCA GCT CT primers (amplicon size 408 bp) and 23 cycles to remain in a linear range. For neurocan amplification, we performed 27 cycles using the sense 5'-ACA TTC CTC GGA TCA AGT GGA C and antisense 5'-GCA TCG CAG TTG TCA AAG CCA T primers and the

amplicon size was 409 bp. For the amplification of the different RPTPB/phosphacan isoforms we performed 45 cycles and used following primers whose relative positions on the transcripts are shown in Fig. 1. Sense primers are n°1: 5'-ACT ACC TAA CAT GAG TTA CG; n°3: 5'-TAT GCT ACC CCA GAA GCA CA; n°5: 5'-TTT GAG ACA CTG AAA GAG; n°7: 5'-AGT ATC CAA CAG TTC AGA and n°8: 5'-CGA GGC TAT CAC GTA TG. Antisense primers were n°2: 5'-AAG AGT CAT CGG CTC CCG TAT; n°4: 5'-TCT GCT GGT GGA CCA GAA TT and n°6: 5'-TTG TGT TTC TTA GGG TGA. Hence, using the following primer combinations, the different isoforms of RPTPB/phosphacan were amplified: Primers 1 and 2 for all forms (amplicon size=650 bp); Primers 3 and 4 for phosphacan (size=421 bp); Primers 5 and 6 for both receptor forms (size=466 bp); Primers 7 and 6 for the long RPTPB (806 bp) and Primers 8 and 6 for the short RPTPB (size=1205 bp; with this primers combination the long receptor theoretical product size of 3752 bp was not amplified in our system).

RESULTS

Western Blot and immunohistochemical analysis of RPTPß/phosphacan expression in response to CNS injury

Western blots for RPTPB (Receptor Protein Tyrosine Phosphatase ß (also known as Protein Tyrosine Phosphatase ζ))/phosphacan can have several bands, because 3 forms can be generated by alternative splicing: the long and short receptor forms (long and short RPTPB) and the secreted non receptor form phosphacan/DSD-1 Proteoglycan (for gene structure and description of the antibodies used see Fig.1). In addition the three forms may be glycanated to varying degrees, producing high molecular weight smears on blots. The core glycoproteins can be visualized as single bands only after removal of the CS chains with chondroitinase ABC (chABC).

In order to analyse the expression of the RPTP β /phosphacan isoforms, we dissected a 0.5 mm strip from around the lesion and from control unlesioned tissue in the equivalent contralateral cerebral cortex region at 1, 4, 7, 14 and 28 days postlesion (dpl). This tissue was first extracted twice in Tris-buffered saline to remove all non-attached molecules, then extracted in Triton to remove membrane attached proteins.

Phosphacan (visualized with the 3F8 and KAF13 antibodies) was seen as a very high molecular weight smear that has been estimated by gel filtration to be ~ 800-1000 kD (Faissner et al., 1994) (Fig. 2A). This resolved to a discrete band at ~ 350-400 kD after digestion with chABC. KAF13 revealed an additional band at ~ 180 kD (Fig. 2A) which could correspond to a proteolytic fragment or to an unglycosylated form of phosphacan whose predicted size from the aminoacid sequence is 180 kD (Garwood et al., 1999). Nearly all the phosphacan was recovered in the first saline extracts; it was undetectable in the second subsequent saline extracts and barely detectable in the Triton extracts (Fig. 2A). The receptor forms were identified by using the anti-RPTPB antibody which binds to their intracellular protein tyrosine phosphatase domain 2 (PTP2). After digestion with chABC, the long and short receptor forms can be visualized with a molecular mass of ~400 kD and ~250 kD respectively. We could detect only the short receptor form, which appeared in the Triton extracts, but not the saline extracts (Fig. 2A). Consistent with its downregulation

with CNS maturation (Sakurai et al., 1996), we were unable to detect the protein corresponding to the long receptor form in adult brain extracts.

Following injury there was decrease of phosphacan levels relative to uninjured cerebral cortex at 1 and 4 dpl and a slight decrease at 7 dpl. At 14 dpl the amount of phosphacan detected in the lesioned tissue had almost returned to normal, and at 28 dpl levels were unchanged (Fig. 2B). Densitometric analysis of four separate experiments blotted with 3F8 revealed a mean \pm SEM reduction of phosphacan expression in response to the injury of 63.9 ± 6.5 and $59.2 \pm 8.6\%$ at 1 and 4 dpl respectively. Similar results were obtained when the blots were labeled with the polyclonal antibody KAF13 instead of 3F8. The 3F8 antibody recognizes an oligosaccharide epitope and does not recognize a keratan sulfate glycoform of phosphacan, termed phosphacan-KS (Rauch et al. 1991; Maurel et al., 1994). The similarity of our results with the two different antibodies therefore shows that the changes in phosphacan are at the level of the core glycoprotein. The band at 180 kD followed the same regulation as the 400 kD signal (data not shown).

In contrast, Western Blot analysis, using the anti-RPTPB antibody, of the corresponding chABCtreated Triton extracts revealed that the expression of the short receptor form remained unchanged after CNS injury (Fig. 2B).

When the Western Blots of the saline extracts were reblotted with the 1G2 antineurocan antibody, a signal migrating at around 275 kD was detected. This corresponds to intact neurocan and followed a different pattern of regulation in response to injury as described previously by Haas et al. (1999) and Asher et al. (2000). Neurocan expression was increased after lesion as early as 1 dpl and increased further at 4 and 7 dpl, then the amounts declined progressively to control levels at 14 and 28 dpl (Fig. 2B). The early decrease of phosphacan that we detected is therefore due to specific injuryinduced modulations of either phosphacan gene expression or its proteolytic degradation, not to a general decrease in protein levels in injured tissue.

To further study the localization of RPTPB/phosphacan at the lesion site, immunohistochemical staining was performed using the two antibodies: KAF13 and 3F8. Consistent with our Western Blot results indicating a decrease of phosphacan at the lesion at 1-7 dpl, the intensity of the staining obtained

with the 3F8 antibody was slightly reduced in the tissue next to the lesion at 4 dpl and, to a lesser extent, at 7 dpl (Fig. 3B and E). As an ECM component, phosphacan produced a diffuse signal in all cortical regions. In the left unlesioned hemisphere, we observed less 3F8 immunoreactivity in the corpus callosum than in the cortex (Fig. 3H). The granular layer of the dentate gyrus was also much less stained with 3F8 (Fig. 3L). The intensity of staining with KAF13 was unchanged or very slightly augmented next to the lesion at 4 and 7 dpl (Fig. 3C and F) compared to same location on contralateral unlesioned cortex (Fig. 3I) and was the same as in normal cortex by 14 dpl (Fig. 3N). The difference between 3F8 and KAF13 stainings at the lesion could be partly due to the fact that, in contrast to the 3F8 antibody, which recognizes phosphacan and the long RPTPß form, the polyclonal KAF13 antibody also recognizes the sRPTPß isoform whose expression is unchanged after lesion according to our Western Blot results. Sections from animals that were not perfused with paraformaldehyde gave identical results to sections from perfused animals.

Around the injuries glial changes reported previously were seen, with a strong increase in GFAP immunoreactivity at 4-14 dpl (Fig. 3A, D and M), and a large increase in the expression of the CSPG NG2 (Fig. 3G).

Regulation of phosphacan glycosaminoglycan epitopes after CNS lesion

Since phosphacan may influence axon growth not only through its core glycoprotein but also through its glycosaminoglycan (GAG) chains, we studied by Western blot the evolution injury of two well characterized after phosphacan glycosaminoglycan epitopes: the DSD-1 epitope associated with chondroitin sulfate D motifs on phosphacan, recognized by the monoclonal antibody 473HD (Faissner et al., 1994; Clement et al., 1998) and a keratan sulfate epitope on a variant of phosphacan called phosphacan-KS recognized by the 3H1 antibody (Rauch et al., 1991; Maurel et al., 1994). After injury phosphacan-KS was reduced up to 14 dpl to a greater extent even than the phosphacan core protein (Fig. 2B). Saline extracts that had not been treated with chABC were analysed for the DSD-1 epitope and, in contrast to phosphacan-KS, the signal for the DSD-1 epitope was increased in the lesioned tissue at 7-14 dpl, and to a lesser extent at 28 dpl (Fig. 2C). At 1 and 4 dpl the DSD-1 epitope and core protein were

equally decreased. By immunohistochemistry the DSD-1 epitope was strongly upregulated around the lesion at 14 dpl, consistent with our Western Blot results (Fig. 3O). These results indicate that, not only the core protein levels, but also the glycanation pattern of phosphacan is transiently modified in the lesioned region, with an increase in the amount of the DSD-1 epitope and decrease in the phosphacan-KS epitope.

Semi-quantitative RT-PCR analysis of the regulation of the mRNA for the different RPTPB/phosphacan isoforms after CNS injury

We used semi-quantitative RT-PCR with primer combinations specific to the various RPTPB/phosphacan isoforms to compare the mRNA levels in tissue dissected from around the lesion site and control cerebral cortex at 2, 4, 7 and 14 dpl. RPTPB/phosphacan mRNA levels were very low compared to neurocan and GAPDH and 45 cycles of amplification were necessary for the detection of the RPTPB/phosphacan amplification products and corresponded to the linear range of the PCR as shown for phosphacan in Fig. 4A. Quantitative analysis of the RPTPß/phosphacan mRNA levels was performed using as an internal standard GAPDH mRNA which was amplified using 23 cycles corresponding to the linear range of the PCR for this gene in our conditions (Fig. 4A). We observed that the levels of phosphacan mRNA were increased by around 30-35% in the lesioned region at 2, 4 and 7 dpl before returning to control levels by 14 dpl as measured by densitometric analysis of the PCR products (Fig. 4B and C). The long RPTPß mRNA was augmented by about 30% at 2 dpl and by around 20% at 4, 7 and 14 dpl in the lesioned tissue while the short receptor isoform mRNA was unchanged or slightly reduced after injury (Fig. 4B and C). By comparison, the neurocan transcript was analysed in the same preparations, and it was found to be upregulated more strongly than the RPTPB/phosphacan transcripts at all times, with an increase reaching almost 110% at 4 dpl. These results suggest that the decrease of phosphacan protein at the lesion site at 1-7 dpl results from down-regulation of protein synthesis or release and/or an increase in extracellular degradation. This must be followed by a transitory increase in phosphacan production sufficient to restore phosphacan control levels. The lack of change in mRNA for the short receptor form correlates with no change in the amount of protein after injury.

Analysis of the RPTPß/phosphacan isoforms and phosphacan glycoforms expressed by astrocytes and oligodendrocyte precursors in vitro

We investigated the expression of the different forms of RPTPß/phosphacan in glia cell cultures by Western blot.

Astrocyte lysates probed with the anti-RPTPß antibody recognizing both receptor forms revealed a smear between 250 and 400 kD in undigested samples (Fig. 5A, lane 1), which resolved into 4 discrete bands (Fig. 5A, lane 2) after chABC treatment. In order to determine which of these bands corresponded to molecules with extracellular domains, we performed a mild trypsinization by treating the astrocytes for 15 min at room temperature with 1 μ g/ml of trypsin in order to degrade the extracellular part of the receptors expressed at the cell surface. Two bands were greatly weakened, one at 400 kD and the other around 250 kD, corresponding to the molecular weights of the long and the short receptor forms respectively (Fig. 5A, lanes 9 and 10). The other bands which were not affected by digestion presumably correspond to immature intracellular forms of the receptors or to nonspecific binding. The polyclonal antibody KAF13, which recognizes all forms of RPTPB/phosphacan, revealed the same 400 and 250 kD bands and also an additional band of just under 400 kD, which is consistent with it being phosphacan (Fig 5A, lane 8).

Analysis of O2A cell lysate with the anti-RPTPß antibody and with KAF13, showed that these cells also express both receptor forms but in different proportions to astrocytes, O2A cells expressing much more of the long receptor form, less of the short receptor form (Fig. 5A, compare lanes 10 with 12 and 7 with 8). The long and the short RPTP β from astrocytes and O2A cells contain keratan sulfate chains as shown by the keratanase-induced shifts of their corresponding bands (Fig. 5A, lanes 3 and 6). It should be noted that the short receptor form lacks most of the glycosaminoglycan chains attachment sites which are located in the segment which is deleted in this form and thus usually does not carry chondroitin sulfate chains (Sakurai et al., 1996). However, the absence of signal at 250 and 400 kD in chABC-untreated lysates from O2A cells suggests that not only the long receptor but also the short RPTPB are so heavily modified with CS chains that they hardly penetrate into the resolving gel where only a

diffuse weak smear could be observed at the top (Fig. 5A, lane 4 compared to 5).

Analysis of conditioned medium (CM) digested with chABC and probed with 3F8 revealed that both astrocytes and O2A cells secrete phosphacan as shown by the presence of a band at ~ 400 kD and densitometric analysis showed that the signal was 2 to 3 times stronger for O2A cells than for astrocytes (Fig. 5B), an observation that was also made when KAF13 was used. The 180 kD band identified with KAF13 was mainly observed in astrocytes CM or lysates suggesting that they produce either a cleavage product of phosphacan or produce high phosphacan unglycosylated amounts of compared to O2A cells (Fig. 5A and B).

There were differences in phosphacan glycanation between O2A cells and astrocytes. O2A phosphacan appears to be more heavily glycanated than astrocyte phosphacan, since the phosphacan smear in undigested samples ran at a higher molecular weight in O2A samples than astrocyte samples (Fig. 5B). The DSD-1 epitope was very strongly present on phosphacan originating from O2A cells while it was hardly detectable on astrocytic phosphacan (Fig 5C). In addition, although both astrocytes and O2A cells produce phosphacan with keratan sulfate chains as underlined by the keratanase-induced shift of phosphacan bands (Fig. 5B), the phosphacan 3H1 keratan sulfate epitope was not detected in astrocytes and seen at very low level in untreated O2A cells (Fig. 5D). The expression of the 3H1 epitope has been shown to be developmentally regulated as it is not expressed before birth and peaks at around 3 weeks postnatal which could explain that cells derived from P0-P2 rats do not express 3H1. Altogether, these results suggest that astrocytes and O2A cells differ not only in their respective expression of the different isoforms but also in the glycanation pattern of phosphacan.

То determine the proportion of astrocytes and O2A cells expressing RPTPB/phosphacan, cells were double stained with GFAP and KAF13 and with A2B5 and KAF13 respectively. All GFAP positive and A2B5 positive cells were costained with KAF13 indicating that all astrocytes and O2A cells were expressing RPTPB/phosphacan in vitro (data not shown). When O2A cells were allowed to differentiate into oligodendrocytes by withdrawal of bFGF and PDGF from the culture RPTPB/phosphacan expression disappeared.

RPTPB/phosphacan was not detected in cell lysates from macrophages derived from newborn rat brain analysed by Western Blot (data not shown).

Influence of cytokines on the expression of the RPTPB/phosphacan isoforms by astrocytes and O2A cells

In order to identify factors that might regulate the expression of RPTPB/phosphacan after CNS injury, we investigated the effects of a range of cytokines and growth factors, known to be released in CNS injuries, on astrocytes and O2A cells cultivated in vitro.

The respective amounts of the receptor isoforms in cell lysates and of phosphacan in the conditioned media of pure confluent astrocytes exposed to cytokines in serum-free medium for 48 h were assessed by quantitative Western Blot using respectively the anti-RPTPB and the 3F8 antibodies. We observed that EGF and TGF α induced a strong upregulation of all forms of RPTPB/phosphacan in astrocytes (Fig. 6A, 6B, 7A and 8A). Consistent with the fact that they bind to the same receptor, EGF-R (Junier, 2000), EGF and TGFa exhibited identical effects on RPTPB/phosphacan expression so that further experiments were conducted only with EGF. In contrast, IFN γ and TNF α strongly reduced the astrocytic expression of phosphacan, while the expression of the receptor forms was not significantly modified (Fig. 6A, 7B, 8B and 8C). TGFB1 induced a lesser decrease in the expression of phosphacan and of the long receptor form in astrocytes (Fig. 6A, 7C and 8D). bFGF, IL1, IL6, CNTF, LIF and PDGF were without significant effects on astrocytic RPTPB/phosphacan expression (Fig. 6). The same results were obtained with the KAF13 antibody and the additional band at 180 kD followed the same regulation as the 400 kD signal (data not shown). In particular, when the blots of the cell lysates were reblotted with KAF13, a signal corresponding to phosphacan could be detected that followed the same regulation pattern as the phosphacan band in the CM blots. This indicates that the modulations of phosphacan expression in the CM of cells after treatment with various cytokines results mainly from the regulation of phosphacan synthesis and not from modulations of phosphacan degradation by proteases in the culture medium. We also tested the effects of some combined cytokine treatments on astrocytes. When 10 ng/ml of EGF was added in combination with 10 ng/ml of TNF α or IFN γ for 48 h, all EGF effects on all

isoforms were completely negated and the amount of the different isoforms was similar to control levels. TGFB1 (10 ng/ml) also completely negated EGF effects on all isoforms. In contrast, when bFGF or CNTF were added in combination with EGF no significant variation for any form was detected compared to EGF alone (Fig. 6B).

Time course experiments indicated that the effects of EGF were already apparent after 1 day on all forms of the molecule and were most robust around 2-4 days (Fig. 7A). The effects of IFN γ and TNF α on phosphacan expression were apparent from 48 h treatments and were sustained after 4 and 6 days exposure (Fig. 7B). In contrast, the level of expression of the receptor forms remained unaffected by IFN γ and TNF α after 4 days of cytokine exposure with some reducing effects appearing only after 6 days. The reduction by TGF β 1 of the expression of phosphacan and of the receptor forms was most apparent after 2-4 days (Fig. 7C).

Dose-response experiments indicated that EGF was effective at 0.1 ng/ml but the largest effects were obtained when astrocytes were treated for 48 h with 10 ng/ml (Fig. 8A). The expression of phosphacan diminished with increasing concentrations of IFNy from 1 ng/ml but receptor forms remained unaffected by 48 h exposure to any IFNy concentration (Fig. 8B). In the case of TNF α , the decrease of phosphacan also became apparent at a concentration of 1ng/ml but was not greater at 10 or 20 ng/ml (Fig. 8C). Phosphacan and the long receptor form were reduced by increasing concentrations of TGF_{β1} from 0.1 to 10 ng/ml but the effects were much less on the short receptor form after 48 h treatments (Fig. 8D).

Using the optimal doses and times measured above, we quantified the effects of EGF, TNF α and IFN γ on the expression of the different RPTPB/phosphacan forms. Three separate astrocyte cultures were treated for 72h and analysed on the same Western Blots. Levels were quantified by densitometry and as each sample was equalized according to total protein content, the results are therefore indicative of either a change in protein synthesis and/or a modulation in degradation (Fig. 9). EGF brought about a fourfold increase in the amount of phosphacan detected in astrocyte culture medium and of the long receptor form in corresponding cell lysates while the short receptor form was increased by only ~ 75% (Fig.9A). IFN γ reduced the expression of phosphacan to ~ 25% of control levels while the expression of the receptor forms was not significantly modified. TNF α reduced phosphacan levels to ~65% of control while the receptor forms were unaffected (Fig. 9B). For TGF β 1 we estimated the variations by densitometric analysis of the blots of 3 independent experiments corresponding to 48 h treatments of the astrocytes with 10 ng/ml of TGF β 1 (mean ± SEM reduction were 53.9 ± 3.7% for phosphacan, 56 ± 14.4% for the long receptor and 14.9 ± 10.6 for the short receptor).

Cell nuclei of astrocyte cultures treated for 48h with 10 ng/ml of EGF, TNF α , IFN γ or TGF β 1 were counted to determine whether the effects of these cytokines were caused by an influence on astrocyte proliferation or survival. None of the factors tested had any significant effect on cell number (data not shown). The absence of any cell proliferation is presumably due to contact inhibition in our confluent astrocyte monolayer cultures.

We tested for cytokine modification of glycanation on phosphacan, using the 473HD antibody to DSD-1 and 3H1 antibody. Neither the DSD-1 nor the 3H1 phosphacan epitopes were modulated by any of the cytokines tested in astrocytes (data not shown).

The influence of cytokines on the expression of the different RPTPB/phosphacan isoforms by O2A cells was investigated, using 3F8 and KAF13 antibodies for analysing CM and the anti-RPTPß antibody to identify the receptor forms in cell lysates. CNTF and LIF induced a slight decrease of phosphacan levels and glycosylation in O2A cells CM (data not shown). This could be linked to partial differentiation of O2A cells into oligodendrocytes during the test as CNTF and LIF have been shown to induce oligodendrocyte differentiation of precursors (Lee et al., 2000). All other cytokines tested at the same concentrations as for astrocytes were without significant effect on RPTPB/phosphacan expression by O2A cells (data not shown) while IFNy was toxic for O2A cells. The number of O2A cells was not significantly modified by any of the cytokines tested for 48 h compared to control (not shown).

Using the two antibodies to epitopes on the glycosaminoglycan chains, we found that the DSD-1 epitope was not regulated by any of the cytokines tested (data not shown). In contrast, the O2A cells' expression of the 3H1 epitope was increased by 10 ng/ml TGFB1 (Fig. 5D) while it was not influenced by the other cytokines tested (data not shown).

Influence of phosphacan on the neurite outgrowth from cortical neurons

The previously published effects of phosphacan on neurite outgrowth are complex, with inhibitory effects on dorsal root ganglion (DRG) neurons and growth promoting effects on hippocampal neurons described (Faissner et al., 1994; Garwood et al., 1999). Since our observations are on cortex, we evaluated the effects of purified phosphacan on neurite outgrowth from embryonic day 17 (E17) cortical neurons as adult cortical neurons do not survive in vitro. First, neurons were grown for 24h on glass coverslips coated with increasing concentrations of phosphacan. The percentage of neurons increased neurite-bearing with augmenting coating concentrations of phosphacan compared to poly-D-lysine substrate. At 5 µg/ml uronic acid equivalents of phosphacan coating concentration the percentage of neurite-bearing cells was increased by about 65% (Fig. 10A and Table 1). The average neurite length was also augmentated with increasing coating concentrations of phosphacan with a mean increase of ~ 60% at 5 μ g/ml (Fig. 10B and Table1). We then examined the effect of phosphacan when it was coated on coverslips previously coated with laminin (5µg/ml), which is a substrate that strongly promotes neurite growth. Increasing concentrations of phosphacan blocked neurite length promotion by laminin. When coated at 5 μ g/ml on the laminin substrate, phosphacan reduced strongly (by 80% as compared to laminin alone) neurite length (Fig. 10B and Table 1). The percentage of neuritebearing cells was also reduced but to a much lesser extent than the neurite length (mean decrease of about 50% compared to laminin). These results reveal dual effects of phosphacan on neurite outgrowth from cortical neurons depending on interacting molecules. To get further insight into the mechanism of action of phosphacan we analysed the role of the CS chains in these effects, using the enzyme chondroitinase ABC to remove the CS chains. We observed that the percentage of neuritebearing cells and the neurite length were reduced by respectively 75 and 65% when the phosphacan substrate was digested with chABC (Fig. 11 and Table 1), indicating that a large part of the neurite elongation promoting properties of phosphacan on cortical neurons are due to the CS chains as shown previously for hippocampal neurons (Faissner et al., 1994). In contrast, the inhibitory effect of phosphacan on neurite outgrowth when coated on laminin was unaffected by chABC treatments suggesting that the inhibitory actions of phosphacan are not exerted by the CS chains and are likely to be mediated by the remaining core glycoprotein (Fig. 11 and Table 1). The neurite growth was unchanged on laminin treated with chABC and the integrity of the phosphacan substrate after chABC treatments was preserved as checked by ELISA (data not shown). These results suggest that phosphacan can promote or inhibit axonal growth of cortical neurons depending on its interactions with other ECM molecules and its spatio-temporal exposure to the neurons.

DISCUSSION

Our results reveal complex differential regulations of RPTP β /phosphacan isoforms at the mRNA, protein and glycosylation levels after CNS injury and in different glial cell types and contribute to better understanding the regulatory mechanisms and the possible influences on axonal regeneration of this CSPG as discussed below.

RPTPB/phosphacan expression and glycanation in injured CNS

We demonstrate that phosphacan levels are substantially decreased during the first week following an adult cerebral cortex lesion, in contrast to most of the CSPGs, including neurocan, brevican, versican, NG2, decorin and biglycan, which are rapidly increased after CNS injury (Levine, 1994; Stichel et al., 1995; Haas et al., 1999; Jaworski et al., 1999; McKeon et al., 1999; Asher et al., 2000; 2002, Thon et al., 2000). Recently, decreased phosphacan protein levels were also reported in astrogliotic tissue from filter implant induced-lesions (McKeon et al., 1999), in kainate-induced seizures models and epileptic rats (Wu et al., 2000; Kurazono et al., 2001) and in spinal cord injuries (Jones et al., 2002). In contrast, we found that the mRNA levels for phosphacan were slightly upregulated after injury as reported in a hippocampal deafferentation model (Snyder et al., 1996) and after sciatic nerve injury (Li et al., 1998). There could be several reasons for the decrease in protein levels, but, in view of the increased mRNA levels after injury, degradation seems the most likely. Wu et al. (2000) showed that the decrease of phosphacan in the hippocampus after kainate-induced seizure is largely due to its proteolysis by plasmin. Alternatively, phosphacan could be processed by injuryinduced metalloproteases as for aggrecan in spinal cord injuries (Lemons et al., 2001; Yong et al., 2001).

We observed that the glycanation pattern of phosphacan is modified after injury as revealed by the reduced expression of the keratan sulfate epitope 3H1 and the increase of the CS epitope DSD-1 present on phosphacan after 7 dpl. The expression of these epitopes has been shown to vary during development. DSD-1 is strongly expressed until the 2 first postnal weeks and then declines whereas 3H1 is undetectable before birth and increases until 3 weeks postnatal (Faissner et al., 1994; MeyerPuttlitz et al., 1995; Margolis et al., 1996). Thus, the glycanation pattern of phosphacan after 7 dpl resembles the one observed during early development. The decrease of the 3H1 keratan sulfate epitope is not necessarily an indication that the overall amount of keratan sulfate on phosphacan is decreased as we observed that glial cells in vitro do not express this epitope although they produced keratan sulfated phosphacan. There may be other alterations in the length and composition of the CS chains induced by injury that remain to be investigated.

Of various CNS glial cell types, we purified show that astrocytes and oligodendrocyte precursors express RPTPß/phosphacan. Reactive astrocytes were reported to express phosphacan in vivo (McKeon et al., 1999) and oligodendrocyte precursors are recruited in large numbers to CNS lesions starting at 3-5dpl (Levine, 1994; Levine et al., 2001). We observed that oligodendrocyte precursors synthesize forms of phosphacan carrying very large amounts of DSD-1 in contrast to astrocytes which make little, in accordance with previous results indicating that maturing astrocytes stop expressing DSD-1 (Faissner et al., 1994). Thus, oligodendrocyte precursors could be mainly responsible for the DSD-1 increase in lesions.

Regulation of RPTPB/phosphacan expression and glycanation by cytokines

EGF and TGF α are increased after a few days following various kinds of CNS injuries or neurodegenerative diseases by injured neurons and reactive astrocytes and EGF-R is transiently overexpressed in reactive astrocytes (Junier, 2000). Therefore, the strong stimulation of phosphacan production in astrocytes by EGF/TGF α suggests that reactive astrocytes contribute along with oligodendrocyte precursorderived phosphacan to the recovery of phosphacan control levels around the lesion site after one week postlesion. Neurocan is another CSPG which is upregulated in astrocytes by EGF (Asher et al., 2000). In contrast, TNF α and IFN γ reduced the astrocytic expression of phosphacan and negated EGF/TGF α stimulations. TNF α is produced mainly by activated microglia in lesions with a peak expression in the first days following CNS injury before falling by 5 dpl (Uno et al., 1997; Streit et al., 1998; Jensen et al., 2000). IFN γ is principally produced by lymphocytes and is normally not detected in the CNS but can be found at the lesion site in the early days following injuries that disrupt the blood brain barrier and allow the penetration of activated lymphocytes in the injured CNS tissue (Popko et al., 1997). Thus, these factors could contribute to decrease phosphacan levels and delay EGF/TGF α stimulatory effects during the first days following CNS injury. IFN γ has also been shown to downregulate the expression of keratan sulfate proteoglycans in microglia (Jander et al., 2000) and could contribute to the phosphacan-KS decrease in injured brain we observed.

Another major cytokine linked to injury responses is TGFB1 which is strongly induced after CNS injury and which is involved in glial scar formation and extracellular matrix remodelling (Flanders et al., 1998). In contrast to neurocan whose astrocytic expression is upregulated by TGFB1 (Asher et al., 2000), RPTPB/phosphacan was slightly reduced by TGFB1 which also completely negated the EGF stimulatory effects. This could also contribute to the injury-induced decrease of phosphacan levels. In contrast to versican which is upregulated by TGFB1 in oligodendrocyte precursors (Asher et al., 2002), phosphacan production was unchanged in TGFB1-treated oligodendrocyte precursors. However we observed that TGFB1 clearly augmented the expression of the keratan sulfate epitope 3H1 by these cells which could help to restore phosphacan-KS levels. In conclusion, the effects of injury-related cytokines on glial cells together with partial proteolysis probably accounts for the changes in phosphacan at the injury site.

Role of RPTPß/phosphacan iso- and glycoforms in axonal growth and regeneration

The effects of RPTPB/phosphacan on axonal growth appear to be very complex depending on the forms, the neuronal types and the binding partners present in the surrounding ECM. The receptor forms have been shown to promote migration and neurite growth of neurons along radial glial cells and to be involved in bidirectional signaling between neurons and glia during development (Grumet et al., 1996; Sakurai et al., 1997). Phosphacan exerts opposing effects on axonal growth depending on neuronal targets. For instance, the neurite growth of neonatal dorsal root ganglion (DRG) explants grown on laminin is inhibited by phosphacan. This effect is associated with the core glycoprotein as it is not relieved by removal of the CS chains (Garwood et al., 1999).

Phosphacan was also shown to inhibit neurite outgrowth of retinal ganglion cells (Inatani et al., 2001). In these cases, phosphacan may inhibit axonal growth by direct effects or by restricting the binding to neurons of growth-promoting molecules such as laminin or interfering with the interactions between adhesion molecules, such as N-CAM and Ng-CAM/L1, and growing neurites. Phosphacan could also act as a competitor for the binding of RPTPß receptor forms to neuronal receptors such as F3/contactin (Milev et al., 1994; Maeda and Noda, 1996; Garwood et al., 1999). In contrast, phosphacan stimulates neurite outgrowth from embryonic hippocampal and mesencephalic neurons and this effect was shown to be mediated by the CS chains and, in particular, by the glycosaminoglycan structure DSD-1 (Faissner et al., 1994). Here, we observed that the neurite outgrowth from cortical neurons was stimulated by phosphacan and that this was mainly mediated by the CS chains. However, depending on its conformation or concentration, some neurite ougrowth promotion could also occur directly through some domains of phosphacan core glycoprotein as shown for the carbonic anhydrase domain (Sakurai et al., 1997). Promotion of neurite extension and of dendritic development but reduced adhesion of cortical neurons by 6**B**4 proteoglycan/phosphacan core glycoprotein has been described (Maeda and Noda, 1996). Interestingly, we observed that phosphacan core glycoprotein inhibited neurite outgrowth from cortical neurons grown on laminin. Phosphacan therefore displays dual effects on neurite outgrowth from cortical neurons depending on other molecules in the environment, and phosphacan effects could also vary according to its glycanation.

A key determinant of the success or failure of regeneration is the composition of the extracellular matrix. The rate of local axonal growth may be regulated by the relative levels of axon growth stimulatory and inhibitory adhesion molecules and CSPGs as well as the organization of the extracellular matrix. The spatio-temporal modifications of RPTPB/phosphacan expression and glycanation after injury affect the extracellular matrix composition and organization and must have complex consequences on axon regeneration depending on the type of neuron and the changes in or interactions with other molecules in the environment. In the cortex, considering global axon growth promoting effects of phosphacan-DSD-1 on cortical neurons, a decrease of its concentration in the early days following the lesion could result in an environment deficient in axon growth permissive molecules relative to growth inhibitory ones such as inhibitory CSPGs that are upregulated, thereby contributing to axonal regeneration failure. In a later phase phosphacan core glycoprotein could restrict the access of neurons to axon growth promoting molecules such as laminin but the upregulation of the DSD-1 epitope could support some axonal growth. Our results should contribute to develop models and to further orientating research in vivo on the respective roles of the phosphacan core glycoprotein and of its CS chains in axonal regeneration. Beyond its effects on axon growth, RPTPB/phosphacan is a ligand for diverse growth factors such as bFGF and pleiotrophin and affects diverse biological functions such as neuronal and glial adhesion, migration and proliferation. Changes in phosphacan concentrations and glycanation in the damaged tissue probably therefore have multiple effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dorothy Gibson, Patricia Schlierenkamp and Valerie Calco for technical assistance and Dr. E. Muir for her help. This work was supported by the German Research Council (DFG, SPP "Molecular and Cellular Basis of CNS Repair" Fa 159/11-1,2). Alexandre Dobbertin was recipient of a postdoctoral fellowship for one year from Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) in Heidelberg where preliminary work on this study was initiated.

REFERENCES

Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Fidler, P.S., Adcock, K.H., Oohira, A., Braistead, J.E., Levine, J.M., Margolis, R.U., Rogers, J.H., and Fawcett, J.W. (2000). Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J. Neurosci.* 20: 2427-2438.

Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Shearer, M.C., Adcock, K.H., Pesheva, P., and Fawcett, J.W. (2002). Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *J. Neurosci.* 22: 2225-2236.

Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489.

Bovolenta, P., Wandosell, F., and Nieto-Sampedro, M. (1993). Characterization of a neurite outgrowth inhibitor expressed after CNS injury. *Eur. J. Neurosci.* 5: 454-465.

Bradbury, E.J., Moon, L.D., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W., and McMahon, S.B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416: 636-640.

Canoll, P.D., Petanceska, S., Schlessinger, J., and Musacchio, J.M. (1996). Three forms of RPTP- β are differentially expressed during gliogenesis in the developing rat brain and during glial cell differentiation in culture. *J. Neurosci. Res.* 44:199-215.

Clement, A.M., Nadanaka, S., Masayama, K., Mandl, C., Sugahara, K., and Faissner, A. (1998). The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 273: 28444-28453.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

Davies, S.J.A., Fitch, M.T., Memberg, S.P., Hall, A.K., Raisman, G., and Silver, J. (1997). Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 390: 680-683.

Davies, S.J.A., Goucher, D.R., Doller, C., and Silver, J. (1999). Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 19: 5810-5822.

Dou, C.L., and Levine, J.M. (1994). Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J. Neurosci.* 14: 7616-7628.

Faissner, A., Clement, A., Lochter, A., Streit, A., Mandl, C., and Schachner, M. (1994). Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J. Cell. Biol.* 126: 783-799.

Fawcett, J.W., and Asher, R.A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 49: 377-391.

Flanders, K.C., Ren, and R.F., Lippa, C.F. (1998). Transforming growth factor-Bs in neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiol.* 54: 71-85.

Friedlander, D.R., Milev, P., Karthikeyan, L., Margolis, R.K., Margolis, R.U., and Grumet, M. (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.* 125: 669-680.

Garwood, J., Schnädelbach, O., Clement, A., Schütte, K., Bach, A., and Faissner, A. (1999). DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. *J. Neurosci.* 19: 3888-3899.

Grumet, M., Friedlander, D.R., and Sakurai, T. (1996). Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3: 319-330.

Haas, C.A., Rauch, U., Thon, N., Merten, T., and Deller, T. (1999). Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 19: 9953-9963.

Hoffman-Kim, D., Lander, A.D., and Jhaveri, S. (1998). Patterns of chondroitin sulfate immunoreactivity in the developing tectum reflect regional differences in glycosaminoglycan biosynthesis. J. Neurosci. 18: 5881-5890.

Inatani, M., Honjo, M., Otori, Y., Oohira, A., Kido, N., Tano, Y., Honda, Y., and Tanihara, H. (2001). Inhibitory effects of neurocan and phosphacan on neurite outgrowth from retinal ganglion cells in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:1930-1938.

Jander, S., Schroeter, M., Fischer, J., and Stoll, G. (2000). Differential regulation of microglial keratan sulfate immunoreactivity by proinflammatory cytokines and colony-stimulating factors. *Glia* 30: 401-410.

Jaworski, D.M., Kelly, G.M., and Hockfield, S. (1999). Intracranial injury acutely induces the expression of the secreted isoform of the CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB/brevican. *Exp. Neurol.* 157: 327-337.

Jensen, M.B., Hegelund, I.V., Lomholt, N.D., Finsen, B., and Owens, T. (2000). IFN_γ enhances microglial reactions to hippocampal axonal degeneration. *J. Neurosci.* 20: 3612-3621.

Jones, L.L., Yamaguchi, Y., Stallcup, W.B., and Tuszynski, M.H. (2002). NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci.* 22: 2792-2803.

Junier, M.P. (2000). What role(s) for TGF α in the central nervous system?. *Progress in Neurobiol.* 62: 443-473.

Kurazono, S., Okamoto, M., Sakiyama, J., Mori, S., Nakata, Y., Fukuoka, J., Amano, S., Oohira, A., and Matsui, H. (2001). Expression of brain specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the developing and adult hippocampus of Ihara's epileptic rats. *Brain Res.* 898: 36-48.

Lee, J.C., Mayer-Proschel, M., and Rao, M.S. (2000). Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30: 105-121.

Lemons, M.L., Howland, D.R., and Anderson, D.K. (1999). Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation. *Exp. Neurol.* 160: 51-65.

Lemons, M.L., Sandy, J.D., Anderson, D.K., and Howland, D.R. (2001). Intact aggrecan and fragments generated by both aggrecanase and metalloproteinase-like activities are present in the developing and adult rat spinal cord and their relative abundance is altered by injury. *J. Neurosci.* 21: 4772-4781.

Letourneau, P.C., Condic, M.L., and Snow, D.M. (1994). Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J. Neurosci.* 14: 915-928.

Levine, J.M. (1994). Increased expression of the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan after brain injury. *J. Neurosci.* 14: 4716-4730.

Levine, J.M., Reynolds, R., and Fawcett, J.W. (2001). The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci.* 24: 39-47.

Li, J., Tullai, J.W., Yu, W.H., and Salton, S.R. (1998). Regulated expression during development and following sciatic nerve injury of mRNAs encoding the receptor tyrosine phosphatase HPTPzeta/RPTPbeta. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 60:77-88.

Maeda, N., and Noda, M. (1996). 6B4 proteoglycan/phosphacan is a repulsive substratum but promotes morphological differentiation of cortical neurons. *Development* 122: 647-658.

Maeda, N., and Noda, M. (1998). Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase ζ /RPTP β and its ligand pleitrophin/heparin binding growth associated molecule (HB-CAM) in neuronal migration. *J. Cell. Biol.* 142: 203-216.

Margolis, R.K., Rauch, U., Maurel, P., and Margolis, R.U. (1996). Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspectives Dev. Neurobiol.* 3: 273-290.

Maurel, P., Rauch, U., Flad, M., Margolis, R.K., and Margolis, R.U. (1994). Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2512-2516.

McKeon, R.J., Schreiber, R.C., Rudge, J.S., and Silver, J. (1991). Reduction of neurite outgrowth

in a model of glial scarring is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J. Neurosci.* 11: 3398-3411.

McKeon, R.J., Höke, A., and Silver, J. (1995). Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mdiated axon growth on astrocytic scars. *Exp. Neurol.* 136: 32-43.

McKeon, R.J., Jurynec, M.J., and Buck, C.R. (1999). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J. Neurosci.* 19: 10778-10788.

Meyer-Puttlitz, B., Milev, P., Junker, E., Zimmer, I., Margolis, R.U., and Margolis, R.K. (1995). Chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of nervous tissue: developmental changes of neurocan and phosphacan. *J. Neurochem.* 65: 2327-2337.

Milev, P., Friedlander, D.R., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Flad, M., Margolis, R.K., Grumet, M., and Margolis, R.U. (1994). Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J. Cell. Biol.* 127: 1703-15.

Moon, L.D., Asher, R.A., Rhodes, K.E., and Fawcett, J.W. (2001). Regeneration of CNS axons back their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat. Neurosci.* 4: 465-466.

Peles, E., Nativ, M., Campbell, P.L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D.O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G.D., Grumet, M., and Schlessinger, J. (1995). The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell* 82: 251-260.

Popko, B., Corbin, J.G., Baerwald, K.D., Dupree, J., and Garcia, A.M. (1997). The effects of interferon-gamma on the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 14: 19-35.

Rauch, U., Gao, P., Janetzko, A., Flaccus, A., Hilgenberg, L., Tekotte, H., Margolis, R.K., and Margolis, R.U. (1991). Isolation and characterization of developmentally regulated chondroitin sulfate and chondroitin/keartan sulfate proteoglycans of brain identified with monoclonal antibodies. J. Biol. Chem. 266: 14785-14801.

Sakurai, T., Friedlander, D.R., and Grumet, M. (1996). Expression of polypeptide variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase beta: the secreted form, phosphacan, increases dramatically during embryonic development and modulates glial cell behavior in vitro. *J. Neurosci. Res.* 43: 694-706.

Sakurai, T., Lustig, M., Nativ, M., Hemperly, J.J., Schlessinger, J., Peles, E., and Grumet, M. (1997). Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta. *J. Cell. Biol.* 136: 907-918.

Schmalfeldt, M., Bandtlow, C.E., Dours-Zimmermann, M.T., Winterhalter, K.H., and Zimmermann, D.R. (2000). Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *J. Cell. Sci.* 113: 807-816.

Smith-Thomas, L.C., Stevens, J., Fok-Seang, J., Faissner, A., Rogers, J.H., and Fawcett, J.W. (1995). Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J. Cell. Sci.* 108: 1307-1315.

Snow, D.M., Steindler, D.A., and Silver, J. (1990). Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier. *Dev. Biol.* 138: 359-376.

Snyder, S.E., Li, J., Schauwecker, P.E., McNeill, T.H., and Salton, S.R. (1996). Comparison of RPTP zeta/beta, phosphacan, and trkB mRNA expression in the developing and adult rat nervous system and induction of RPTP zeta/beta and phosphacan mRNA following brain injury. *Mol. Brain Res.* 40: 79-96.

Stichel, C.C., Kappler, J., Junghans, U., Koops, A., Kresse, H., and Müller, H.W. (1995). Differential expression of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans decorin and biglycan after injury of the adult rat brain. *Brain Res.* 704: 263-274.

Streit, W.J., Semple-Rowland, S.L., Hurley, S.D., Miller, R.C., Popovich, P.G., and Stokes, B.T. (1998). Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for
inflammation and gliosis. *Exp. Neurol.* 152: 74-87.

Thon, N., Haas, C.A., Rauch, U., Merten, T., Fassler, R., Frotscher, M., and Deller, T. (2000). The chondroitin sulphate proteoglycan brevican is upregulated by astrocytes after entorhinal cortex lesions in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 12: 2547-58.

Uno, H., Matsuyama, T., Akita, H., Nishimura, H., and Sugita, M. (1997). Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17: 491-499.

Yamada, H., Fredette, B., Shitara, K., Hagihara, K., Miura, R., Ranscht, B., Stallcup, W.B., and Yamaguchi, Y. (1997). The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheating cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *J. Neurosci.* 17: 7784-7795.

Yick, L.W., Wu, W., So, K.F., Yip, H.K., and Shum, D.K. (2000). Chondroitinase ABC promotes axonal regeneration of Clarke's neurons after spinal cord injury. *Neuroreport* 11:1063-1067.

Yong, V.W., Power, C., Forsyth, P., and Edwards, D.R. (2001). Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 502-11.

Wu, Y.P., Siao, C.J., Lu, W., Sung, T.C., Frohman, M.A., Milev, P., Bugge, T.H., Degen, J.L., Levine, J.M., Margolis, R.U., and Tsirka, S.E. (2000). The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. J. Cell. Biol. 148: 1295-1304.

Zuo, J., Neubauer, D., Dyess, K., Ferguson, T.A., and Muir, D. (1998). Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Exp. Neurol.* 154: 654-662.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Schematic representation of the structural organization of RPTPB/phosphacan and location of the epitopes recognized by the antibodies and of the oligonucleotide primers used in the PCR. The thick lines indicate the protein coding regions and the corresponding domain structure of the proteins. The short RPTPβ is a deletion variant missing 860 amino acids and the curved line represents the splicedout IS region; the dashed line in phosphacan represents the 3'-UTR. Phosphacan is a secreted extracellular variant of the long RPTPB. The orientations and positions of the oligonucleotide primers used in the RT-PCR analysis are indicated by the numbered arrows. The 3F8 antibody recognizes a portion of the extracellular region in the long RPTPB form and secreted phosphacan that is deleted in the short RPTPß form. The anti-RPTPß antibody recognizes epitopes in the C-terminal phosphatase domain common to the long and short RPTPB forms. In some cases we also used the rabbit polyclonal KAF13 which was raised against the mouse phosphacan, also called DSD-1-PG and which recognizes all forms (Garwood et al., 1999). Abbreviations: $RPTP\beta$ = receptor protein tyrosine phosphatase β ; SP = signal peptide; CA = carbonic anhydrase-like; F = fibronectin type III; S = spacer region; IS = intervening sequence; TM = transmembrane region; PTP = protein tyrosine phosphatase; 3'-UTR = 3' untranslated region.

Figure 2. Western Blot analysis of the time course changes in the expression of RPTPB/phosphacan proteins and of phosphacan glycosaminoglycan epitopes DSD-1 and 3H1 in injured cerebral cortex. A: Tris-buffered saline and Triton cerebral cortex extracts were prepared as described in Material and Methods. The extracts were equalized for protein content (50 µg per lane), treated (+) with chondroitinase ABC (chABC) or untreated (-), run in a 5% gel in the presence of a reducing agent and blotted onto PVDF membranes and labeled with 3F8. KAF13 and anti-RPTPB. Almost all phosphacan, detected with 3F8 and KAF13, was recovered in the first saline extracts (saline 1). Without previous chABC treatment, phosphacan migrated as a polydisperse smear ranging from about 800 to 1000 kD. In chABC-treated extracts phosphacan occurs as a ~ 400 kD band. The short (migrating at 250 kD) but not the long RPTPB could be specifically detected in the Triton extracts using the anti-RPTPß antibody.

B: Tris-buffered saline extracts (30 µg per lane) from injured (L) and uninjured (C) cerebral cortex were treated with chABC, run in a 5% gel and corresponding blots were labeled for phosphacan (~ 400 kD, Pcan) with 3F8 before reblotting with the anti-neurocan antibody 1G2 (intact neurocan migrating at ~ 275 kD), and the blots were also labeled with the polyclonal KAF13 and the monoclonal 3H1 antibodies. The Triton extracts (40 µg per lane) were run on separate gels and the blots were labeled with anti-RPTPB. Only the short receptor form migrating at 250 kD could be detected (bottom). The blots presented are representative of four independent experiments. C: Tris-buffered saline extracts (30 µg per lane) from injured (L) and uninjured (C) cerebral cortex that had not been treated with chABC, which removes the DSD-1 epitope, were run in a 4% gel. The blots were first labeled with the 473HD antibody recognizing the DSD-1 epitope before labeling with KAF13 and 3F8 to compare the relative expression of DSD-1 to the core glycoprotein. The respective smear signals around 800-1000 kD for phosphacan are shown. 3 independent experiments were performed. To assess the specificity of the signal obtained with the 473HD antibody, cerebral cortex extracts treated with chABC were run in the same gel (lane: +chABC) and then no signal was obtained with 473HD while KAF13 and 3F8 detected the phosphacan core protein at 400 kD.

Figure 3. Immunohistochemical labeling of RPTPß/phosphacan after a cerebral cortex lesion. Microtome tissue sections were double labeled with GFAP (A, D) and 3F8 (B, E) which recognizes phosphacan and the long receptor form at 4 (A, B) and 7 (D, E) dpl. Stainings with the polyclonal KAF13 antibody in adjacent sections were also performed at 4 (C) and 7 dpl (F). A diffuse immunoreactivity due to the extracellular phosphacan was visible in all cortical regions. RPTPB/phosphacan immunoreactivity appeared as relatively unmodified around the lesion at 4 and 7 dpl compared to the strong upregulated expression of the CSPG NG2 around the lesion at 4 dpl (G). Control unlesioned hemisphere was stained around the corpus callosum under the cortex with 3F8 (H), in the cortex with KAF13 (I) and at the level of the dentate gyrus with GFAP (K), with 3F8 (L) and cell nuclei are in blue (J). Cryostat sections stained with GFAP (M), KAF13 (N) and 473HD (O) at 14 dpl show a strong increase of the expression of the DSD-1 epitope recognized by the 473HD antibody around the lesion while KAF13 immunoreactivity remained unchanged. The images were taken with a 10X objective except images H and O which were taken with a 20X objective. Scale bar, 125 μ m and 62,5 μ m for images H and O.

Figure 4. RT-PCR analysis of time course changes in the expression of RPTPB/phosphacan transcripts following cerebral cortex injury. cDNA prepared from injured (L) and uninjured (C) cerebral cortex tissue dissected at 2, 4, 7 and 14 dpl were subjected to PCR amplification with specific oligonucleotide primer pairs for the different RPTPB/phosphacan isoforms, neurocan and GAPDH as described in Materiel and Methods. UN = cDNA from unoperated animals. A: Phosphacan and GAPDH RT-PCR products separated on a 1% agarose gel after increasing cycles of amplification to determine the linear range of the PCR. B: RT-PCR products separated on a 1% agarose gel. The photograph shows typical amplification products from representative experiments. C: Levels of the mRNA corresponding to the different RPTPB/phosphacan isoforms and to neurocan determined by densitometric analysis of the gels. For each condition the ratio of the different RPTPB/phosphacan isoforms mRNA and of neurocan mRNA amounts to corresponding GAPDH mRNA were calculated and results were then expressed as the mean relative percentage changes in the concentration of the different transcripts in the RNA preparations from the lesioned sides compared to the contralateral equivalent unlesioned side of rats sacrificed at 2, 4, 7 and 14 dpl. The data of 4 RT-PCR from 2 independent experiments were pooled.

Figure 5. Characterization and comparison by Western Blot analysis of the RPTPß/phosphacan isoforms and glycoforms expressed by astrocytes and O2A cells in vitro. A: The expression of the receptor forms was compared in cell lysates of astrocytes and O2A cells. Cell lysates were either untreated (-) or treated (+) with chondroitinase (chABC) alone or with chABC and keratanase (K'ase) in a row. Cell lysates (100 µg/lane for astrocytes and 50 µg/lane for O2A cells) were then separated on a 5% gel, transferred to PVDF membranes which were probed with the anti-RPTPß antibody. In chABC-treated lysates, the long receptor form (RPTP β) and the short receptor form (sRPTP β) were visualized as bands migrating at 400 kD and 250 kD respectively which were sensitive to

trypsin treatments of the living cells before lysis (lanes 9 to 12). The bands corresponding to the receptor forms were also the only ones to be shifted by the keratanase treatment (lanes 3 and 6). When the polyclonal antibody KAF13 (25 μ g lysate/lane for O2A cells and astrocytes; lanes 7 and 8) was used, an additional band under 400 kD was detected corresponding to phosphacan present in the lysates. B: The expression of the soluble form phosphacan, was compared in conditioned medium (CM) from astrocytes and O2A cells using the 3F8 and KAF13 antibodies. Treatments with chABC and keratanase were performed as above. The volumes of CM loaded were adjusted according to an equal conditioning volume/cell culture protein content ratio for both astrocytes and O2A cells cultures. C: The expression of the DSD-1 epitope on astrocyte and O2A cells phosphacan was compared by running equalized CM volumes as above but not treated with chABC in 4% gels. The blots were probed with 473HD, KAF13 and 3F8. D: The presence of the 3H1 epitope was studied by separating chABC-treated CM in 5% gels. The blots were labeled with 3H1, KAF13 and 3F8. TGFB1 (10 ng/ml; 48h treatment) strongly increased the O2A cells expression of the 3H1 epitope without affecting phosphacan core glycoprotein expression.

Figure 6. Influence of various cytokines on RPTPB/phosphacan expression in astrocytes. A: the cells were treated for 48 h with the different cytokines at a concentration of 10 ng/ml (except for IL6 at 2 ng/ml) in serum free conditions as described in Methods. All samples were treated with chABC and equalized amounts of cell lysates (100µg protein) or CM (equalized according to 200µg protein of corresponding cell lysates) were separated on distinct 5% gels. Cell lysates and CM blots were probed using respectively anti-RPTPß and 3F8. The figure is a combination of the signals corresponding to the specific bands for phosphacan (Pcan), the long receptor (RPTP β) or the short receptor (sRPTP β) after different times of exposure of the blots to ECL, to allow the concommitant visualization of non saturating signals for all forms, and is representative of 5 distinct experiments. B: Effects of TGFB1, bFGF, CNTF, TNFa and EGF IFNγ in combination with on RPTPB/phosphacan expression by astrocytes. The cells were treated for 48h with EGF (10 ng/ml) in combination with either TGFB1, bFGF, CNTF, TNF α or IFN γ all added at 10 ng/ml and at the same time as EGF. Samples were treated as above. The blots presented are representative of two independent experiments.

Figure 7. Time course effects of EGF (A), IFNy and TNF α (B) and TGF β 1 (C) on RPTPB/phosphacan expression in astrocytes. Cultured astrocytes were treated with 10 ng/ml of EGF, IFNy, or TNFa for 1, 2, 4, or 6 days or with 10 ng/ml of TGFB1 for 2, 4 or 6 days. For the sixth day time point, cells were resupplemented on the third day with 5ng/ml of cytokine. All samples are chABC treated and equalized amount were loaded (100µg protein for cell lysates and 200µg cell protein equivalent for CM). The separate blots for cell lysates and CM were probed respectively with anti-RPTPß and 3F8. Two experiments were performed in each case

Figure 8. Effects of the concentrations of EGF (A), IFN γ (B), TNF α (C) and TGF β 1 (D) on RPTPB/phosphacan expression in astrocytes. Cultured astrocytes were treated with increasing concentrations of EGF, IFN γ , TNF α or TGF β 1 for 48h. All samples are chABC treated and equalized amount were loaded (100 μ g protein for cell lysates and 200 μ g cell protein equivalent for CM). The separate blots for cell lysates and CM were probed respectively with anti-RPTPB and 3F8. The blots shown are representative of two distinct experiments.

Figure 9. Quantification of the effects of EGF (A), TNF α and IFN γ (B) on RPTP β /phosphacan expression in astrocytes. Three separate cultures of astrocytes were grown in the presence of each cytokine (10 ng/ml) for 72 h. All samples were treated with chABC and equalized amounts of cell lysates (100 µg protein) or CM (200 µg cell protein equivalent) were separated on distinct 5% gels. Cell lysates and CM blots were respectively probed with anti-RPTPB and 3F8. The relative amount of the long and short RPTPß and of phosphacan protein were quantified by densitometry. Results are expressed as percentages of the mean (\pm SD) control value set as 100% (without cytokine treatment). Control and cytokine test values were compared using Student's t test (*: 0.01 ; **: <math>p < 0.01; #: p = 0.07).

Figure 10. Dose-response curve of phosphacan on neurite outgrowth from cortical neurons grown on poly-D-lysine or laminin. E17 cortical neurons were seeded at low density on poly-Dlysine (open squares) or laminin (filled circles) substrate coated with 0, 1, 2 or 5 μ g/ml of phosphacan as described in Methods. After 24h of culture, the neurons were fixed and stained using anti- β III tubulin antibodies. (A) The proportion of neurite-bearing cells (% ± SEM) was determined as the fraction of at least 100 cells per well selected at random. The results of 3 independent experiments were pooled. (B) The average neurite length (μ m ± SEM) was determined by measuring the length of the longest neurite from 100 cells per well selected at random and the results from one representative experiment from 3 independent experiments are shown.

Figure 11. Influence of chABC treatments on neurite outgrowth response to phosphacan coated on poly-D-lysine or laminin. Poly-Dlysine (PDL) and laminin (LAM) substrates were coated with 5 µg/ml of phosphacan (Pcan) or not. ChABC treatments were performed after phosphacan coating as described in Methods. After 24h of culture, the neurons were fixed and stained using anti-BIII tubulin antibodies. (A) The proportion of neurite-bearing cells (% \pm SEM) was determined as the fraction of at least 100 cells per well selected at random. Results were compared by *t* test. *: 0.01 ; **:p < 0.001. The increase of the fraction of neurite-bearing cells on phosphacan and laminin were highly significant compared to PDL. The decrease after chABC treatment of phosphacan was also significant compared to phosphacan. For laminin + phosphacan compared to laminin p= 0.09. The results of pooled data from at least 4 independent experiments are presented. (B) The average neurite length ($\mu m \pm SEM$) was determined by measuring the length of the longest neurite from 100 cells per well selected at random and the results from one representative experiment from at least 5 independent experiments are shown. The significance of the difference between the values of neurite lengths was estimated by the Mann-Whitney Rank Sum test. Neurite length increases on phosphacan and on laminin were highly significant compared to PDL (p < 0.001). The differences between phosphacan + chABC and phosphacan and between laminin + phosphacan and laminin were also highly significant (p <0.001). (C) Neurite outgrowth assays of cortical neurons on PDL (A), phosphacan (B), phosphacan treated with chABC (C), laminin (D), laminin + phosphacan (E) and laminin + phosphacan treated with chABC (F). Neurons were stained against BIII tubulin. Images were taken with a 20X objective. Scale bar, 100 µm.



Figure 1







Figure 3







Figure 4



Figure 5



Figure 6



Figure 7



Figure 8



Figure 9







Figure 10





ETUDE DE LA TENASCINE-C DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'HIPPOCAMPE

ETUDE DE LA TENASCINE-C DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'HIPPOCAMPE

Manuscrit 7

"Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced fibronectin type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/Contactin"

1. Introduction

Lors du développement de l'hippocampe, les neurones établissent des connections précises. Pour cela, des molécules extracellulaires guident le cône de croissance (cf. chapitre 5.1. de l'introduction). La tenascine-C est une molécule de la matrice extracellulaire largement exprimée lors du développement et qui participe à la régulation de l'adhésion, la migration et la croissance axonale. La tenascine-C est une glycoprotéine modulaire, qui présente des domaines EGF et fibronectine de type III. Il existe différentes isoformes de la tenascine-C, certains domaines pouvant subir un épissage alternatif et il a été montré que différents domaines pouvaient avoir différentes fonctions (cf. chapitres 4.3. et 5.2. de l'introduction générale et manuscrit 9).

2. But de l'étude

Lors du développement de l'hippocampe, la tenacine-C est exprimée dans les couches moléculaires où se font la croissance axonale et dendritique et des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que la tenascine-C est promotrice de la croissance neuritique des neurones hippocampiques en culture (Götz et al., 1996). Dans ces travaux, l'utilisation de protéines de fusion bactérienne ont montré que les domaines alternatifs sont responsables de la promotion de la croissance neuritique. Mais le rôle des glycosylations dans l'effet

promoteur et le récepteur impliqué n'ont pas été déterminé. Dans ce but, des protéines de fusion exprimées dans un système eucaryote ont été produites afin de préciser l'effet des différents domaines alternatifs sur la croissance neuritique et d'identifier le récepteur neuronal impliqué.

3. Résultats

Des protéines de fusion correspondant à des domaines de la tenascine-C flanqués du domaine Fc des immunoglobulines humaines et exprimées dans un système eucaryote ont été produites. Afin de déterminer le rôle des différents domaines dans la régulation de la croissance axonale, des cultures de neurones hippocampiques ont été réalisées en utilisant les protéines de fusion purifiées comme substrat. Dans ces conditions, une promotion de la croissance neuritique par les domaines BD et D6 est observée. Des études biochimiques montrent que les domaines BD interagissent avec la molécule d'adhésion cellulaire F3/contactine. Par ailleurs, F3 est exprimé dans le cône de croissance des neurones en culture et est localisé dans les couches moléculaires comme la tenascine-C. Enfin, les tests de croissance neuritique montrent que l'effet promoteur des domaines BD sont inhibés en présence d'anticorps dirigé contre F3/contactine.

4. Conclusions

Cette étude montre que la tenascine-C participe à la régulation de la croissance axonale des neurones dans l'hippocampe par les domaines BD en interagissant avec le récepteur F3/contactine.

On observe que les domaines BD exprimés dans un système eucaryote ont des effets comparables à la protéine TN-C purifiée (Manuscrit 7) alors que les domaines BD exprimés par des bactéries ont des effets significatifs mais moindres (Götz et al., 1996). Cette différence pourrait être due à des glycosylations, les domaines exprimés dans le système eucaryote présentant des modifications de type N-glycosylation (Franck Rigato, manuscrit de thèse), ce qui n'est pas le cas dans le cas d'une expression bactérienne.

On observe que seuls les domaines BD et D6 augmentent la croissance neuritique des neurones hippocampiques. Il a été montré que le domaine D contient une séquence peptidique promotrice de la croissance neuritique (Meiners et al., 2001) mais le domaine D seul n'a pas

d'effet sur la croissance neuritique (Dorries et al., 1996). L'anticorps dirigé contre le récepteur F3 empêche l'action des domaines BD seulement. Il semble donc que le domaine B permette l'interaction avec le récepteur F3 et que le domaine D soit responsable de l'effet sur la croissance. Il est intéressant de noter que les domaines FNIII ont des effets distincts sur la croissance neuritique. Contrairement à ce qui aurait pu être supposé, la forte homologie entre les domaines répétés n'implique pas une redondance des fonctions.

Manuscrit 7

"Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced Fibronectin Type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/Contactin"

Franck Rigato, Jeremy Garwood, Valérie Calco, Nicolas Heck, Catherine Faivre-Sarrailh et Andreas Faissner

Journal of Neuroscience 2002 Vol. 22(15):6596-6609



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Franck Rigato, Jeremy Garwood, Valérie Calco, **Nicolas Heck,** Catherine Faivre-Sarrailh et Andreas Faissner

TENASCIN-C PROMOTES NEURITE OUTGROWTH OF EMBRYONIC HIPPOCAMPAL NEURONS THROUGH THE ALTERNATIVELY SPLICED FIBRONECTIN TYPE III BD DOMAINS VIA ACTIVATION OF THE CELL ADHESION OF THE CELL ADHESION MOLECULE F3/CONTACTIN.

Journal of Neuroscience 2002, vol. 22:6596-6609

Pages 6596-6609 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/22/15/6596?maxtoshow=&HITS=10&hits=10 &RESULTFORMAT=1&author1=HECK&andorexacttitle=and&andorexacttitleabs=an d&andorexactfulltext=and&searchid=1098437621555_1122&stored_search=&FIRSTI NDEX=0&sortspec=relevance&volume=22&journalcode=jneuro

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la connaissance de la matrice extracellulaire (MEC) dans le système nerveux central (SNC). Ils aident à caractériser la composition de la MEC, la formation de celle-ci et les fonctions des molécules qui la composent dans le développement et dans des modèles de pathologies.

1. Résumé des résultats

L'étude menée à l'aide de l'anticorps F1C3 (manuscrits 2 et 3) montre que la MEC du SNC ne contient pas de fibres de collagènes, ce qui est une propriété unique du SNC. L'absence de collagène ne correspond pas au fait que les cellules ne soient pas capables d'exprimer les collagènes, puisque les astrocytes en culture expriment et sécrétent des triples hélices de collagènes fibrillaires. Nos travaux montrent que cette expression est inhibée d'une part par les cellules des méninges, d'autre part par l'action autocrine de l'EGF sur les astrocytes. L'identification de ces deux mécanismes inhibant l'expression des collagènes par les astrocytes permet de conclure que l'absence de fibres de collagènes dans la MEC du SNC est due à une régulation active.

Les manuscrits 5, 6 et 7 présentent des études de phosphacan et de la tenascine-C (TN-C). La localisation de ces protéines dans le SNC embryonnaire correspond à des régions où s'effectue la croissance axonale. Des expériences visant à identifier les récepteurs neuronaux de ces protéines montrent qu'elles interagissent avec les molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines (CAMs). Enfin, des tests de croissance neuritique montrent que phosphacan et la tenascine-C sont respectivement promoteurs de la croissance neuritique des neurones corticaux et hippocampiques. L'identification d'une nouvelle isoforme de phosphacan/RPTPß nommée PSI est présentée dans le manuscrit 5. Cette isoforme de 90kD est sécrétée mais reste associée à la membrane plasmique. Elle ne présente pas de chaînes glycosaminoglycans (GAGs) mais est N-glycosylée. Les expériences d'hybridation *in situ* montrent que PSI est exprimée par les neurones corticaux dans la période postnatale. Cette observation pourrait expliquer les observations divergentes qui ont été publiées concernant l'expression neuronale de phosphacan/RPTPβ. PSI interagit avec les CAMs F3 et L1 et est promotrice de la croissance neuritique des neurones corticaux lorsqu'elle est présentée comme substrat. Lorsque PSI est présente dans le milieu de culture, elle bloque l'effet promoteur de phosphacan présenté comme substrat. Il est proposé que PSI, par compétition avec des récepteur communs à phosphacan, module l'action de phosphacan sur les neurones.

Le rôle de la MEC a été étudié dans le contexte de pathologies. L'expression de phosphacan/RPTP β est régulée dans les sites de lésions (manuscrit 6) ; on observe une baisse d'expression sans doute due à l'action des cytokines inflammatoires TNF α et INF γ , puis un retour à un niveau d'expression normal. L'expression de différentes molécules de la MEC a été étudiée dans un modèle murin de l'épilepsie du lobe temporal (manuscrit 4). Avec l'étude de Matsui et al. (2002), ce travail est le seul qui, à notre connaissance, présente des résultats sur un aussi grand nombre de molécules de la MEC dans un modèle de l'épilepsie. On observe une augmentation de l'expression de la tenascine-C, phosphacan, neurocan et HNK-1 mais pas de la laminine et de la fibronectine. Cette augmentation d'expression est restreinte au gyrus denté où des modifications histopathologiques associées à l'épileptogenèse sont observées, ceci bien que les astrocytes réactifs soient distribués dans toutes les structures de l'hippocampe.

2. Composition et formation de la matrice extracellulaire

2.1. Formation de la matrice extracellulaire

La mise en parallèle des données histologiques et des données issues de la culture cellulaire montre que l'expression des molécules de la MEC est régulée de manière cohérente au cours du développement.

Durant le développement embryonnaire, les neurones prolifèrent, migrent dans le neuroépithélium le long de la glie radiale. Après la migration des neurones, la croissance axonale permet la mise en place des voies nerveuses. Les protéines de la MEC comme la laminine, la tenascine-C ou phosphacan sont localisées dans les zones de migration et de croissance axonale et participent à la régulation des différentes étapes du développement. Ainsi, la tenascine-C et phosphacan, en interagissant avec les CAMs, peuvent réguler la croissance des axones (manuscrit 5, 6 et 7).

Lors de la période postnatale, les astrocytes et les précurseurs d'oligodendrocytes prolifèrent dans les zones ventriculaires, puis migrent pour se positionner dans l'ensemble du tissu nerveux. L'expression de la GFAP débute au premier jour postnatal et atteint un maximum autour du 14^{ème} jour. C'est dans cette période que les pics d'expression de la majorité des protéines de la MEC sont observés. Nos études de trois des protéines de la MEC montrent l'absence d'expression de collagènes (manuscrit 3) et une forte expression de la TN-C (manuscrit 7) et de phosphacan (manuscrit 5). Cette spécificité d'expression est dépendante de facteurs présents dans le SNC. L'EGF, qui est majoritairement exprimé durant la période postnatale, réduit l'expression par les astrocytes des collagènes (manuscrit 3) mais augmente l'expression astrocytaire de phosphacan (manuscrit 6) et de la TN-C (A. Dobbertin et J. Garwood, résultats non publiés). Une expression constitutive des collagènes, phosphacan et TN-C est observée dans les cultures d'astrocytes, mais la formation et la composition de la MEC du SNC est clairement régulée par les cytokines (manuscrits 3 et 6). Ce type de régulation pourrait aussi expliquer les spécificités de localisation, comme par exemple pour la TN-C dans la couche moléculaire de l'hippocampe (manuscrit 7). Les astrocytes ne sont cependant pas l'unique source des protéines de la MEC. L'isoforme PSI (manuscrit 5) et neurocan (manuscrit 4) sont exprimés par les neurones et la tenascine-C pourrait être exprimée par les précurseurs d'oligodendrocytes (Garwood J et Heck N, résultats non publiés).

L'établissement de la membrane basale localisée entre les cellules des méninges et de la *glia limitans* commence au 19^{ème} jour embryonnaire et s'achève au 21^{ème} jour postnatal (cf. chapitre 1.3. de l'introduction générale). Les cellules des méninges expriment des collagènes (manuscrit 3) qui vont former des fibres associées à une lame basale composée entre autres de collagène de type IV et de laminine. Le long de la lame basale, les astrocytes forment une *glia limitans* mais ne participent pas à la production des collagènes de la membrane basale puisque

les cellules des méninges induisent une inhibition de l'expression de collagènes par les astrocytes (manuscrit 3).

2.2. La composition de la matrice extracellulaire correspond à des caractéristiques biophysiques particulières

L'absence des fibres de collagènes dans la MEC du SNC est une propriété unique de ce tissu (manuscrit 3). Cette absence de fibres n'est retrouvée dans les autres tissus tels le cartilage que lors des premières étapes du développement, lorsque les cellules migrent pour former le tissu. Une MEC composée d'acide hyaluronique représenterait un environnement optimal pour la migration et la croissance de prolongements cellulaires (Lee et al., 2000). La formation de gradients de facteurs de croissance et d'agents chemoattracteurs y serait facilitée. L'absence de fibres de collagènes dans le SNC et l'abondance d'acide hyaluronique et de protéoglycans permettrait donc la migration cellulaire (neuronale durant la période embryonnaire et gliale durant la période postnatale), la mise en place des voies nerveuses (les axones devant parcourir de grandes distances dans le tissu) et la myélinisation qui implique la croissance de prolongements cellulaires des précurseurs d'oligodendrocytes et l'interaction avec les axones. Dans le SNC adulte, les caractéristiques de la MEC permettraient une plasticité dont on sait aujourd'hui qu'elle implique par exemple des changements morphologiques de l'arborisation dendritique (Matus, 2000).

Le SNC est entouré par la boîte crânienne et les vértèbres. Sous cette enveloppe osseuse, le SNC est couvert par la dure mère, la pie mère et par une membrane basale acollée au tissu nerveux. Dans le tissu nerveux lui-même, les fibres de collagènes, qui donnent aux tissus une grande partie de leurs propriétés biomécaniques, ne seraient pas nécessaires puisque le SNC est protégé par une enveloppe osseuse des contraintes mécaniques comme les tensions. Le SNC subit cependant des contraintes issues du péristaltisme - la vasodilatation impliquant une compression locale du tissu nerveux (Zarahn, 2001). L'acide hyaluronique et les chaînes glycosaminoglycans des protéoglycans, par leurs caractéristiques biophysiques, pourraient protèger le tissu nerveux de ce type de contraintes (cf. chapitre 3.2.1. de l'introduction). Les chaînes glycosaminoglycans sont sulfatées et les charges négatives attirent des cations qui vont, par osmolarité, retenir des molécules d'eau dans la matrice. L'acide hyaluronique va lui aussi former un « gel hydraté », provoquant une turgescence permettant au tissu de résister à la compression.

La MEC du SNC présente donc une composition unique qui facilite les mouvements cellulaires qui accompagnent le développement et la plasticité chez l'adulte et qui répond aux contraintes de pressions principalement générées par la vasodilatation.

3. La tenascine-C et phosphacan participent à la régulation de la croissance axonale

3.1. Les arguments en faveur

Les travaux présentés montrent que la TN-C et phosphacan participent à la régulation de croissance axonale. L'attribution de cette fonction à ces protéines est supportée par trois types d'arguments.

3.1.1. La tenascine-C et phosphacan sont localisés dans les structures où se fait la mise place des voies nerveuses

L'expression de la TN-C et de phosphacan est observée dans le SNC lorsque les connections neuronales s'établissent. Des techniques de biochimie montrent que la TN-C et phosphacan sont principalement exprimés durant les stades embryonnaire et postnatal (manuscrits 5 et 7). L'observation par immunohistochimie montre que ces protéines sont localisées dans des régions où se fait la croissance axonale. C'est le cas pour la TN-C qui est présente dans la couche moléculaire de l'hippocampe (manuscrit 7) et pour phosphacan qui est exprimé dans le cortex embryonnaire (manuscrit 5).

3.1.2. La tenascine-C et phosphacan modifient la croissance neuritique en culture

Lorsque la TN-C et phosphacan sont utilisés comme substrat de culture, une modification de la longueur moyenne des neurites est observée. Nos études montrent une promotion de la croissance neuritique des neurones hippocampiques par la TN-C et phosphacan (manuscrit 7 ; Garwood et al., 1999) et de celle des neurones corticaux par phosphacan (manuscrits 5 et 6). Mais ces protéines peuvent inhiber la croissance neuritique selon le type neuronal considéré et selon la présence d'autres protéines. Ainsi phosphacan réduit l'effet promoteur de la laminine sur les neurones corticaux et les ganglions de la racine

dorsale lorsque les neurones sont sur un substrat mixte de phosphacan et laminine (Garwood et al., 1999 ; manuscrit 6).

3.1.3. La tenascine-C et phosphacan sont des ligands pour les molécules d'adhésion cellulaire

La TN-C et phosphacan interagissent avec des molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines (CAMs). La TN-C et phosphacan sont des ligands pour les récepteurs F3 et L1 (manuscrits 5 et 7) et il a été montré que ces molécules régulent la croissance axonale (Kamiguchi and Lemmon, 1997). Dans le cas de la TN-C, nous avons montré que l'effet promoteur de la croissance neuritique est dépendant de l'interaction entre la TN-C et F3 (manuscrit 7).

Le profil d'expression *in vivo*, l'identification des récepteurs neuronaux et les effets sur la croissance neuritique observés en culture tendent donc à montrer que la TN-C et phosphacan participent à la régulation de la croissance axonale.

3.2. Mécanismes moléculaires de la régulation de la croissance neuritique par phosphacan/RPTPβ

Nos études sur phosphacan/RPTPβ permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la croissance neuritique. Une protéine bactérienne correspondant à PSI a un effet promoteur sur les neurites de neurones corticaux de souris et l'interaction avec F3 et L1 se fait au niveau de ces domaines (manuscrit 5). Ainsi, il semble que la promotion de la croissance neuritique fasse intervenir la partie N-terminale de phosphacan. La partie N-terminale n'est pas modifiée par des gagosylations, celles-ci se faisant sur la partie centrale du corps protéique. Cependant, phosphacan purifié a un effet promoteur supérieur à celui observé avec la protéine bactérienne (manuscrit 5) et une digestion des GAGs avec la chondroitinase ABC réduit les effets de phosphacan sur les neurones corticaux (manuscrit 6). Les GAGs semblent donc participer à la régulation de la croissance neuritique, ce qui était suggéré par des études antérieures (Faissner et al., 1994 ; Garwood et al., 1999). Ces effets peuvent être directs, puisque les GAGs portées par phosphacan interagissent avec le récepteur TAG-1/axonine-1 (Milev et al., 1996). Ces effets pourraient aussi être indirects ; les GAGs sont linéaires et occupent un volume important, de plus elles portent de nombreuses charges

négatives ; elles pourraient ainsi modifier l'interaction de phosphacan avec des récepteurs, même si ceux-ci lient la partie N-terminale du protéoglycan. Afin de déterminer le mode d'action des GAGs, l'expression de TAG-1/axonine-1 par les neurones corticaux devrait être étudiée et, dans le cas d'une expression de ce récepteur, des tests de croissance neuritique en présence d'un anticorps dirigé contre ce récepteur pourraient déterminer son implication potentielle.

La présence de sucres sur les corps protéiques de phosphacan pourrait apporter un niveau supplémentaire de régulation. Nos études de l'effet de phosphacan sur les neurones corticaux montrent que les GAGs pourraient participer à la régulation de la croissance axonale (manuscrit 6), même si le corps protéique est suffisant pour observer une promotion de la croissance neuritique (manuscrit 5). Il serait maintenant intéressant d'étudier le rôle potentiel des sucres portés par la partie N-terminale de phosphacan et par PSI. L'étude des effets sur la croissance neuritique de phosphacan après digestion des sucres par la N-glycosidase, et l'expression de protéines de fusion dans un système eucaryote – donc l'expression de protéines glycosylées - permettraient d'apporter des éléments de réponses.

L'identification de PSI implique l'existence d'un mécanisme de la régulation de la croissance neuritique par les neurones eux-mêmes. PSI est exprimée par les neurones et pourrait interagir avec les récepteurs F3 et L1. Un test de croissance neuritique montre que PSI pourrait moduler l'action de phosphacan sur la croissance axonale des neurones corticaux par compétition avec les récepteurs (manuscrit 5).

Ces études montrent que les mécanismes d'action de phosphacan/RPTP β sur la croissance neuritique font intervenir des domaines protéiques distincts pour interagir avec les récepteurs neuronaux. De plus les sucres apportés par N-glycoslylation et gagosylation contribuent aux effets des corps protéiques. Enfin, différentes isoformes d'une même protéine pourrait réguler leurs propres effets en interagissant avec des récepteurs communs.

3.3. Conclusions et perspectives

L'ensemble des résultats montre que les protéines de la MEC, TN-C et phosphacan, participent à la régulation de la croissance axonale. Cette régulation implique cependant des paramètres qui rendent l'analyse des mécanismes moléculaires complexe.

3.3.1. Pluralité des récepteurs et pluralité des ligands

La tenascine-C et phosphacan interagissent avec différents récepteurs (manuscrit 5 et 7). Cette pluralité des récepteurs s'explique d'une part par la structure modulaire des protéines de la MEC (les domaines EGF et FNIII de la TN-C interagissent avec différents récepteurs), d'autre part par la présence de sucres (les GAGs sont nécessaires pour l'interaction de phosphacan avec TAG-1, mais pas pour l'interaction avec F3 et L1). Il peut donc y avoir plusieurs sites d'interaction pour plusieurs récepteurs sur une même molécule. De cette facon, ces protéines pourront avoir des effets distincts selon le type neuronal parce que chaque type neuronal exprime différents récepteurs. De plus un même type neuronal peut aussi exprimer plusieurs récepteurs (par exemple L1 et F3, manuscrit 5), ce qui implique qu'une seule protéine de la MEC pourrait induire différents signaux de transduction.

On observe de même une pluralité des ligands. Le récepteur F3 interagit avec phosphacan (Peles et al., 1995), PSI (manuscrit 5) et la TN-C (manucrit 7). Cela signifie que selon le ligand, un même récepteur pourrait intégrer un signal différent. Mais phosphacan et la TN-C sont observés dans des structures communes dans le SNC, donc les récepteur exprimés à la surface neuronale pourraient interagir avec les deux ligands. Cette pluralité des ligands pour un récepteur pourraient impliquer des effets synergiques, mais pourrait aussi impliquer une compétition des ligands et la modulation des effets d'une protéine, comme cela est proposé pour phosphacan et PSI (manuscrit 5).

3.3.2. Régulation par les sucres

La tenascine-C est une protéine modifiée par des sucres apportés par N-glycosylation. Phosphacan est un protéoglycan de type chondroitine sulfate qui est modifié par des glycosylation sur sa partie N-terminale. La présence de saccharides sur les corps protéiques modifient les effets des protéines sur la croissance neuritique (manuscrits 5, 6 et 7). Les sucres pourraient modifier l'interaction des protéines avec leur récepteur. Dans le cas de phosphacan, il a été montré que l'effet promoteur sur la croissance neuritique des neurones hippocampiques était bloqué par l'anticorps 473HD, qui reconnaît un épitope situé dans les GAGs (Faissner et al., 1994) ; et les GAGs pourraient participer à l'effet promoteur du corps protéique sur les neurones corticaux (manuscrit 6). Les GAGs pourraient modifier l'interaction du corps protéique avec des récepteurs ou interagir directement avec des récepteurs comme TAG-1 (cf. 3.2.). Il a ainsi été montré que les GAGs ont des effets propres sur la croissance neuritique (cf. tableau 2 du manuscrit 8). Les motifs saccharidiques portés par les protéines de la MEC sont donc des éléments importants de la régulation de la croissance axonale.

3.3.3. Interaction des protéines de la matrice extracellulaire

Les protéines de la MEC interagissent avec plusieurs récepteurs, et les récepteurs interagissent avec plusieurs ligands, mais il faut aussi considérer que les protéines de la MEC interagissent entre elles. Ainsi, la TN-C et phosphacan interagissent entre eux (Milev et al., 1997). Cette interaction pourrait modifier l'interaction des ces protéines avec leurs récepteurs, particulièrement dans le cas d'une interaction avec un récepteur commun. Dans ce cas, il pourrait y avoir compétition pour l'interaction, ou interaction des deux protéines sur un même récepteur ; ce qui pourrait impliquer une activation du récepteur et des effets différents de ceux observés avec une protéine seule. Des expériences utilisant des combinaisons de protéines de la MEC pourraient révéler des mécanismes moléculaires de la régulation de la croissance neuritique plus complexes que ceux proposés jusqu'ici.

4. Expression de protéines de la matrice extracellulaire dans les pathologies

4.1. Les molécules de la MEC sont exprimées dans un contexte de pathologie

Nous avons étudié l'expression de différentes protéines de la MEC dans deux modèles de pathologies : un modèle de lésion et un modèle d'épilepsie. Nous avons observé des changements de niveau d'expression de différentes protéines. Les protéines de la MEC sont exprimées majoritairement dans les stades développementaux et à un niveau basal chez l'adulte. On remarque que l'expression de ces protéines varie dans les sites de lésions (manuscrit 6) et dans l'hippocampe épileptique (manuscrit 4).

Il est intéressant de noter que les molécules de la MEC sont exprimées en des localisations déjà observées dans les stades développementaux – dans la couche moléculaire du gyrus denté dans le modèle d'épilepsie - ; mais aussi dans des localisations nouvelles – le hilus. De plus cette expression n'inclut pas toutes les molécules de la MEC (manuscrit 4) et ne

concerne pas toutes les isoformes d'une même protéine (manuscrit 6). Ces différences pourraient dépendre de la présence de cytokines, puisque celles-ci modulent l'expression de phosphacan/RPTP β dans les cultures d'astrocytes (manuscrit 6).

4.2. Y a-t-il réapparition de processus développementaux chez l'adulte ?

Dans le cas d'une lésion, un remaniement du tissu est observé, avec notamment l'infiltration des cellules des méninges dans le site de lésion, la formation d'une *glia limitans* et la migration de précurseurs d'oligodendrocytes, mais l'absence de régénération des axones. Dans le cas du modèle d'épilepsie que nous avons étudié, on observe une défasciculation et une croissance des fibres moussues, ainsi que la dispersion des corps cellulaires des neurones des grains. Ces phénomènes sont accompagnés de changements d'expression des molécules de la MEC (manuscrits 4 et 6). L'expression de protéines de la MEC dans les pathologies est donc associée à des modifications histopathologiques. Ces modifications correspondent à des mouvements morphologiques cellulaires – migration, croissance axonale, dispersion. Ces observations semblent aller dans le sens d'une mise en place de mécanismes développementaux dans les situations de pathologies impliquant des changements morphologiques.

La migration cellulaire, la croissance axonale et l'expression des protéines de la MEC sont observés durant les stades du développement et ces protéines participent à la régulation des processus développementaux. L'observation de modifications histopathologiques et de l'expression de protéines de la MEC dans les pathologies semblent donc indiquer une réappartition des mécanismes développementaux chez l'adulte. Cependant, dans le contexte de pathologies, la situation est différente de celle connue dans les stades développementaux. Les neurones sont adultes et l'expression de récepteurs et les voies de transduction activées pourraient être différents de ceux observés pour les neurones embryonnaires et postnataux en cours de différentiation. Les facteurs présents dans l'espace extracellulaire sont différents de ceux présents durant le développement, puisque l'on observe notamment la présence de cytokines inflammatoires. Dans le cas des lésions du SNC, les études actuelles tendent à montrer que les astrocytes réactifs inhibent la régénération (Fawcett and Ascher, 1999), alors que les astrocytes primaires issus du SNC postnatal sont un substrat optimal pour la croissance neuritique (Noble et al., 1984). La réactivité astrocytaire pourrait donc impliquer

un comportement cellulaire différent de celui observé pour les astrocytes dans les stades du développement.

Lors d'apparition de lésion dans le SNC ou lors de l'epileptogenèse, on observe des changements histopathologiques (migration cellulaire, croissance de prolongements) et une expression de protéines de la MEC dont on sait qu'elles modulent la migration et la croissance de prolongements cellulaires. Cependant, si des mécanismes moléculaires présents durant les stades développementaux pourraient participer à la régulation de modifications histopathologiques, il est difficile de supposer une simple réapparition des mécanismes développementaux dans le contexte de pathologies dans le SNC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams JC (2001) Cell-matrix contact structures. Cell Mol Life Sci 58:371-392.

- Agnati LF, Zoli M, Stromberg I, Fuxe K (1995) Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. Neuroscience 69:711-726.
- Ali SA, Pappas IS, Parnavelas JG (1998) Collagen type IV promotes the differentiation of neuronal progenitors and inhibits astroglial differentiation in cortical cell cultures. Brain Res Dev Brain Res 110:31-38.
- Andrikopoulos K, Liu X, Keene DR, Jaenisch R, Ramirez F (1995) Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly. Nat Genet 9:31-36.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. J Neurosci 20:2427-2438.
- Azzi G, Jouis V, Godeau G, Groult N, Robert AM (1989) Immunolocalisation of extracellular matrix macromolecules in the rat spinal cord. Matrix 9:479-485.
- Bahr M, Bonhoeffer F (1994) Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS. Trends Neurosci 17:473-479.
- Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L, Geiger B (2001) Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. Nat Cell Biol 3:466-472.
- Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. Physiol Rev 80:1267-1290.
- Barnea G, Grumet M, Milev P, Silvennoinen O, Levy JB, Sap J, Schlessinger J (1994) Receptor tyrosine phosphatase beta is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular matrix protein tenascin. J Biol Chem 269:14349-14352.
- Bartsch U (1996) The extracellular matrix molecule tenascin-C: expression in vivo and functional characterization in vitro. Prog Neurobiol 49:145-168.
- Bennett VD, Adams SL (1990) Identification of a cartilage-specific promoter within intron 2 of the chick alpha 2(I) collagen gene. J Biol Chem 265:2223-2230.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. Nat Neurosci 4:702-710.
- Bigio MRD (2002) Glial linings of the brain. In: The neural environement (Walz W, ed). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Bignami A, Hosley M, Dahl D (1993) Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. Anat Embryol (Berl) 188:419-433.
- Bornstein P, Sage H (1980) Structurally distinct collagen types. Annu Rev Biochem 49:957-1003.
- Bornstein P, Sage EH (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. Curr Opin Cell Biol 14:608-616.

- Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G (1999) Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. Neuroscience 89:717-729.
- Bovolenta P, Fernaud-Espinosa I (2000) Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. Prog Neurobiol 61:113-132.
- Brakebusch C, Seidenbecher CI, Asztely F, Rauch U, Matthies H, Meyer H, Krug M, Bockers TM, Zhou X, Kreutz MR, Montag D, Gundelfinger ED, Fassler R (2002) Brevicandeficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. Mol Cell Biol 22:7417-7427.
- Brummendorf T, Rathjen FG (1996) Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. Curr Opin Neurobiol 6:584-593.
- Bu J, Akhtar N, Nishiyama A (2001) Transient expression of the NG2 proteoglycan by a subpopulation of activated macrophages in an excitotoxic hippocampal lesion. Glia 34:296-310.
- Bukalo O, Schachner M, Dityatev A (2001) Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. Neuroscience 104:359-369.
- Canoll PD, Petanceska S, Schlessinger J, Musacchio JM (1996) Three forms of RPTP-beta are differentially expressed during gliogenesis in the developing rat brain and during glial cell differentiation in culture. J Neurosci Res 44:199-215.
- Carey DJ (1997) Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. Biochem J 327:1-16.
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. Neuron 27:237-249.
- Celio MR, Blumcke I (1994) Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. Brain Res Brain Res Rev 19:128-145.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L (1998) Perineuronal nets: past and present. Trends Neurosci 21:510-515.
- Chamak B, Prochiantz A (1989) Influence of extracellular matrix proteins on the expression of neuronal polarity. Development 106:483-491.
- Cheah KS, Lau ET, Au PK, Tam PP (1991) Expression of the mouse alpha 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. Development 111:945-953.
- Chicurel ME, Singer RH, Meyer CJ, Ingber DE (1998) Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. Nature 392:730-733.
- Chiquet M (1999) Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. Matrix Biol 18:417-426.
- Chiquet M, Matthisson M, Koch M, Tannheimer M, Chiquet-Ehrismann R (1996) Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. Biochem Cell Biol 74:737-744.
- Chiquet-Ehrismann R, Hagios C, Schenk S (1995) The complexity in regulating the expression of tenascins. Bioessays 17:873-878.
- Choquet D, Felsenfeld DP, Sheetz MP (1997) Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. Cell 88:39-48.
- Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K (1996) Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. J Cell Biol 133:1403-1415.
- Clement AM, Nadanaka S, Masayama K, Mandl C, Sugahara K, Faissner A (1998) The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. J Biol Chem 273:28444-28453.
- Cohen AJ, Lakshmi TR, Niu Z, Trindade J, Billings PC, Adams SL (2002) A novel noncollagenous protein encoded by an alternative transcript of the chick type III collagen gene is expressed in cartilage, bone and muscle. Mech Dev 114:177-180.
- Colige A, Li SW, Sieron AL, Nusgens BV, Prockop DJ, Lapiere CM (1997) cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components. Proc Natl Acad Sci U S A 94:2374-2379.
- Colognato H, Yurchenco PD (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. Dev Dyn 218:213-234.
- Costell M, Gustafsson E, Aszodi A, Morgelin M, Bloch W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, Fassler R (1999) Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. J Cell Biol 147:1109-1122.
- Critchley DR (2000) Focal adhesions the cytoskeletal connection. Curr Opin Cell Biol 12:133-139.
- Culotti JG, Kolodkin AL (1996) Functions of netrins and semaphorins in axon guidance. Curr Opin Neurobiol 6:81-88.
- Culotti JG, Merz DC (1998) DCC and netrins. Curr Opin Cell Biol 10:609-613.
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV (1997) Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. J Cell Biol 136:729-743.
- De Arcangelis A, Georges-Labouesse E (2000) Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. Trends Genet 16:389-395.
- Deller T, Haas CA, Naumann T, Joester A, Faissner A, Frotscher M (1997) Up-regulation of astrocyte-derived tenascin-C correlates with neurite outgrowth in the rat dentate gyrus after unilateral entorhinal cortex lesion. Neuroscience 81:829-846.
- Dickson TC, Mintz CD, Benson DL, Salton SR (2002) Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. J Cell Biol 157:1105-1112.
- Doherty P, Walsh FS (1994) Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. Curr Opin Neurobiol 4:49-55.
- Doherty P, Williams G, Williams EJ (2000) CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. Mol Cell Neurosci 16:283-295.
- Doolittle RF (1995) The multiplicity of domains in proteins. Annu Rev Biochem 64:287-314.
- Dorries U, Taylor J, Xiao Z, Lochter A, Montag D, Schachner M (1996) Distinct effects of recombinant tenascin-C domains on neuronal cell adhesion, growth cone guidance, and neuronal polarity. J Neurosci Res 43:420-438.
- Dou CL, Levine JM (1994) Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. J Neurosci 14:7616-7628.
- Dou CL, Levine JM (1995) Differential effects of glycosaminoglycans on neurite growth on laminin and L1 substrates. J Neurosci 15:8053-8066.
- Dow KE, Wang W (1998) Cell biology of astrocyte proteoglycans. Cell Mol Life Sci 54:567-581.
- Dzamba BJ, Wu H, Jaenisch R, Peters DM (1993) Fibronectin binding site in type I collagen regulates fibronectin fibril formation. J Cell Biol 121:1165-1172.
- Eagleson KL, Ferri RT, Levitt P (1996) Complementary distribution of collagen type IV and the epidermal growth factor receptor in the rat embryonic telencephalon. Cereb Cortex 6:540-549.
- Emerling DE, Lander AD (1996) Inhibitors and promoters of thalamic neuron adhesion and outgrowth in embryonic neocortex: functional association with chondroitin sulfate. Neuron 17:1089-1100.

- Engel J (1989) EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? FEBS Lett 251:1-7.
- Engel M, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK (1996) Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. J Comp Neurol 366:34-43.
- Evers MR, Salmen B, Bukalo O, Rollenhagen A, Bosl MR, Morellini F, Bartsch U, Dityatev A, Schachner M (2002) Impairment of L-type Ca2+ channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. J Neurosci 22:7177-7194.
- Exposito J, Cluzel C, Lethias C, Garrone R (2000) Tracing the evolution of vertebrate fibrillar collagens from an ancestral alpha chain. Matrix Biol 19:275-279.
- Fagotto F, Gumbiner BM (1996) Cell contact-dependent signaling. Dev Biol 180:445-454.
- Faissner A (1997) The tenascin gene family in axon growth and guidance. Cell Tissue Res 290:331-341.
- Faissner A, Kruse J (1990) J1/tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. Neuron 5:627-637.
- Faissner A, Clement A, Lochter A, Streit A, Mandl C, Schachner M (1994) Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. J Cell Biol 126:783-799.
- Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. Brain Res Bull 49:377-391.
- Ferhat L, Chevassus-Au-Louis N, Khrestchatisky M, Ben-Ari Y, Represa A (1996) Seizures induce tenascin-C mRNA expression in neurons. J Neurocytol 25:535-546.
- Ferri RT, Levitt P (1995) Regulation of regional differences in the differentiation of cerebral cortical neurons by EGF family-matrix interactions. Development 121:1151-1160.
- Fidler PS, Schuette K, Asher RA, Dobbertin A, Thornton SR, Calle-Patino Y, Muir E, Levine JM, Geller HM, Rogers JH, Faissner A, Fawcett JW (1999) Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. J Neurosci 19:8778-8788.
- Fields RD, Itoh K (1996) Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. Trends Neurosci 19:473-480.
- Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M (1994) The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. J Cell Biol 125:669-680.
- Garcion E, Faissner A, ffrench-Constant C (2001) Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. Development 128:2485-2496.
- Garwood J, Schnadelbach O, Clement A, Schutte K, Bach A, Faissner A (1999) DSD-1proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. J Neurosci 19:3888-3899.
- Gates MA, Thomas LB, Howard EM, Laywell ED, Sajin B, Faissner A, Gotz B, Silver J, Steindler DA (1995) Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. J Comp Neurol 361:249-266.
- Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. Nat Rev Mol Cell Biol 2:793-805.
- Goldberg H, Helaakoski T, Garrett LA, Karsenty G, Pellegrino A, Lozano G, Maity S, de Crombrugghe B (1992) Tissue-specific expression of the mouse alpha 2(I) collagen promoter. Studies in transgenic mice and in tissue culture cells. J Biol Chem 267:19622-19630.

- Gotz B, Scholze A, Clement A, Joester A, Schutte K, Wigger F, Frank R, Spiess E, Ekblom P, Faissner A (1996) Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. J Cell Biol 132:681-699.
- Graham HK, Holmes DF, Watson RB, Kadler KE (2000) Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen-proteoglycan interaction. J Mol Biol 295:891-902.
- Grumet M (1991) Cell adhesion molecules and their subgroups in the nervous system. Curr Opin Neurobiol 1:370-376.
- Grumet M, Flaccus A, Margolis RU (1993) Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. J Cell Biol 120:815-824.
- Grumet M, Milev P, Sakurai T, Karthikeyan L, Bourdon M, Margolis RK, Margolis RU (1994) Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. J Biol Chem 269:12142-12146.
- Guerreiro C, Cendes F, Li LM, Jones-Gotman M, Andermann F, Dubeau F, Piazzini A, Feindel W (1999) Clinical patterns of patients with temporal lobe epilepsy and pure amygdalar atrophy. Epilepsia 40:453-461.
- Guilhem D, Dreyfus PA, Makiura Y, Suzuki F, Onteniente B (1996) Short increase of BDNF messenger RNA triggers kainic acid-induced neuronal hypertrophy in adult mice. Neuroscience 72:923-931.
- Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell 84:345-357.
- Harris AK, Wild P, Stopak D (1980) Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. Science 208:177-179.
- Harroch S, Palmeri M, Rosenbluth J, Custer A, Okigaki M, Shrager P, Blum M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2000) No obvious abnormality in mice deficient in receptor protein tyrosine phosphatase beta. Mol Cell Biol 20:7706-7715.
- Hartmann U, Maurer P (2001) Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles in vivo. Matrix Biol 20:23-35.
- Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. Annu Rev Neurosci 22:511-539.
- Haunso A, Celio MR, Margolis RK, Menoud PA (1999) Phosphacan immunoreactivity is associated with perineuronal nets around parvalbumin-expressing neurones. Brain Res 834:219-222.
- Haunso A, Ibrahim M, Bartsch U, Letiembre M, Celio MR, Menoud P (2000) Morphology of perineuronal nets in tenascin-R and parvalbumin single and double knockout mice. Brain Res 864:142-145.
- Hay ED (1991) Collagen and other matrix glycoproteins in embryogenesis. In: Cell biology of the extracellular matrix (Hay ED, ed). New York: Plenum Press.
- Hay ED (1993) Extracellular matrix alters epithelial differentiation. Curr Opin Cell Biol 5:1029-1035.
- Heino J (2000) The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. Matrix Biol 19:319-323.
- Herndon ME, Lander AD (1990) A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system. Neuron 4:949-961.
- Hileman RE, Fromm JR, Weiler JM, Linhardt RJ (1998) Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. Bioessays 20:156-167.

Hockfield SSCaS (1996) Central nervous system. In: Extracellular matrix (Comper WD, ed). Amsterdam: Harwood Academic Press.

- Hocking DC, Kowalski K (2002) A cryptic fragment from fibronectin's III1 module localizes to lipid rafts and stimulates cell growth and contractility. J Cell Biol 158:175-184.
- Hoffman KB, Pinkstaff JK, Gall CM, Lynch G (1998) Seizure induced synthesis of fibronectin is rapid and age dependent: implications for long-term potentiation and sprouting. Brain Res 812:209-215.
- Hohenester E, Engel J (2002) Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. Matrix Biol 21:115-128.
- Houser CR (1990) Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. Brain Res 535:195-204.
- Hulmes DJ (2002) Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. J Struct Biol 137:2-10.
- Husmann K, Faissner A, Schachner M (1992) Tenascin promotes cerebellar granule cell migration and neurite outgrowth by different domains in the fibronectin type III repeats. J Cell Biol 116:1475-1486.
- Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69:11-25.
- Hynes RO (1999) Cell adhesion: old and new questions. Trends Cell Biol 9:M33-37.
- Hynes RO, Lander AD (1992) Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. Cell 68:303-322.
- Iozzo RV (1999) The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. J Biol Chem 274:18843-18846.
- Iozzo RV, Murdoch AD (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. Faseb J 10:598-614.
- Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, Scheuer T, Catterall WA (1995) Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. Cell 83:433-442.
- Ivaska J, Reunanen H, Westermarck J, Koivisto L, Kahari VM, Heino J (1999) Integrin alpha2beta1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha2 cytoplasmic tail. J Cell Biol 147:401-416.
- Ivins JK, Yurchenco PD, Lander AD (2000) Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. J Neurosci 20:6551-6560.
- J F Bateman SRLaJAMR (1996) Collagen superfamily. In: Extracellular matrix (Comper WD, ed). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Jhaveri S, Erzurumlu RS, Crossin K (1991) Barrel construction in rodent neocortex: role of thalamic afferents versus extracellular matrix molecules. Proc Natl Acad Sci U S A 88:4489-4493.
- Joester A, Faissner A (1999) Evidence for combinatorial variability of tenascin-C isoforms and developmental regulation in the mouse central nervous system. J Biol Chem 274:17144-17151.
- Joester A, Faissner A (2001) The structure and function of tenascins in the nervous system. Matrix Biol 20:13-22.
- Jones FS, Jones PL (2000a) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. Dev Dyn 218:235-259.
- Jones PL, Jones FS (2000b) Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. Matrix Biol 19:581-596.

- Kamiguchi H, Lemmon V (1997) Neural cell adhesion molecule L1: signaling pathways and growth cone motility. J Neurosci Res 49:1-8.
- Kamiguchi H, Lemmon V (2000a) IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. Curr Opin Cell Biol 12:598-605.
- Kamiguchi H, Lemmon V (2000b) Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. J Neurosci 20:3676-3686.
- Kamiguchi H, Yoshihara F (2001) The role of endocytic 11 trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones. J Neurosci 21:9194-9203.
- Kapoor R, Sakai LY, Funk S, Roux E, Bornstein P, Sage EH (1988) Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices. J Cell Biol 107:721-730.
- Kappler J, Baader SL, Franken S, Pesheva P, Schilling K, Rauch U, Gieselmann V (2002) Tenascins are associated with lipid rafts isolated from mouse brain. Biochem Biophys Res Commun 294:742-747.
- Katoh-Semba R, Matsuda M, Watanabe E, Maeda N, Oohira A (1998) Two types of brain chondroitin sulfate proteoglycan: their distribution and possible functions in the rat embryo. Neurosci Res 31:273-282.
- Keep RF (2002) The blood-brain barrier. In: The neural environment (Walz W, ed). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS (1996) Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. Science 271:360-362.
- Kessler E, Fichard A, Chanut-Delalande H, Brusel M, Ruggiero F (2001) Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) mediates C-terminal processing of procollagen V homotrimer. J Biol Chem 276:27051-27057.
- Kiernan BW, Gotz B, Faissner A, ffrench-Constant C (1996) Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms. Mol Cell Neurosci 7:322-335.
- Kiss JZ, Rougon G (1997) Cell biology of polysialic acid. Curr Opin Neurobiol 7:640-646.
- Kjellen L, Lindahl U (1991) Proteoglycans: structures and interactions [published erratum appears in Annu Rev Biochem 1992;61:following viii]. Annu Rev Biochem 60:443-475.
- Knudson CB, Knudson W (2001) Cartilage proteoglycans. Semin Cell Dev Biol 12:69-78.
- Kohda D, Morton CJ, Parkar AA, Hatanaka H, Inagaki FM, Campbell ID, Day AJ (1996) Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration. Cell 86:767-775.
- Kramer EM, Klein C, Koch T, Boytinck M, Trotter J (1999) Compartmentation of Fyn kinase with glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules in oligodendrocytes facilitates kinase activation during myelination. J Biol Chem 274:29042-29049.
- Kresse H, Schonherr E (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. J Cell Physiol 189:266-274.
- Krueger NX, Saito H (1992) A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP zeta, is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. Proc Natl Acad Sci U S A 89:7417-7421.
- Kurazono S, Okamoto M, Sakiyama J, Mori S, Nakata Y, Fukuoka J, Amano S, Oohira A, Matsui H (2001) Expression of brain specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the developing and adult hippocampus of Ihara's epileptic rats. Brain Res 898:36-48.
- Kypreos KE, Birk D, Trinkaus-Randall V, Hartmann DJ, Sonenshein GE (2000) Type V collagen regulates the assembly of collagen fibrils in cultures of bovine vascular smooth muscle cells. J Cell Biochem 80:146-155.

- Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, Bain SD, Yang Z, Lin MT, Danielson KG, Iozzo RV, LaMarca M, McKinney CE, Ginns EI, Bornstein P (1998) Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. J Cell Biol 140:419-430.
- Lander AD (1993) Proteoglycans in the nervous system. Curr Opin Neurobiol 3:716-723.
- Lander C, Kind P, Maleski M, Hockfield S (1997) A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex. J Neurosci 17:1928-1939.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. Cell 84:359-369.
- Lee JY, Spicer AP (2000) Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. Curr Opin Cell Biol 12:581-586.
- Lehmenkuhler A, Sykova E, Svoboda J, Zilles K, Nicholson C (1993) Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. Neuroscience 55:339-351.
- Leung KK, Ng LJ, Ho KK, Tam PP, Cheah KS (1998) Different cis-regulatory DNA elements mediate developmental stage- and tissue-specific expression of the human COL2A1 gene in transgenic mice. J Cell Biol 141:1291-1300.
- Levine JM (1994) Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. J Neurosci 14:4716-4730.
- Levy JB, Canoll PD, Silvennoinen O, Barnea G, Morse B, Honegger AM, Huang JT, Cannizzaro LA, Park SH, Druck T, et al. (1993) The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. J Biol Chem 268:10573-10581.
- Liddington RC, Ginsberg MH (2002) Integrin activation takes shape. J Cell Biol 158:833-839.
- Liesi P, Kauppila T (2002) Induction of type IV collagen and other basement-membraneassociated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar. Exp Neurol 173:31-45.
- Linsenmayer TF (1991) Collagen. In: Cell biology of the extracellular matrix (Hay ED, ed). New York: Plenum Press.
- Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL (2000) Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. Biophys J 79:144-152.
- Lochter A, Vaughan L, Kaplony A, Prochiantz A, Schachner M, Faissner A (1991) J1/tenascin in substrate-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. J Cell Biol 113:1159-1171.
- Long KE, Lemmon V (2000) Dynamic regulation of cell adhesion molecules during axon outgrowth. J Neurobiol 44:230-245.
- Lukashev ME, Werb Z (1998) ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. Trends Cell Biol 8:437-441.
- Lurton D, El Bahh B, Sundstrom L, Rougier A (1998) Granule cell dispersion is correlated with early epileptic events in human temporal lobe epilepsy. J Neurol Sci 154:133-136.
- Maeda N, Noda M (1998) Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration. J Cell Biol 142:203-216.
- Maeda N, Matsui F, Oohira A (1992) A chondroitin sulfate proteoglycan that is developmentally regulated in the cerebellar mossy fiber system. Dev Biol 151:564-574.
- Maeda N, Hamanaka H, Oohira A, Noda M (1995) Purification, characterization and developmental expression of a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, 6B4 proteoglycan/phosphacan. Neuroscience 67:23-35.

- Maeda N, Nishiwaki T, Shintani T, Hamanaka H, Noda M (1996) 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin- binding growth-associated molecule (HB-GAM). J Biol Chem 271:21446-21452.
- Maleski M, Hockfield S (1997) Glial cells assemble hyaluronan-based pericellular matrices in vitro. Glia 20:193-202.
- Mao JR, Taylor G, Dean WB, Wagner DR, Afzal V, Lotz JC, Rubin EM, Bristow J (2002) Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. Nat Genet 30:421-425.
- Margerison JH, Corsellis JA (1966) Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. Brain 89:499-530.
- Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU (1996) Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. Perspect Dev Neurobiol 3:273-290.
- Margolis RU, Margolis RK (1997) Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. Cell Tissue Res 290:343-348.
- Margolis RU, Margolis RK, Chang LB, Preti C (1975) Glycosaminoglycans of brain during development. Biochemistry 14:85-88.
- Marks MS, Chi-Rosso G, Toole BP (1990) Hyaluronate-binding proteins of murine brain. J Neurochem 54:171-180.
- Matsui F, Kawashima S, Shuo T, Yamauchi S, Tokita Y, Aono S, Keino H, Oohira A (2002) Transient expression of juvenile-type neurocan by reactive astrocytes in adult rat brains injured by kainate-induced seizures as well as surgical incision. Neuroscience 112:773-781.
- Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S (2002) Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. J Neurosci 22:7536-7547.
- Maurel P, Rauch U, Flad M, Margolis RK, Margolis RU (1994) Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. Proc Natl Acad Sci U S A 91:2512-2516.
- McKeon RJ, Hoke A, Silver J (1995) Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. Exp Neurol 136:32-43.
- McKeon RJ, Jurynec MJ, Buck CR (1999) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. J Neurosci 19:10778-10788.
- Meiners S, Nur-e-Kamal MS, Mercado ML (2001) Identification of a neurite outgrowthpromoting motif within the alternatively spliced region of human tenascin-C. J Neurosci 21:7215-7225.
- Meyer-Puttlitz B, Junker E, Margolis RU, Margolis RK (1996) Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. J Comp Neurol 366:44-54.
- Milev P, Meyer-Puttlitz B, Margolis RK, Margolis RU (1995) Complex-type asparaginelinked oligosaccharides on phosphacan and protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta mediate their binding to neural cell adhesion molecules and tenascin. J Biol Chem 270:24650-24653.
- Milev P, Maurel P, Haring M, Margolis RK, Margolis RU (1996) TAG-1/axonin-1 is a highaffinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta, and N-CAM. J Biol Chem 271:15716-15723.

- Milev P, Monnerie H, Popp S, Margolis RK, Margolis RU (1998a) The core protein of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan is a high-affinity ligand of fibroblast growth factor-2 and potentiates its mitogenic activity. J Biol Chem 273:21439-21442.
- Milev P, Fischer D, Haring M, Schulthess T, Margolis RK, Chiquet-Ehrismann R, Margolis RU (1997) The fibrinogen-like globe of tenascin-C mediates its interactions with neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta. J Biol Chem 272:15501-15509.
- Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK, Grumet M, Margolis RU (1994) Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. J Cell Biol 127:1703-1715.
- Milev P, Chiba A, Haring M, Rauvala H, Schachner M, Ranscht B, Margolis RK, Margolis RU (1998b) High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. J Biol Chem 273:6998-7005.
- Milner R, Campbell IL (2002) The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. J Neurosci Res 69:286-291.
- Milner R, Edwards G, Streuli C, Ffrench-Constant C (1996) A role in migration for the alpha V beta 1 integrin expressed on oligodendrocyte precursors. J Neurosci 16:7240-7252.
- Mitrovic N, Dorries U, Schachner M (1994) Expression of the extracellular matrix glycoprotein tenascin in the somatosensory cortex of the mouse during postnatal development: an immunocytochemical and in situ hybridization analysis. J Neurocytol 23:364-378.
- Morgelin M, Heinegard D, Engel J, Paulsson M (1994) The cartilage proteoglycan aggregate: assembly through combined protein-carbohydrate and protein-protein interactions. Biophys Chem 50:113-128.
- Morgelin M, Paulsson M, Hardingham TE, Heinegard D, Engel J (1988) Cartilage proteoglycans. Assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. Biochem J 253:175-185.
- Morris JE (1993) Proteoglycans and the modulation of cell adhesion by steric exclusion. Dev Dyn 196:246-251.
- Mosher DF, Sottile J, Wu C, McDonald JA (1992) Assembly of extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol 4:810-818.
- Mueller BK (1999) Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. Annu Rev Neurosci 22:351-388.
- Muragaki Y, Shiota C, Inoue M, Ooshima A, Olsen BR, Ninomiya Y (1992) alpha 1(VIII)collagen gene transcripts encode a short-chain collagen polypeptide and are expressed by various epithelial, endothelial and mesenchymal cells in newborn mouse tissues. Eur J Biochem 207:895-902.
- Murphy G, Gavrilovic J (1999) Proteolysis and cell migration: creating a path? Curr Opin Cell Biol 11:614-621.
- Myllyharju J, Kivirikko KI (2001) Collagens and collagen-related diseases. Ann Med 33:7-21.
- Naffah-Mazzacoratti MG, Arganaraz GA, Porcionatto MA, Scorza FA, Amado D, Silva R, Bellissimo MI, Nader HB, Cavalheiro EA (1999) Selective alterations of glycosaminoglycans synthesis and proteoglycan expression in rat cortex and hippocampus in pilocarpine-induced epilepsy. Brain Res Bull 50:229-239.
- Nagata S, Saito R, Yamada Y, Fujita N, Watanabe K (2001) Multiple variants of receptortype protein tyrosine phosphatase beta are expressed in the central nervous system of Xenopus. Gene 262:81-88.

Nah HD, Niu Z, Adams SL (1994) An alternative transcript of the chick type III collagen gene that does not encode type III collagen. J Biol Chem 269:16443-16448.

- Nah HD, Bennett VD, Niu Z, Adams SI (1996) Alternative transcript of the chick alpha 2(I) collagen gene is transiently expressed during endochondral bone formation and during development of the central nervous system. Dev Dyn 206:146-158.
- Nakic M, Mitrovic N, Sperk G, Schachner M (1996) Kainic acid activates transient expression of tenascin-C in the adult rat hippocampus. J Neurosci Res 44:355-362.

Nakic M, Manahan-Vaughan D, Reymann KG, Schachner M (1998) Long-term potentiation in vivo increases rat hippocampal tenascin-C expression. J Neurobiol 37:393-404.

- Ness R, David S (1997) Leptomeningeal cells modulate the neurite growth promoting properties of astrocytes in vitro. Glia 19:47-57.
- Nicholson C (1995) Extracellular space as the pathway for neuron-glial cell interaction. In: Neuroglia (Ransom HKB, ed). New York: Oxford University Press.
- Nicholson C, Sykova E (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. Trends Neurosci 21:207-215.
- Nicholson C, Phillips JM, Gardner-Medwin AR (1979) Diffusion from an iontophoretic point source in the brain: role of tortuosity and volume fraction. Brain Res 169:580-584.
- Niederreither K, D'Souza R, Metsaranta M, Eberspaecher H, Toman PD, Vuorio E, De Crombrugghe B (1995) Coordinate patterns of expression of type I and III collagens during mouse development. Matrix Biol 14:705-713.
- Nimni ME (1997) Collagen, structure and function. In: Encyclopedia of human biology: Academic Press.
- Niquet J, Jorquera I, Ben-Ari Y, Represa A (1994) Proliferative astrocytes may express fibronectin-like protein in the hippocampus of epileptic rats. Neurosci Lett 180:13-16.
- Niquet J, Jorquera I, Faissner A, Ben-Ari Y, Represa A (1995) Gliosis and axonal sprouting in the hippocampus of epileptic rats are associated with an increase of tenascin-C immunoreactivity. J Neurocytol 24:611-624.
- Nishiwaki T, Maeda N, Noda M (1998) Characterization and developmental regulation of proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta isoforms. J Biochem (Tokyo) 123:458-467.
- Ohyama K, Kawano H, Asou H, Fukuda T, Oohira A, Uyemura K, Kawamura K (1998) Coordinate expression of L1 and 6B4 proteoglycan/phosphacan is correlated with the migration of mesencephalic dopaminergic neurons in mice. Brain Res Dev Brain Res 107:219-226.
- Olsen TR (1991) Collagen biosynthesis. In: Cell biology of the extracellular matrix (Hay ED, ed). New York: Plenum Press.
- Oohashi T, Hirakawa S, Bekku Y, Rauch U, Zimmermann DR, Su WD, Ohtsuka A, Murakami T, Ninomiya Y (2002) Bral1, a brain-specific link protein, colocalizing with the versican V2 isoform at the nodes of Ranvier in developing and adult mouse central nervous systems. Mol Cell Neurosci 19:43-57.
- Oohira A, Matsui F, Tokita Y, Yamauchi S, Aono S (2000) Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. Arch Biochem Biophys 374:24-34.
- Paulus W, Sage EH, Jellinger K, Roggendorf W (1992) Type VIII collagen in the normal and diseased human brain. Acta Histochem Suppl 42:195-199.
- Peles E, Nativ M, Campbell PL, Sakurai T, Martinez R, Lev S, Clary DO, Schilling J, Barnea G, Plowman GD, et al. (1995) The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. Cell 82:251-260.

- Pindzola RR, Doller C, Silver J (1993) Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions. Dev Biol 156:34-48.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. Science 298:1248-1251.
- Pozzi A, Wary KK, Giancotti FG, Gardner HA (1998) Integrin alpha1beta1 mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo. J Cell Biol 142:587-594.
- Ratcliffe CF, Qu Y, McCormick KA, Tibbs VC, Dixon JE, Scheuer T, Catterall WA (2000) A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta. Nat Neurosci 3:437-444.
- Rauch U (1997) Modeling an extracellular environment for axonal pathfinding and fasciculation in the central nervous system. Cell Tissue Res 290:349-356.
- Rauch U, Clement A, Retzler C, Frohlich L, Fassler R, Gohring W, Faissner A (1997) Mapping of a defined neurocan binding site to distinct domains of tenascin-C. J Biol Chem 272:26905-26912.
- Rauch U, Gao P, Janetzko A, Flaccus A, Hilgenberg L, Tekotte H, Margolis RK, Margolis RU (1991) Isolation and characterization of developmentally regulated chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of brain identified with monoclonal antibodies. J Biol Chem 266:14785-14801.
- Retzler C, Gohring W, Rauch U (1996) Analysis of neurocan structures interacting with the neural cell adhesion molecule N-CAM. J Biol Chem 271:27304-27310.
- Riban V, Bouilleret V, Pham-Le BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A (2002) Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience 112:101-111.
- Riikonen T, Westermarck J, Koivisto L, Broberg A, Kahari VM, Heino J (1995) Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1(I) gene expression. J Biol Chem 270:13548-13552.
- Ronn LC, Berezin V, Bock E (2000) The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. Int J Dev Neurosci 18:193-199.
- Roskelley CD, Srebrow A, Bissell MJ (1995) A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression. Curr Opin Cell Biol 7:736-747.
- Ruoslahti E (1988) Structure and biology of proteoglycans. Annu Rev Cell Biol 4:229-255.
- Sakai K, Hiripi L, Glumoff V, Brandau O, Eerola R, Vuorio E, Bosze Z, Fassler R, Aszodi A (2001) Stage-and tissue-specific expression of a Col2a1-Cre fusion gene in transgenic mice. Matrix Biol 19:761-767.
- Sakurai T, Lustig M, Nativ M, Hemperly JJ, Schlessinger J, Peles E, Grumet M (1997) Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta. J Cell Biol 136:907-918.
- Schonherr E, Hausser HJ (2000) Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. Dev Immunol 7:89-101.
- Schumacher S, Jung M, Norenberg U, Dorner A, Chiquet-Ehrismann R, Stuermer CA, Rathjen FG (2001) CALEB binds via its acidic stretch to the fibrinogen-like domain of tenascin-C or tenascin-R and its expression is dynamically regulated after optic nerve lesion. J Biol Chem 276:7337-7345.
- Shapiro SD (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. Curr Opin Cell Biol 10:602-608.
- Shearer MC, Fawcett JW (2001) The astrocyte/meningeal cell interface--a barrier to successful nerve regeneration? Cell Tissue Res 305:267-273.
- Shee WL, Ong WY, Lim TM (1998) Distribution of perlecan in mouse hippocampus following intracerebroventricular kainate injections. Brain Res 799:292-300.

- Sheetz MP, Felsenfeld DP, Galbraith CG (1998) Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. Trends Cell Biol 8:51-54.
- Shellswell GB, Restall DJ, Duance VC, Bailey AJ (1979) Identification and differential distribution of collagen types in the central and peripheral nervous systems. FEBS Lett 106:305-308.
- Sheppard AM, Hamilton SK, Pearlman AL (1991) Changes in the distribution of extracellular matrix components accompany early morphogenetic events of mammalian cortical development. J Neurosci 11:3928-3942.
- Sherman LS, Struve JN, Rangwala R, Wallingford NM, Tuohy TM, Kuntz Ct (2002) Hyaluronate-based extracellular matrix: keeping glia in their place. Glia 38:93-102.
- Sherratt MJ, Graham HK, Kielty CM, Holmes DF (2000) ECM macromolecules: rotary shadowing and scanning transmission electron microscopy. Methods Mol Biol 139:119-132.
- Shintani T, Watanabe E, Maeda N, Noda M (1998) Neurons as well as astrocytes express proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta: analysis of mice in which the PTPzeta/RPTPbeta gene was replaced with the LacZ gene. Neurosci Lett 247:135-138.
- Shitara K, Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y (1994) Brain-specific receptor-type protein-tyrosine phosphatase RPTP beta is a chondroitin sulfate proteoglycan in vivo. J Biol Chem 269:20189-20193.
- Small DH, Mok SS, Williamson TG, Nurcombe V (1996) Role of proteoglycans in neural development, regeneration, and the aging brain. J Neurochem 67:889-899.
- Snellman A, Keranen MR, Hagg PO, Lamberg A, Hiltunen JK, Kivirikko KI, Pihlajaniemi T (2000) Type XIII collagen forms homotrimers with three triple helical collagenous domains and its association into disulfide-bonded trimers is enhanced by prolyl 4hydroxylase. J Biol Chem 275:8936-8944.
- Snow DM, Letourneau PC (1992) Neurite outgrowth on a step gradient of chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PG). J Neurobiol 23:322-336.
- Snow DM, Lemmon V, Carrino DA, Caplan AI, Silver J (1990) Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. Exp Neurol 109:111-130.
- Snyder SE, Li J, Schauwecker PE, McNeill TH, Salton SR (1996) Comparison of RPTP zeta/beta, phosphacan, and trkB mRNA expression in the developing and adult rat nervous system and induction of RPTP zeta/beta and phosphacan mRNA following brain injury. Brain Res Mol Brain Res 40:79-96.
- Song HJ, Ming GL, Poo MM (1997) cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. Nature 388:275-279.
- Spencer SS (1996) Long-term outcome after epilepsy surgery. Epilepsia 37:807-813.
- Srinivasan J, Schachner M, Catterall WA (1998) Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15753-15757.
- Steindler DA (1993) Glial boundaries in the developing nervous system. Annu Rev Neurosci 16:445-470.
- Stichel CC, Niermann H, D'Urso D, Lausberg F, Hermanns S, Muller HW (1999a) Basal membrane-depleted scar in lesioned CNS: characteristics and relationships with regenerating axons. Neuroscience 93:321-333.
- Stichel CC, Hermanns S, Luhmann HJ, Lausberg F, Niermann H, D'Urso D, Servos G, Hartwig HG, Muller HW (1999b) Inhibition of collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons. Eur J Neurosci 11:632-646.

Strekalova T, Sun M, Sibbe M, Evers M, Dityatev A, Gass P, Schachner M (2002) Fibronectin domains of extracellular matrix molecule tenascin-C modulate hippocampal learning and synaptic plasticity. Mol Cell Neurosci 21:173-187.

- Sumiyoshi H, Inoguchi K, Khaleduzzaman M, Ninomiya Y, Yoshioka H (1997) Ubiquitous expression of the alpha1(XIX) collagen gene (Col19a1) during mouse embryogenesis becomes restricted to a few tissues in the adult organism. J Biol Chem 272:17104-17111.
- Sund M, Vaisanen T, Kaukinen S, Ilves M, Tu H, Autio-Harmainen H, Rauvala H, Pihlajaniemi T (2001) Distinct expression of type XIII collagen in neuronal structures and other tissues during mouse development. Matrix Biol 20:215-231.
- Suter DM, Forscher P (1998) An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. Curr Opin Neurobiol 8:106-116.
- Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sorensen JC, Onteniente B (1995) Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. Neuroscience 64:665-674.
- Swindle CS, Tran KT, Johnson TD, Banerjee P, Mayes AM, Griffith L, Wells A (2001) Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. J Cell Biol 154:459-468.
- Takahara K, Kessler E, Biniaminov L, Brusel M, Eddy RL, Jani-Sait S, Shows TB, Greenspan DS (1994) Type I procollagen COOH-terminal proteinase enhancer protein: identification, primary structure, and chromosomal localization of the cognate human gene (PCOLCE). J Biol Chem 269:26280-26285.
- Tanaka M, Maeda N, Noda M, Marunouchi T (2003) A chondroitin sulfate proteoglycan PTPzeta /RPTPbeta regulates the morphogenesis of Purkinje cell dendrites in the developing cerebellum. J Neurosci 23:2804-2814.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. Science 274:1123-1133.
- Thomas LB, Gates MA, Steindler DA (1996) Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. Glia 17:1-14.
- Timpl R, Brown JC (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. Bioessays 18:123-132.
- Tsai HH, Miller RH (2002) Glial cell migration directed by axon guidance cues. Trends Neurosci 25:173-175; discussion 175-176.
- Urabe N, Naito I, Saito K, Yonezawa T, Sado Y, Yoshioka H, Kusachi S, Tsuji T, Ohtsuka A, Taguchi T, Murakami T, Ninomiya Y (2002) Basement membrane type IV collagen molecules in the choroid plexus, pia mater and capillaries in the mouse brain. Arch Histol Cytol 65:133-143.
- Uzel MI, Scott IC, Babakhanlou-Chase H, Palamakumbura AH, Pappano WN, Hong HH, Greenspan DS, Trackman PC (2001) Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. J Biol Chem 276:22537-22543.
- Van Harreveld A, Steiner J (1970a) The magnitude of the extracellular space in electron micrographs of superficial and deep regions of the cerebral cortex. J Cell Sci 6:793-805.
- Van Harreveld A, Steiner J (1970b) Extracellular space in frozen and ethanol substituted central nervous tissue. Anat Rec 166:117-129.
- Vaughan L, Zisch AH, Weber P, D'Allesandri L, Ferber P, David G, Zimmermann DR, Winterhalter KH (1994) Cellular receptors for tenascin. Contrib Nephrol 107:80-84.

- Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S (2002) Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. J Biol Chem 277:37377-37381.
- Vuorio E, de Crombrugghe B (1990) The family of collagen genes. Annu Rev Biochem 59:837-872.
- Walsh FS, Doherty P (1997) Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. Annu Rev Cell Dev Biol 13:425-456.
- Watanabe E, Aono S, Matsui F, Yamada Y, Naruse I, Oohira A (1995) Distribution of a brain-specific proteoglycan, neurocan, and the corresponding mRNA during the formation of barrels in the rat somatosensory cortex. Eur J Neurosci 7:547-554.
- Watanabe H, Yamada Y (1999) Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. Nat Genet 21:225-229.
- Weber P, Ferber P, Fischer R, Winterhalter KH, Vaughan L (1996) Binding of contactin/F11 to the fibronectin type III domains 5 and 6 of tenascin is inhibited by heparin. FEBS Lett 389:304-308.
- Weidner N, Grill RJ, Tuszynski MH (1999) Elimination of basal lamina and the collagen "scar" after spinal cord injury fails to augment corticospinal tract regeneration. Exp Neurol 160:40-50.
- Wilson MT, Snow DM (2000) Chondroitin sulfate proteoglycan expression pattern in hippocampal development: potential regulation of axon tract formation. J Comp Neurol 424:532-546.
- Wintergerst ES, Faissner A, Celio MR (1996a) The proteoglycan DSD-1-PG occurs in perineuronal nets around parvalbumin-immunoreactive interneurons of the rat cerebral cortex. Int J Dev Neurosci 14:249-255.
- Wintergerst ES, Vogt Weisenhorn DM, Rathjen FG, Riederer BM, Lambert S, Celio MR (1996b) Temporal and spatial appearance of the membrane cytoskeleton and perineuronal nets in the rat neocortex. Neurosci Lett 209:173-176.
- Wu YP, Siao CJ, Lu W, Sung TC, Frohman MA, Milev P, Bugge TH, Degen JL, Levine JM, Margolis RU, Tsirka SE (2000) The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. J Cell Biol 148:1295-1304.
- Xiao ZC, Revest JM, Laeng P, Rougon G, Schachner M, Montag D (1998) Defasciculation of neurites is mediated by tenascin-R and its neuronal receptor F3/11. J Neurosci Res 52:390-404.
- Xiao ZC, Ragsdale DS, Malhotra JD, Mattei LN, Braun PE, Schachner M, Isom LL (1999) Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. J Biol Chem 274:26511-26517.
- Yamada Y, Kleinman HK (1992) Functional domains of cell adhesion molecules. Curr Opin Cell Biol 4:819-823.
- Yamagata M, Saga S, Kato M, Bernfield M, Kimata K (1993) Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion. J Cell Sci 106 (Pt 1):55-65.
- Yurchenco PD, Schittny JC (1990) Molecular architecture of basement membranes. Faseb J 4:1577-1590.
- Yurchenco PD, O'Rear JJ (1994) Basal lamina assembly. Curr Opin Cell Biol 6:674-681.
- Zamir E, Geiger B (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. J Cell Sci 114:3583-3590.
- Zhou XH, Brakebusch C, Matthies H, Oohashi T, Hirsch E, Moser M, Krug M, Seidenbecher CI, Boeckers TM, Rauch U, Buettner R, Gundelfinger ED, Fassler R (2001) Neurocan is dispensable for brain development. Mol Cell Biol 21:5970-5978.

- Zhu Y, Yu T, Zhang XC, Nagasawa T, Wu JY, Rao Y (2002) Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. Nat Neurosci 5:719-720.
- Zuo J, Ferguson TA, Hernandez YJ, Stetler-Stevenson WG, Muir D (1998) Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite- inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan. J Neurosci 18:5203-5211.

ANNEXE

LA TENASCINE-C ET PHOSPHACAN/RPTPβ DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA REGENERATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Manuscrit 8

"DSD-1-proteoglycan/phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues"

Andreas Faissner, Nicolas Heck, Alexandre Dobbertin et Jeremy Garwood

Sous presse in "Brain repair" ; edited by M. Bähr ; Landes Bioscience, Texas

DSD-1-proteoglycan/phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues

Andreas Faissner^{§1)}, Nicolas Heck[#], Alexandre Dobbertin[§] and Jeremy Garwood[#]

§) Department of Cell morphology and molecular Neurobiology, Ruhr-University, Bochum, Germany, and #) Centre de Neurochimie du CNRS, Strasbourg, France.

1) For correspondence:

Andreas Faissner, Department of Cell Morphology and Molecular Neurobiology, Building NDEF 05/594, Universitaetsstr. 150, 44801 Bochum, Germany, Tel –49 (0)234 32 28851, FAX –49 (0)234 32 14313, Email: andreas.faissner@ruhr-uni-bochum.de

Summary

Interactions between neurons and glial cells play important roles in regulating key events of development and regeneration of the CNS. Thus, migrating neurons are partly guided by radial glia to their target, and glial scaffolds direct the growth and directional choice of advancing axons, e.g. at the midline. In the adult, reactive astrocytes and myelin components play a pivotal role in the inhibition of regeneration. The past years have shown that astrocytic functions are mediated on the molecular level by extracellular matrix components, which include various glycoproteins and proteoglycans. One important, developmentally regulated chondroitin sulfate proteoglycan is DSD-1-PG/phosphacan, a glial derived proteoglycan which represents a splice variant of the receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP)-beta (also known as PTP-zeta). Current evidence suggests that this proteoglycan influences axon growth in development and regeneration, and the neuronal lineage. These effects seem to be mediated by neuronal receptors of the Ig-CAM superfamily.

Key words:

Axon guidance, chondroitin sulfate, DSD-1-PG/phosphacan, extracellular matrix, glial scar, glial boundary, neurite outgrowth, receptor protein tyrosine phosphatase-beta, proteoglycan, reactive astrocyte, regeneration, tenascin-C

A. General Introduction:

1. The Extracellular matrix in neural development and regeneration

The development of the central nervous system (CNS) evolves as a series of specifiable, separate morphogenetic steps which include cell proliferation, migration of neuronal precursors to their respective locations, differentiation of neurons, process extension, axon outgrowth, guidance, synaptogenesis and, finally, selective neuronal death due to limiting amounts of growth factors, ¹ for review).

In all of these events, interactions of the cell with its environment play an important regulatory role. Cells can interact both directly with other cell surfaces or with the complex of secreted proteins and carbohydrate polymers which make up the extracellular matrix (ECM).

Cell-cell interactions are mediated by molecules such as the IgCAM-superfamily, ^{2, 3} the cadherins, ^{4, 5} and the Eph-tyrosine kinases and their ephrin-A and ephrin-B ligands, ^{6 7 8} which are implicated in mechanisms such as the regulation of axon growth by fasciculation (N-CAM) or the establishment of functional boundaries within the tissue (interrhombomeric boundary, ephrin ⁹)

Many potentially important interactions also occur within between cells and the neural extracellular matrix (ECM). Although the organization of the ECM in the vertebrate CNS is not well understood it can be considered as a complex and dynamic association of extracellular molecules that is relatively rich in chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs) and hyaluronan, but poor in fibrous elements (reviewed in ¹⁰)

ECM molecules are thought to contribute to the regulation of CNS histogenesis by a variety of functional properties. Thus, the ECM has been implicated in the control of cellular migration, the storage of soluble growth factors, the promotion of neurite outgrowth, or the inhibition of neuritogenesis by the formation of tissue boundaries. ^{11 12 13-15}

Cell interactions with the ECM are mediated by receptors such as the growing family of integrin heterodimers ^{16 17}, and proteins from the Ig-CAM family. ¹⁸

2. CSPGs in the ECM

Chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs), a heterogeneous set of proteins bearing glycosaminoglycans (GAGs) of the chondroitin sulfate (CS) class, account for most of the "soluble" proteoglycans in the brain.¹⁹ Tissue fractionation studies performed with rat brain have revealed that whereas most heparan sulfate proteoglycans are tightly associated with cell membranes, the CSPGs, which constitute the major population of proteoglycans (PGs) in the CNS, are recovered in detergent-free salt extracts.²⁰ ²¹ ²² It is known that soluble CSPG preparations from postnatal rat brain contain at least eight core glycoproteins which are differentially expressed during rat CNS development.²¹

3. ECM proteins control axon growth by promoting and inhibiting

During development, axon growth and growth cone guidance are regulated by numerous proteins of the ECM ²³ including the semaphorin gene family and their receptors, ^{24 25 26} and the Nogo proteins. ^{27 28 29} These proteins are expressed in differents parts of the CNS and their expression is regulated during time. Depending on the cell type with which they interact, they can exert promotory or inhibitory effects, and display attractive or repulsive properties.

The CSPGs are also ECM molecules involved in the regulation of axon growth as has been demonstrated by in vitro studies on CSPGs such as NG2, ³⁰ neurocan and phosphacan. ³¹ By virtue of inhibitory or stimulatory influences on neurite growth, CSPGs could be involved in the regulation of sprouting, as has been proposed for CAT 301 ^{32 33 34}).

4. CSPGs are present in functional boundaries in the CNS

During development, strong immunostaining for CS often localizes to territories thought to act as barriers to migrating neurons or extending axons such as the roof plate and midline dorsal tectum, ^{35 36} the posterior sclerotome, ^{37 38} the glomeruli of the olfactory bulb, ^{39, 40} the somatosensory barrel field ^{41, 42 43 44} and the dorsal root entry zone and dorsal columns in the spinal cord. ^{45 46} Thus, the CSPGs could contribute to the regulation of the establishement of axonal highways by its spatial distribution in boundaries associated with its neurite outgrowth inhibitory properties. These boundaries seem to share common properties with the glial scar, that is, the expression of CSPGs and tenascin-C at lesion sites is associated with inhibition of axonal regrowth, as has also been proposed for the dorsal root entry zone. ⁴⁶

5. ECM proteins expressed during development are also upregulated in lesions: upregulated CSPGs could inhibit regeneration in lesions

Most of the expression of the proteoglycans occurs during the embryonic and postnatal period and decreases to a low basal level of expression in the adult. Interestingly, it has been shown that the expression of these CSPGs is upregulated at sites of damage to the CNS. For example, NG2, ⁴⁷ neurocan, ⁴⁸ ⁴⁹ ⁵⁰ decorin, ⁵¹ versican ⁵², and brevican ⁵³ ⁵⁴ are all upregulated in lesions. It is meanwhile well established that the inability of the CNS to regenerate is at least in part due to inhibitory factors released by glial cells into the lesion environment. ⁵⁵ ⁵⁶ ⁵⁷ ⁵⁸ The astrocytes react to lesion of the CNS to form a gliotic scar. ⁵⁹ ⁶⁰ ⁶¹ ⁵⁷ These reactive astrocytes and the ECM that they produce have been shown to inhibit neurite outgrowth in vitro ⁶² ⁶³ and in vivo. ⁶⁴ ⁴⁵ ⁶⁵ The demonstration that CSPGs can modulate neurite outgrowth in in vitro studies has led to the suggestion that the CSPGs may be contributing to the failure of axonal regeneration in lesions.

Numerous studies have emphasized that the reactive astrocytes up-regulate their expression of CSPGs and keratan sulfate epitopes, and have shown that these components are sufficient to override the beneficial influence of laminin-1, thus impeding the axon growth process. ^{66 67, 68 69, 70 71 46} It has recently been proposed that neurons implanted by a non-traumatic technique into the corpus callosum are able to regenerate long fibers in the presence of intact myelin, provided that the fibers can "escape" from the environment of a ring of tenascin-C and CSPG-expressing reactive astrocytes which emerge around the implantation site. ^{72, 73} In recent in vivo experiments, treatment of the tissue with the enzyme, chondroitinase ABC, which cleaves CS-glycosaminoglycan chains, leads to a substantial regrowth of axons through the lesion. ^{74, 75 76 77}

6. Using cell lines and dissecting the reactive astrocyte: confirmation of a role for CSPGs These results have strongly stimulated further investigations into the molecular identity of the CSPGs expressed by reactive astrocytes. An astrocytic cell line selected for its properties similar to those of reactive astrocytes has been shown to express CSPGs. ⁷⁸ In another study, using a cell line model system of reactive astrocytes, it could be shown that inhibitory activities are associated with the proteoglycan fraction and that these are sensitive to the digestion of GAGs and the blocking of sulfation of polymeric sugars. ^{79, 80 81 82} The CSPG, NG2, was identified as one important component in the inhibitory pathway. ⁸³ NG2 is expressed by a subclass of glial cells, up-regulated in lesions, and inhibits neurite outgrowth in several in vitro assays. ^{47, 84, 85 30, 86 87}

B. DSD-1-PG/Phosphacan/RPTPbeta:

1. Introduction

Thus, proteoglycans have attracted increasing attention because recent investigations suggest that this biochemically heterogeneous group of molecules is functionally significant both during development and regeneration of neural structures.⁸⁸ ⁸⁹ Among them, phosphacan/RPTPbeta has been shown to be expressed during the embryonic and postnatal period where it could, according to various in vitro studies, play a role in the regulation of axon growth, ⁹⁰ cell migration ⁹¹ and myelination. ⁹² The expression of this molecule is regulated in the site of lesion in the adult central nervous system ⁴⁸; Dobbertin et al., in preparation). Hence, these CSPGs could be playing a critical role in the regulation of axonal regeneration.

2. Structure and expression of DSD-1-PG/phosphacan, a splice variant of RPTP-beta, and related isoforms

Previously, it has been shown that DSD-1-PG/phosphacan, one of the more abundant of the soluble CSPGs in the postnatal mouse brain, is the mouse homologue of the rat CSPG, phosphacan, ^{93 90} which closely resembles the cytotactin-binding-proteoglycan CTBP. ^{94, 95} The GAG-composition of DSD-1-PG/phosphacan is characterised by CS-A and a preponderance of CS-C chains. In addition, the CS-D-dependent DSD-1-epitope has been identified with the help of the MAb 473HD, and a keratan sulfate moiety has been detected with the MAb 3H1 which is expressed at least by a subclass of the DSD-1-PG/phosphacan molecules. ^{93 90 96} As shown in Figure 1, the secreted proteoglycan, DSD-1-PG/phosphacan, is the product of a splice variant of the transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase, RPTP-beta, and it corresponds to the entire extracellular region of the largest isoform of RPTP-beta, which is also heavily glycosylated with chondroitin sulphate glycosaminoglycan chains (CS GAGs). ^{97 98 99 100} In the short RPTP-beta isoform, there is a deletion of 850 amino acids between the S domain and the transmembrane domain, corresponding to the GAG attachment sites. ^{90 101} The expression profile of DSD-1-PG/phosphacan matches that reported for rat phosphacan, with a rapid increase in its concentration during the late embryonic and early postnatal period, the levels remaining high in adult brain. ¹⁰² Recently, evidence has been obtained for the existence of a novel isoform of RPTP-beta, corresponding to the N-terminal 600 residues of the extracellular domain common to the three known isoforms of this protein. The novel cDNA transcript was isolated by expression screening of a mouse brain cDNA library using a polyclonal antibody raised against the DSD-1-PG/phosphacan isoform, with which the other isoforms of RPTP-beta had been previously



Figure 1: The structure of the phosphacan/RPTP-beta isoforms. The symbols are as indicated in the text. The phosphacan isoform misses the transmembrane domain and is released into the cellular environment.

cloned ⁹⁰ Garwood et al., submitted). Data collected in amphibians open the possibility that an even wider range of isoforms exists. ¹⁰³ Whether this is also true for the mammalian nervous system remains to be seen.

The spatiotemporal expression pattern of the RPTP-beta isoforms during the development, maintenance and pathology of the CNS has been correlated with a range of developmental processes which involve cell-cell and cell-ECM signalling, including cellular proliferation, migration, differentiation, circuit formation, synaptogenesis, synaptic function and tissue regeneration ^{104 105} reviewed in ¹⁰⁶. Based on the essentially glial expression of DSD-1-PG/phosphacan/RPTP-beta, the effects on neuronal behaviour of extracellular signals presented by RPTP-beta have been considered, whether as protein sequences/domains or associated with the extensive carbohydrate molecules, especially CS-GAG chains, with which they are modified. The systematic study of primary cerebellar cultures of distinct developmental stages showed that DSD-1-PG/phosphacan is surface-expressed on a subclass of immature glial cells. Analysis by immunoprecipitation of biosynthetically labelled primary cultures and cell lines and by biochemical techniques such as ion exchange and size-exclusion chromatography supports the conclusion that the proteoglycan synthesized in vitro corresponds to the molecule obtained from postnatal mouse brain. ⁹³ In particular, at later stages, and in secondary cultures enriched for astrocytes, a substantial overlap of DSD-1-PG/phosphacan with O4-positive and O1-negative oligodendrocytes was found. ^{93 107 108} In mixed glial cell cultures from neonatal rat, antibodies directed against DSD-1-PG/phosphacan stained bipolar precursors and more mature oligodendrocytes, presumably O4-positive (N. Heck, M. Perrault, A. Faissner unpublished observations, Figure 2). With regard to lineage-related restriction of expression, the large RPTPbeta and the released form, DSD-1-PG/phosphacan, seem to be strongly expressed by oligodendrocyte precursors. By comparison, mature astrocytes preferentially express the short RPTP-beta. ¹⁰⁹ ¹⁰¹ Glial precursor cells, radial glia, Golgi cells, and astrocytes from different developmental stages and parts of the CNS have all been shown to express RPTP-beta isoforms. 100, 101

Studies of the distribution of both the phosphacan mRNA ¹¹⁰ and of the expressed protein ¹⁰⁵ show the phosphacan mRNA at E13-E16 largely confined to areas of active cell proliferation such as the ventricular zone of the brain and the ependymal layer surrounding the central canal of the spinal cord. Also, although the mRNA is mostly in the neuroepithelium of the embryonic brain and spinal cord, the protein is widely distributed in these tissues, presumably as a consequence of transport in or along glial processes, local secretion and/or redistribution as a consequence of cell migration. ¹¹⁰ ¹⁰⁵ In P7 mouse cerebellum, DSD-1-PG/phosphacan staining

is strongest in the prospective white matter and is also present in the granule layer and molecular layers, whereas the external granule layer is unstained, with the exception of the Bergmann glia fibres (J. Garwood, N. Heck, A. Faissner, unpublished observations; Figure 3), matching a similar distribution of phosphacan in P7 rat cerebellum. ¹¹¹ The distribution of DSD-1-PG/phosphacan during development corresponds to regions implicated in the formation of axonal trajectories. In this respect, it might play either a neurite promoting role as in the interrhomberic boundaries in chick, ¹¹² or an inhibitory role which would correspond to its presence in glial barrel field boundaries in the developing somatosensory cortex of mouse. ^{41, 42}

In the adult rat brain, it has been shown that DSD-1-PG/phosphacan occurs in the circumference of a selected subpopulation of neurons which expressed the calcium-binding protein, parvalbumin, occupying the extracellular space in close vicinity to the cell body, surrounding axon terminals and glial end feet, but not the synaptic clefts. ¹¹³ It has been suggested that CSPGs associate with hyaluronic acid in such perineuronal nets or pericellular matrices to form a neuronal ECM structure analogous to that found in connective tissue. ^{114 115} Different neuronal subsets have different complements of CSPGs ¹¹⁶ such that perineuronal CSPGs could regulate the extracellular milieu of neurons in cell type-specific ways (see Figure 4A). For example, late in development, the mature ECM may be an important element in limiting synaptic plasticity. ^{33 32} Another intriguing expression in the adult brain has been observed around the ventricular zone, where cell proliferation occurs (Figure 4B). At the dorsal edge of the lateral ventricle, the presence of phosphacan/RPTPbeta seems to be corrrelated with the pathway of the migrating neurons of the olfactory bulb, which are permanently regenerated. ^{117 118 119}

There have been conflicting reports concerning the expression pattern of RPTP-beta isoforms. Although most studies agree that the majority of the protein is of glial origin, there have been several reports of neuronal expression. On E16 cortical neurons, there is immunostaining with anti-6B4-PG/phosphacan of cell bodies, neurites, the rims of growth cones, and filopodial processes. ^{120 104} However, using an antibody against the tyrosine phosphatase D2 domain on cultured cortical neurons from E17, it seems that at least some of this expression on the cellular surface corresponds to receptor forms of RPTP-beta. ⁹¹ On the other hand, the protein expression by neurons, including migrating neurons in the cerebrum and cerebellar Purkinje cells, ¹²¹ has been difficult to interpret since DSD-1-PG/phosphacan is present in the ECM surrounding certain subsets of neurons ^{113 122}, and such an extracellular distribution, although apparently associated with the cell surface of neurons, could be glial in origin. A better analysis



Expression of phosphacan/RPTPbeta by oligodendrocytes.

A: The mAb 473HD which recognizes the DSD-1 epitope stains precursors of oligodendrocytes in mixed glial cultures from neonatal rat.

B: In cerebral cell cultures prepared from embryonic mice, the polyclonal antibody KAF13 which recognizes all isoforms of phosphacan/RPTPbeta shows a staining of the plasma membrane of mature oligodendrocytes.



Phosphacan/RPTP-beta expression in P7 Cerebellum.
A : In situ hybridization on rat cerebellum at postnatal day 7. The riboprobe used recognizes all known isoforms of phosphacan/RPTPbeta. An expression is seen in the Purkinje cell layer, in the inner granule cell layer and in the white matter.
B : Immunodetection of the all isoforms of phosphacan/RPTPbeta with the polyclonal antibody KAF13 in the rat cerebellum at postnatal day 7.



Adult expression of Phosphacan/RPTP-beta.

A : A subset of adult mouse cortical neurons are surrounded by perineuronal nets, a specialised extracellular matrix closely related with the plasmamembrane which can be visualised by immunohistochemistry with the polyclonal antibody KAF13, which recognizes all phosphacan/RPTP-beta isoforms.

B : Strong phosphacan/RPTP-beta expression around the ventricle of the adult rat revealed with the polyclonal antibody KAF13.



Upregulation of DSD-1-PG in a stab wound.

Immunodetection of the CS GAG-epitope DSD-1 with the mAb 473 HD in adult cerebellum into which a stab wound has been made. The expression of the DSD-1 epitope on DSD-1-PG /Phosphacan/RPTP-beta, is strongly upregulated in the region around the lesion site. Figure by courtesy of Dr. Steindler.

of the cellular origin of RPTP-beta isoform transcripts has been elaborated by in situ hybridisation analysis, which has confirmed a restricted neuronal expression pattern ¹²³ and, more recently, a heterozygote mouse has been generated in which a lacZ reporter gene has been placed under the control of the RPTP-beta promoter ¹²⁰. This latter has shown that, in addition to expression by GFAP-positive astrocytes in the P7 cerebral cortex, there are subsets of expressing neurons, including pyramidal neurons, found mostly in layers II, III, and V. Again, the use of antibodies against the intracellular tyrosine phosphatase domains of RPTP-beta have indicated that some of the neuronal expression described corresponds to the receptor forms of RPTP-beta ⁹¹. However, in the postnatal cerebral cortex, our in situ hybridisation studies limit expression of the receptor transcripts to the ventricular zone in accordance with other reports ¹²³ ¹¹⁷ ¹⁰⁰ Garwood et al., submitted).

3. CSPGs and DSD-1-PG/phosphacan in neurite outgrowth inhibition

Several studies have reported the enhanced expression of growth inhibiting CSPGs in the context of CNS lesions ^{70 124 67, 68 46} and DSD-1-epitope is also upregulated upon wounding in the CNS (Figure 5) ^{125 126 127 128 48 123}. Such an upregulation of the DSD-1-epitope in the wound reaction might be due to the action of TGF-beta based on studies of Oli-neu, an oligodendrocyte precursor cell line ¹⁰⁸ (see below).

Chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs), such as DSD-1-PG/phosphacan and neurocan ^{111, 129} have in several cases been regarded as barriers for neurite outgrowth and credited with inhibitory properties with respect to cell adhesion ^{130 35, 71 131 132 30, 86}. In vitro studies show that CSPGs can inhibit neurite outgrowth and elongation effects ^{133 30 134 71 130 104} ¹³² which can be associated with either the whole CSPG, the chondroitin sulfate (CS) GAGs ^{79 28} ⁷¹ or the protein cores ^{130 135}.

In particular the expression of a KS/CSPG in the dorsal roof plate is noteworthy because these regions contain laminated bands of specialized glial cells which are believed to subdivide the dorsal neural tube during development and to prevent the crossing of axons to the opposite side. Another example of KS-rich zones has been reported for neuroanatomical subdivisions between the cortex and thalamic nuclei ¹³⁶. Glial cells are a plausible source of KS/CSPG and it has been hypothesized that the KS/CSPG(s) expressed in these regions might mediate a boundary function of glia in this case ¹³. Consistent with this hypothesis neurites growing from chicken embryonic DRG explants avoid KS/CSPG spots applied to laminin or N-CAM substrates designed to support DRG process outgrowth in vitro ^{38 35, 71}. The MAb AH10 can be used to purify the KSPG claustrin from embryonic chicken brain. In contrast to KS antibodies, AH10 does not

react with tissues like bone and muscle also known to express KS-GAGs, hinting at GAG microheterogeneities with tissue-specific distribution ¹³⁷. Claustrin inhibits the growth of E12 optic lobe neurites from laminin-containing into laminin/claustrin coated areas of a patterned culture substrate, an effect which is abolished by keratanase treatment or incubation of the cultures with an antibody recognizing the KS chains, suggesting that the GAG is the functionally active component ¹³⁷ ⁷¹. These effects of KS are reminiscent of inhibitory influences of CS GAGs or CSPGs on neurite growth reported by other workers. For example, embryonic chick DRG neurites do not grow out when maintained in a gel that contains heparin, CS and hyaluronic acid (HA)¹³⁸, and avoid dermatan sulfate (DS), CS and HA in combination with collagen type I¹³⁹. Further, a CSPG expressed in embryonic chick epidermis prevents embryonic chick DRG neurite ingrowth into epidermal explants in an in vitro co-culture system ¹³⁹, and antibodies to CS GAGs neutralize this inhibitory property ¹³⁴. Along these lines, a schwannomaderived inhibitor of the neurite outgrowth promoting activity of laminin-1 contains a KS/CSPG as a prominent component ¹⁴⁰. Interestingly, DSD-1-PG/phosphacan also expresses a KSepitope recognized by MAb 3H1 and inhibits neurite outgrowth from postnatal day 1 DRGs in a laminin-1-rich environment (Figure 6)⁹⁰. A summary of in vitro neurite outgrowth studies employing DSD-1-PG/phosphacan is presented in Table 1. With regard to its localisation, DSD-1-PG/phosphacan has been observed in the extracellular matrix spaces between glial cells in the roof plate of the developing spinal cord as well as in the DRGs, the dorsal root entry zone and the ventral roots ^{90 105}, and in various boundary-like structures ^{141 142}. Based on this distribution pattern, it has been suggested that DSD-1-PG/phosphacan may be the CSPG which serves as the glial barrier to axonal extension in the roof plate and that it may restrain axonal growth and movement in these glial-bordered extracellular spaces of the spinal cord ¹⁰⁵. In this perspective, DSD-1-PG/phosphacan could act by either preventing invasion of elongating axons into the roof plate from the floor plate and ventral commissure, or by guiding axonal extension around the floor plate region. Supporting this interpretation, inhibitory effects of 6B4/phosphacan have been found for neurite outgrowth from E17 cerebellar neurons⁹¹, and P6-P8 retinal ganglion cells¹⁴³.

Finally, the neuronal CSPG, neurocan, a member of the aggrecan family of PGs, binds directly to CAMs of the Ig-superfamily, inhibits homophilic L1- or N-CAM-mediated cell adhesion and interferes with both neuron adhesion to and neurite outgrowth on substrates consisting of combinations of cell adhesion molecules or monoclonal antibodies ¹³⁵ ¹³². The inhibitory properties of neurocan partially reside in the core protein, consistent with a recent report which has attributed inhibition of neurite outgrowth by CSPGs to the core glycoproteins rather than the GAG moieties ¹³⁰. Thus, several examples illustrate that chondroitin sulfate

proteoglycans may exert inhibitory influences on axon outgrowth in the context of astroglial scar formation, or the construction of transient glial boundaries of neural tissues ¹³. Injection of chondroitin sufate-degrading enzymes has resulted in the modification of axon growth trajectories in vivo and application of these enzymes to choice paradigms of axon growth in vitro has indicated a reduction of inhibitory properties of chondroitin sulfate-expressing structures. In light of these experiments, chondroitin sulfate proteoglycans have been viewed as constituents of glial scars with neurite outgrowth inhibiting properties ¹³³ ¹⁴⁴ ⁷⁶ ¹⁴⁵. A study of the role of CSPGs in the outgrowth and adhesion of thalamic neurons plated onto living slices of the mouse embryonic neocortex ¹⁴⁶ demonstrated that CS digestion could affect both the permissive environment of the sub-cortical plate and the neurite-repellent properties of the cortical plate. However, rather than being associated with the presence of different CSPGs, they suggest that the opposing activities of these different zones is due to differentially localised CS-binding factors.

4. Growth promoting effects of CSPGs and DSD-1-PG/phosphacan

On the other hand, it is undisputed that there are also regions in which CSPGs have been found, such as the neocortex and retinal neurons in which CSPGs cannot be regarded as a barrier to axonal outgrowth. In these cases, tissues that express CSPGs do not exclude the entry of axons, and CSPG staining partially coincides with developing axon pathways ¹⁴⁷ ¹⁴⁸ ¹⁴⁹ ¹⁵⁰ ¹⁵¹. In support of this, several in vitro studies suggest that CSPGs ⁹³ ¹⁵² and isolated core proteins ¹⁵³ favour rather than inhibit neurite outgrowth. Indeed, initial studies using a mixture of at least three soluble postnatal rat brain CSPGs showed that CSPGs promote neurite outgrowth from E16 rat embryonic neurons. The promoting property was assigned to the core proteins while the CS-GAGs, mostly chondroitin 4-sulfate (CS-A, 80%) and chondroitin 6-sulfate (CS-C, 20%), prepared from the CSPGs were without effect ¹⁵⁴ ¹⁵³. A summary of in vitro neurite outgrowth studies employing DSD-1-PG/phosphacan is presented in Table 1. The 6B4-PG/phosphacan homologue of DSD-1-PG/phosphacan was found to stimulate outgrowth from E16 cortical neurons in a situation where the substrate was neutral for outgrowth from E16 thalamic neurons ¹⁰⁴. This study using 6B4/phosphacan coated on poly-L-lysine displayed an increased percentage of neurite-bearing cells for both E16 cortical and E16 thalamic neurons, but an enhanced length of the resulting neurites for cortical neurons only. Bacterially and eukaryotically expressed protein domain constructs corresponding to different parts of the core protein of phosphacan/RPTPbeta have been tested in neurite outgrowth assays ¹⁵⁵, ¹⁵⁶, ¹⁵⁷. These indicated that outgrowth from chick tectal neurons could be supported by the carbonic anhydrase domain,



Figure 6:

Contrasting effects of DSD-1-PG on neurite outgrowth.

Left: outgrowth from hippocampal neurons plated on a minimal substrate (PORN) is promoted by addition of DSD-1-PG. Middle: the strong promotion of outgrowth from hippocampal neurons plated on laminin-1 is not affected by addition of DSD-1-PG. Right: addition of DSD-1-PG to a laminin-1 substrate results in inhibition of outgrowth from dorsal root ganglion explants.

Table	1
-------	---

Coated substrates	Neuronal types	Animal/Age	Effect on neurite growth	Reference
DSD1-PG	Hippocampic neurons	Rat E18	Promotion (due to CS-GAG)	Faissner 1994
DSD1-PG	Mesencephalic neurons	Rat E14	Promotion (due to CS-GAG)	Faissner 1994
DSD1-PG + LN	Hippocampic neurons	Rat E18	No effect	Garwood 1999
DSD1-PG + LN	Dorsal Root Ganglion	Rat P0	Inhibition (due to core protein)	Garwood 1999
Purified Phosphacan	Retinal Ganglion Cells	Rat P6-8	Inhibition (due to core protein)	Inatani 2001
Purified Phosphacan + LN	Retinal Ganglion Cells	Rat P6-8	Inhibition (due to core protein)	Inatani 2001
6B4-PG	Cortical neurons	Rat E16	Promotion (due to core protein)	Maeda 1995;
				Maeda 1996
6B4-PG + FN	Cortical neurons	Rat E16	Promotion	Maeda 1995;
		D (F1(Maeda 1996
6B4-PG + TN	Cortical neurons	Rat E16	Promotion	Maeda 1996
6B4-PG	Thalamic neurons	Rat E16	No effect	Maeda 1996
NgCAM + Phosphacan	Neurons	Chick E9	Inhibition (due to core protein)	Milev 1994
C6 monolayer (Astrocytic cell line producing Pcan/RPTPb) + Ab 6B4-PG	Cerebellar neurons	Mouse P5	Inhibition	Revest 1999
C6 monolayer (Astrocytic cell line producing Pcan/RPTPb) + Ab F3	Cerebellar neurons	Mouse P5	Inhibition	Revest 1999
bF, bS	Tectal neurons	Chick	No effect	Sakurai 1997
bC, bCF	Tectal neurons	Chick	Promotion	Peles 1995
bCFS	Tectal neurons	Chick	Maximal promotion (against bC and bCF)	Sakurai 1997
bCFS + Ab Ng- CAM bCFS + Ab Contactin	Tectal neurons	Chick	Abolition of the promotion	Peles 1995; Sakurai 1997

A summary of in vitro neurite outgrowth studies using whole DSD-1PG/Phosphacan (also known as 6B4-PG) and recombinant protein domains as coated substrates for different neuronal types.

Table	2
-------	---

GAG types *	Mode of appli-	Coated substrate	Neuronal type	Animal/Age	Effect on neurite growth	Reference
	cation					
CS-4 CS-6 DS	coated	LN LN L1	Cerebellar neurons	Rat P5-P6	Inhibition	Dou 94
CS-4 CS-6 DS	coated	L1 L1 LN	Cerebellar neurons	Rat P5-P6	No effect	Dou 94
CS-4	coated	L1	Dorsal root ganglions neurons	Rat E15-E16	Promotion	Dou 94
CS-4 CS-6	coated	LN LN	Dorsal root ganglions neurons	Rat E15-E16	Inhibition	Dou 94
CS-6 DS DS	coated	L1 LN L1	Dorsal root ganglions neurons	Rat E15-E16	No effect	Dou 94
CS-A CS-C DS	soluble		NGF induced PC12 cells		No effect	Oohira 91
CS	soluble		Thalamic neurons	Rat E15	Promotion	Fernaud- espinosa 94
CS DS DS	soluble	LN LN	Thalamic neurons	Rat E18	No effect	Fernaud- espinosa 94
CS CS DS DS	soluble	LN LN	Hippocampal neurons	Rat E18	No effect	Fernaud- espinosa 94
CS-A CS-B CS-C	coated		Hippocampal neurons	Rat E18	No effect	Nadanaka 98
CS-D CS-E	coated		Hippocampal neurons	Rat E18	Promotion	Nadanaka 98
CS-A CS-B CS-C	soluble	FN FN FN	Dorsal root ganglions neurons	Chick E8-E11	No effect	Snow 96

Summary of in vitro neurite outgrowth studies using different types of glycosaminoglycans as both coated substrates and in soluble form. * CS-A: chondroitinsulfate A (C4-S); CS-B: chondroitinsulfate B, dermatan sulfate (DS); CS-C: chondroitinsulfate C (C6-S)

an effect potentiated by addition of the 'S' domain. Another example relates to cerebellar granule cell neurons which migrate postnatally along the processes of Bergmann glia cells into the prospective internal granular layer. During this migration, the CSPG astrochondrin is expressed at contact sites between granule cells and Bergmann glia in vivo, and the monoclonal antibody L5 directed against a Lewis-X-carbohydrate epitope present on astrochondrin reduces the migration of granule cells in the early postnatal mouse cerebellar cortex in a living explant system, and process formation of astrocytes on laminin and collagen IV in vitro^{152 158}.

Although these studies partly operate with mixtures of different neuronal subtypes, they are not inconsistent with the contrasting observations relating to DSD-1-PG/phosphacan. On the one hand, this large neural CSPG promotes neurite growth of rat embryonic day 14 (E14) mesencephalic and E18 hippocampal neurones when coated as substrate on poly-DL-ornithineconditioned plastic (Figure 6) 93. Yet on the other hand, a striking inhibition by DSD-1-PG/phosphacan of neurite outgrowth from DRGs plated on a mixed laminin-1/CSPG substrate was also observed (Figure 6)⁹⁰. The inhibitory effects of DSD-1-PG/phosphacan are not removed by chondroitinase ABC digestion indicating that they are associated with the core glycoprotein. Interestingly, digestion of the CS-GAG chains does not affect either the inhibitory nor the promotory effects of DSD-1-PG/phosphacan in related approaches ¹⁰⁴ ¹³¹. Although it has been found that the digestion of the CS-GAG chains does not alleviate the inhibitory effects of DSD-1-PG on DRGs, the neurite outgrowth promoting effect of DSD-1-PG/phosphacan on hippocampal neurons is mediated by the particular CS-GAG structure, DSD-1⁹³. In fact, the neurite outgrowth promoting effect can be neutralized by enzymatic digestion with chondroitinase ABC or addition of the blocking monoclonal antibody, 473 HD, which is specific for the DSD-1-epitope contained in the chondroitin sulfate chains. This is reminiscent of earlier reports that HS-, DS- and CS-GAGs potentiate neurite outgrowth by PC12 cells to varying extents upon exposure to aFGF, bFGF and NGF, which might reflect an improvement of cytokine effects ¹⁵⁹.

Similarly, some in vitro studies indicate that CS-GAG chains and heparan sulfate can promote neurite outgrowth ¹⁶⁰ ¹⁶¹ ⁹³ ¹⁵³ ¹⁰⁴. A summary of the in vitro neurite outgrowth studies of the different CS GAG types is presented in Table 2. For example, purified HS-, DS- and CS-GAGs induce neurite outgrowth by E14 mesencephalic neurons ¹⁶² ¹⁶³. In the light of these results, the DSD-1-epitope had originally been considered as a putative chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid GAG structure, based on its differential sensitivity to the endoglycosidase, chondroitinase ACI, and its resistance to digestion by the exoglycosidase, chondroitinase ACI (DSD-1: for "dermatan-sulfate-dependent", ⁹³. Later investigations have,
however, established, that the epitope depends on sulfation and is associated with the chondoitin sulfate type D glycosaminoglycan (and should hence read "D-type chondroitin sulfate dependent", ^{96 164}. In a recent study, the effects of diverse chondroitin sulfate GAGs on E18 hippocampal neurite outgrowth were systematically investigated. Consistent with the results of the earlier studies, CS-D and CS-E slightly enhance the fraction of neurite bearing neurons when applied as a substrate in comparison to CS-A, CS-B and CS-C ^{164 96}. It was observed that neither CS-A, CS-B nor CS-C significantly increased neurite length, CS-D displayed a mild promotory effect and CS-E exerted the strongest effect on neurite extension. The addition of MAb 473HD which is known to block neurite outgrowth promotion

enacted by CS-D, did not neutralize the CS-E effect ¹⁶⁵ ¹⁶⁴. Consistent with this observation, the DSD-1-epitope which is contained in commercially available CS-D preparations could not be revealed in CS-E preparations ¹⁶⁴ ¹⁶⁵. CS-E carries a similar charge to CS-D, but displays a different sulfation pattern. Hence, while CS-D is sulfated in the C6-position of Nacetylgalactosamine and the C2-position of hexuronic acid, the constitutive carbohydrate dimer of CS-E carries sulfate groups in the C4- and C6-positions of N-acetylgalactosamine. Recently, the importance of sulfate group distributions on carbohydrate polymers has been highlighted by the observation, that the DSD-1-epitope requires sulfation of a tetra-deca-saccharide ⁹⁶. These findings suggest that both the sequence of disaccharide motifs and the attachment of sulfate groups contribute to the formation of chondroitin sulfate domains with functional properties and that a novel, hitherto unknown structural domain with neurite outgrowth promoting properties is contained in CS-E. These observations contrast with the inhibitory properties of GAGs discussed before. The seemingly conflicting reports might be reconciled because the repulsive effects of GAGs have in many cases been observed in choice situations where neurites were confronted with favourable substrates, e.g. collagens, laminin and N-CAM on the one side, and areas of the culture dish containing GAGs and/or PGs in addition on the other. There are precedents that molecules displaying repulsive or inhibitory activities in choice situations may permit, or even enhance neurite growth or cell migration as homogeneous substrata, for example tenascin-C, that carries distinct functional domains ¹⁶⁶ ¹⁶⁷ ¹⁴ ¹⁶⁸ ¹⁰⁶. Choice experiments on patterned substrates confront growth cones and/or cell bodies with a 100% step gradient of GAGs and/or PGs and reveal repulsive properties which may not appear under conditions of uniform concentration¹⁶⁹. Alternatively, these opposite results could reflect a structural heterogeneity of the complex chondroitin sulfate polymers. Furthermore, a lineage-dependence of neuronal responses to chondroitin sulfates might contribute to the seemingly contradictory reports from different studies.

5. Multiple ligands of DSD-1-PG/phosphacan

The effects on process outgrowth described above seem to be mediated by both the core glycoprotein and the CS GAGs (Table 1), and likely neuronal receptors for these interactions are members of the IgCAM superfamily. In effect, DSD-1-PG/phosphacan has been shown to possess three levels at which it can interact with other molecules either in the ECM or on cell membranes. These are the GAG chains, the other N- and O-linked oligosaccharides, and finally the regions of the protein core which are not covered by carbohydrate modifications. With such a range of possible interactions, it is not surprising that DSD-1-PG/phosphacan is implicated in many developmental processes such as migration and neurite outgrowth. In addition to variations in the presentation of such sites of interaction on the CSPG, the amplitude of its effects is likely to be dependent upon localised combinatory variations, both quantitative and qualitative, of promoting and inhibitory factors which recognise these sites. Cell-type specific differences in the cell-surface receptors (mostly IgCAMs) when confronted with a variety of potential ligands in the ECM, and the relative responsiveness of their intracellular signalling mechanisms to such factors in either cis- or trans- with other cell surface receptor molecules could then account for the differential cellular behaviour observed ¹⁵⁵ ¹⁷⁰. Models proposed to explain the relationship between the secreted DSD-1-PG/phosphacan isoform and the transmembrane receptor forms of RPTP-beta suggest that extracellular interaction sites common to the different isoforms could compete for extracellular ligands and thereby modulate the nature of the tyrosine phosphatase signal ¹⁷¹. Other intracellular targets for RPTP-beta also imply roles in the regulation of G-protein coupled receptor signaling cascades (GIT1/Cat-1¹⁷², and synaptic organisation (PSD-95/SAP90¹⁷³.

A plausible interpretation for the variable effects of phosphacan/RPTP-beta on neurite outgrowth discussed above might reflect variations in the repertoire of CAM receptors present on the different neuronal types (Figure 7). In this context, the aminoterminal CA- and FNIII-domains and parts of the S-domain seem to be involved in the interactions which have been described for phosphacan/RPTP-beta. Members of the neuronal IgCAMs ¹⁷⁰ found to interact with phosphacan/RPTP-beta include L1/NgCAM ¹³⁵, F3/contactin ¹⁷⁴ ¹⁵⁶ ² ¹⁷⁵, ¹⁷⁶, TAG-1/axonin-1, and NrCAM ¹⁵⁵. It has been shown that the GPI-anchored F3/contactin binds to the CA-domain ¹⁵⁶, whereas the related GPI-anchored IgCAM, TAG-1/Axonin-1, binds via the CS GAG chains ¹⁷⁷. Similarly, interactions have been demonstrated between the S-domain of phosphacan/RPTP-beta and NCAM, NgCAM/L1, and NrCAM ¹⁵⁵. Several of these binding



Figure 7

Neuron-Glia Interactions mediated by phosphacan/RPTP-beta. The Ig CAMs represented as neuronal receptors can all interact with extracellular sites on phosphacan/RPTP-beta: F3/F11/contactin via the CA domain; TAG-1/Axonin via the CS GAGs; the others via the S region. interactions have been shown to result in promotion of neurite outgrowth, effects which could be blocked by specific antibodies directed against the receptor molecules ^{156 155}.

In addition to the CS GAGs, DSD-1-PG/phosphacan is highly glycosylated with other carbohydrate modifications as illustrated by the presence of the 3H1, 3F8, L2/HNK-1 and L5/Lewis-X epitopes ⁹⁰. The latter is an N-linked carbohydrate which bears similarities with the forse antigen, a topographically restricted epitope of the developing nervous system ^{158 178} ^{179 180}. It appears likely that the sulfation, carbohydrate composition and oligosaccharide structure of DSD-1-PG/phosphacan is developmentally regulated and that at least some of these carbohydrate modifications could alter its affinity for other proteins, for example, the N-linked sugars on the carbonic anhydrase and FNIII domains of DSD-1-PG/phosphacan which mediate its interactions with NgCAM, NCAM and TN-C ¹⁸¹.

Recombinant Fc-fusion proteins with the different domains have been used to characterise a range of molecular interactions underlying changes in cell behaviour. Hence, the CA-domain has been shown to support neuronal adhesion and neurite outgrowth by binding to F3/contactin on the surface of neurons ¹⁵⁶. This interaction with F3/contactin also implies a transmembrane receptor, Caspr ¹⁵⁷ in a neuronal signaling complex which has been localised in vivo at paranodal junctions between axons and paranodal loops of myelinating glia ¹⁸². It has recently been shown that the CA-domain can block the localisation to the paranodes of the F3/contactin-Caspr complex ¹⁸³, suggesting that this complex may be targeted via ECM interactions with RPTP-beta expressed by myelinating glia. Studies on mice deficient for RPTP-beta indicate that, although there is no gross abnormality in the overall brain architecture, there is a fragility in the myelin sheaths of CNS neurons ⁹², and a recent report indicates dysfunctioning of the central dopaminergic system associated with locomotion defects ¹⁸⁴.

It has also recently been shown that the CA domain can interact with the extracellular beta-1 domain of the voltage-gated sodium channel ¹⁸⁵, an interaction which could modulate the action potential of the neuronal membrane. This study also demonstrated that the cytoplasmic tyrosine phosphatase domains of short RPTP-beta could interact with, and dephosphorylate, the pore-forming alpha-subunit. Hence, it is possible that competitive binding of different RPTP-beta isoforms could modulate sodium channel activity in a biphasic mechanism: the CA-domain binding to the extracellular domain in contrast to tyrosine phosphatase interactions with the cytoplasmic domain.

In vitro functional studies have provided evidence for roles in the development and maintenance of the CNS, and biochemical studies have demonstrated a number of potential binding partners in the ECM, such as the tenascins, TN-C and TN-R¹⁸⁶. Meanwhile the RPTP-beta FNIII domain has been shown to bind to a distinct ligand on the surface of glial cells, including astrocytes, which has been recently identified as TN-C¹⁷¹. It has been suggested that this interaction is a primary adhesion receptor system to the ECM for glial tumour cells. The presence of TN-C on the cell surface is intriguing since TN-C is a large secreted glycoprotein with many isoform variants which is mostly present in the ECM ^{187, 188}. However, it seems that there are glial receptors for TN-C which can retain it on the cell surface in a configuration which permits interaction with the RPTP-beta FNIII domain. Furthermore one of these glial receptors for TN-C may well be the short RPTP-beta itself, adding a further level of complexity to the potential range of cell-ECM interactions, since it has also been shown that the adhesion of glioblastoma cells to TN-C via the short RPTP-beta is modulated by the secretion of DSD-1-PG/phosphacan¹⁸⁹. In this context it is also interesting to note that it has been recently demonstrated that RPTP-beta was intrinsically active in unstimulated cells in a study of signalling by the heparin-binding cytokine, pleiotrophin/HB-GAM/HBNF¹⁹⁰. As such, it seems that pleiotrophin signals through a ligand-dependent inactivation of RPTP-beta, consequently increasing levels of tyrosine phosphorylation of beta-catenin to initiate downstream signalling and associated changes in process outgrowth and cell migration. Hence the competition of phosphacan, the released soluble form of RPTP-beta, for common ligands might also play a role in regulating the enzymatic activity of RPTP-beta itself and subsequent changes in cell behaviour.

6. Regulation of DSD-1-PG/phosphacan and other CSPGs by cytokines in lesions: Role of TGF-beta

Using chondroitin sulfate markers, CSPGs have been shown to be markedly upregulated at CNS injury sites ^{67, 68} ¹⁹¹ ^{72, 73} ⁶⁹ ¹²⁶. With the use of antibodies directed against the core proteins, several studies have reported the enhanced expression of growth inhibitory CSPGs including lecticans such as neurocan, brevican and versican ⁵³ ⁴⁹ ⁵⁴ ^{50, 52}, the CSPG NG2 ⁴⁷ and decorin ⁵¹. DSD-1-PG/phosphacan mRNA has been found upregulated following deafferentation of the hippocampus or cerebral stab wound injury ¹²³ Dobbertin et al., in preparation) and sciatic nerve injury ¹⁹² but no increase of the corresponding protein was observed in astrogliotic tissue ⁴⁸. Moreover, phosphacan is decreased in kainate-induced seizures models and Ihara's epileptic rats ¹⁹³ ¹⁹⁴ and in cerebral cortex lesions (Dobbertin et al., in preparation). In contrast, the DSD-1 epitope recognized by the 473mAb has been found upregulated upon stab wounding in the CNS ¹⁹⁵ ¹²⁸ Dobbertin et al., in preparation)

The factors responsible for the regulation of proteoglycans in neural tissues are poorly understood. In lesion zones of the CNS, activated microglial cells and astrocytes express a variety of modulatory cytokines and growth factors ^{196 197 198 199} and some of these are known to modulate proteoglycan expression in non-neural test systems. For example, platelet-derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor (TGF)-beta1 both increase the amount of a versican-like CSPG on arterial smooth muscle cells ²⁰⁰, and TGF-beta1 enhances the rate of proteoglycan synthesis in rabbit articular chondrocytes ²⁰¹. Likewise, TGF-beta1 selectively induces the expression of biglycan, but not decorin, on human embryonic lung fibroblasts ²⁰². Cytokines such as interleukin-1 can directly inhibit proteoglycan synthesis ²⁰³. In the nervous system, TGFbeta1 was shown to increase the expression of neurocan by astrocytes ⁵⁰ and of versican by oligodendrocyte precursors ⁵². The astrocytic expression of neurocan was also enhanced by EGF and in a higher magnitude than by TGFbeta1, whereas it was reduced by IFNgamma and PDGF ⁵⁰.

In order to further understanding of DSD-1-PG/phosphacan expression in lesions, the effects of soluble mediators known to be implicated in inflammation or wound reaction were systematically examined on the regulation of DSD-1-PG/phosphacan in the cell line Oli-neu. This cell line has been generated by immortalizing cultures enriched for oligodendrocytes with the oncogene t-neu²⁰⁴. This cell line expresses the antigen O4, a marker of immature oligodendrocytes and can be driven to express myelin associated glycoprotein (MAG), a marker of mature oligodendrocytes, by continuous db-cAMP treatment ²⁰⁴. In this regard Olineu behaves like differentiating primary oligodendrocytes in vitro. It is interesting to compare these observations with earlier studies concerning CSPG expression by glial cells. Thus, the detection of chondroitin sulfate epitopes on immature oligodendrocytes has been reported ⁶⁶, and at least one defined CSPG has been detected on oligodendrocyte surfaces, namely NG2³⁰ ⁸⁷ ⁸⁴ ⁸⁵. The DSD-1-epitope and DSD-1-PG/phosphacan are known to be expressed by oligodendrocyte precursors (OPCs) in vitro and no other cell line or primary culture system was found which would present comparable advantages in terms of cell numbers and homogeneity of expression. Finally, the ability of Oli-neu to migrate on laminin and the cellular response upon contact with either astrocytes or meningeal cells is similar to that of an enriched oligodendrocyte precursor cell preparation ²⁰⁵. For these reasons, Oli-neu was chosen as a model system for the study of DSD-1-PG/phosphacan regulation. To this end, an enzyme-linked immunosorbent assay using the cell line Oli-neu in conjunction with MAb 473HD was developed and combined with biosynthetic labeling and immunoprecipitation techniques. Using these approaches, it was found that, of all of the compounds tested so far,

the growth factors TGF-beta1-3 induced a significant upregulation of the CSPG, both in the supernatant and in the detergent extract of cultured cells. The roles attributed to TGF-beta's in the CNS to date are manifold and include the regulation of migratory properties of neural crest cells, the control of neural progenitor cell proliferation, an influence on neuronal survival and differentiation, the increase of neurite growth of dorsal root ganglia, and the modification of adhesive properties of radial glia and cells migrating in close contact with radial glia ^{206 207 208} for review, see ^{209 210}.

TGF-betas could influence core protein expression, GAG chain length, -number and composition, or a combination of these parameters. For example, TGFbetas enlarged the size of individual GAG chains by approximately 25 kDa on a versican-like molecule expressed by smooth muscle cells, and enhance the level of mRNA that was detectable by a versicancDNA probe 3-fold over unstimulated controls ²⁰⁰. It also increased the number and length of chondroitin sulfate chains attached to the proteoglycan syndecan in mouse mammary epithelial cells, while the core protein levels remained unchanged ²¹¹. TGF-beta1 apparently increased the expression of the GAG-chain associated DSD-1-epitope and, to a lesser degree, of the DSD-1/phosphacan-proteoglycan core protein. Indeed, the immunoprecipitation of DSD-1-PG from TGF-beta1 treated Oli-neu cells showed that there was both an increase of core protein expression and an enhanced incorporation of sulfate into the GAG chains. This might result from an increased length and/or number of chondroitin sulfate chains, structural rearrangements or varied sulfation, concomittant with an enhanced density of DSD-1-epitope expression on individual cell surfaces. Interestingly, a comparable enhanced sulfation of GAG-chains and an increase of GAG-chain attachment has also been described for NG2 as synthesized in the cell line Neu-7, a model of reactive astrocytes in vitro ^{79 83}.

TGF-beta 2 and 3 isoforms are known to be expressed in most cells present in the uninjured CNS such as astrocytes, neurons and oligodendrocytes while TGFbeta 1 is mainly synthesized in lesioned tissue ²⁰⁸ ²⁰⁶. Upon CNS injury, TGF-beta1 is upregulated by macrophages and astrocytes in the vicinity of adult CNS wounds ²¹² and contributes to the formation of the glial scar, thus impairing regeneration ²⁰⁹ ²¹³. Considering these reports, it is tempting to speculate that macrophage-produced TGF-beta1 would lead to the upregulation of DSD-1-PG/phosphacan in the vicinity of CNS stab wounds. However, concurrent with the induction of DSD-1-PG/phosphacan, an up-regulation of matrix metalloproteinases which have been reported to degrade neurite growth inhibiting proteoglycans also occurs ⁷⁵. Recently, degradation of DSD-1-PG/phosphacan subsequent to the activation of the tissue plasminogen activator/plasmin system has been documented in vivo. Hence, up-regulation of

the DSD-1-PG/phosphacan mRNA or the DSD-1 epitope in CNS lesions need not necessarily be correlated with a higher concentration of the core protein in the lesion territory ¹⁹³.

7. DSD-1-PG/phosphacan and RPTP-beta isoforms in the regulation of cell-substrate interactions and cell motility

The importance of ECM molecules for cell motility could be demonstrated in several culture models of cellular migration. For example, neural crest cells migrate through the embryo to differentiate into peripheral nervous system, facial skeleton or pigment cells using migration pathways comprising collagens, laminin-1 or fibronectin.²¹⁴ Directional restraints may be imposed by substrates unfavourable for migration, e.g. CSPGs ²¹⁵ ³⁷ ²¹⁶. An example of extensive migration in the CNS relates to the O2A (oligodendrocyte-type 2 astrocyte) precursor cells that are generated outside the optic nerve and immigrate from its chiasmal side to the retina ²¹⁷. Likewise, oligodendrocyte precursors in the developing spinal cord are generated in the subventricular zone and subsequently migrate away to populate the spinal cord ²¹⁸. In the adult CNS, a progenitor cell type with limited migratory potential, termed O2A-adult, is retained in the postnatal brain ²¹⁹. Migration of oligodendrocyte precursors (OPCs) hence seems important for the determination of myelination territories during development and the remyelination of axons after lesion events. Cell-cell and cell-substratum interactions of oligodendrocytes and their precursors are likely to influence proliferation, migration to sites of differentiation ^{220 217}, re-immigration to places of demyelinating lesions, and remyelination. It has been proposed that the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in the control of the motility of O2A (oligodendrocyte-type 2 astrocyte) glial progenitors ²²¹ ^{222, 223}. The corresponding characteristic carbohydrate polymer alpha 2-8 linked polysialic acid has been detected on the surface of O2A-progenitor cells from the hypophysis of newborn rats. Enzymatic digestion of the carbohydrate structure by endoneuraminidase and blockade of the NMDA-receptor activation-dependent exposure of PSA on the cell surface completely blocked the motility of the OPCs ^{222, 223}. The mechanisms involved in the migration of OPCs have been elucidated in some detail. Growth factors such as platelet-derived growth factor (PDGF) stimulate migration presumably by chemotactic mechanisms ²²⁴ or by keeping oligodendrocyte precursors in an undifferentiated state ²²⁵. Furthermore, the importance of extracellular matrix molecules as migration substrates has been increasingly appreciated. Oligodendrocyte precursors can migrate on substrates of laminin-1²⁰⁵ and fibronectin glycoproteins, while tenascin-C as a cosubstrate to fibronectin reduces their migratory ability ²²⁶. Along these

lines, integrins as cell-surface receptors for several ECM glycoproteins (Hynes, 1992) have been shown to play an important role in this context (Milner et al. 1996). Integrins ^{12, 16 227} mediate adhesion to laminin-1²²⁸, merosin (laminin-2, ²²⁹), fibronectin ²³⁰, tenascin-C ²³¹ ²³², in part by an RGD-dependent mechanism. TGF-beta differentially regulates the expression of various integrin genes depending on the cell type and subunit composition of the heterodimers. For example, TGF-beta stimulates adhesion of human mononuclear phagocytes to laminin and fibronectin by increasing integrin beta 2 and alpha 5 mRNA and protein synthesis ²³³, and a comparable differential regulation of distinct integrin chains has been described for rat alveolar epithelial cells ²³⁴. This might also be relevant in the context of tumour invasion and metastasis, because the invasion of U-138MG glioma cells was facilitated due to an increased adhesion to ECM after alpha-5 integrin upregulation by TGFbeta ²³⁵. While in most cases studied so far TGF-beta strengthens adhesion to various ECM substrates, the data relating to DSD-1-PG/phosphacan indicate that the Oli-neu cell line shows decreased attachment to laminin upon TGF-beta-treatment. Antibody perturbation studies with mono- and polyclonal antibodies suggest that this can at least partially be attributed to DSD-1-PG/phosphacan. The precise role of DSD-1-PG/phosphacan in this process is, however, currently unclear.

Interestingly, it has been reported that a CSPG isolated from human melanoma cells directly binds an amino acid sequence motif contained in a fibronectin fragment and thereby contributes to the adhesion of melanoma cells to fibronectin²³⁶. It is conceivable that DSD-1-PG/phosphacan influences the interaction between laminins and their receptors, potentially by interfering with the activation state of appropriate integrins. Because differential expression of integrins is believed to regulate oligodendrocyte precursor cell (OPC) motility, this might impinge on the movement of OPCs ^{221, 224, 237}. Alternatively, a fine-tuning of ligand binding by cis-interactions of DSD-1-PG/phosphacan with receptor-integrins in the cellular membrane might be assumed. This might primarily concern the transmembrane isoforms of RPTP-beta, because the largest variant is expressed by oligodendrocyte precursors ¹⁰¹. It contains the tyrosine-phosphatase domains and could, therefore, potentially anatagonise the activation of integrins, which may involve the tyrosine kinase "focal adhesion kinase" (FAK, ¹⁷). The tuning of integrins in the cell membrane presumably affects both the substrate attachment and the motility behaviour of the cell concerned, e.g. the OPC in this case ²³⁸. In conclusion, it seems reasonable to conclude that the levels of DSD-1-PG/phosphacan in the cell membrane modulate the adhesive interactions of Oli-neu with the ECM. The modulation of cell-substrate

interactions presumably translates in the tuning of cell motility of Oli-neu cells, and the OPC equivalent (Schnädelbach and Faissner, in preparation).

REFERENCES

- 1. Jacobson M. Developmental neurobiology. 3rd ed. New York and London: Plenum Press; 1991.
- 2. Brummendorf T, Rathjen FG. Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type IIIrelated domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. J Neurochem. Oct 1993;61(4):1207-1219.
- **3.** Brummendorf T, Rathjen FG. Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol.* Oct 1996;6(5):584-593.
- 4. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* Oct 1995;7(5):619-627.
- 5. Uemura T. The cadherin superfamily at the synapse: more members, more missions. *Cell*. Jun 26 1998;93(7):1095-1098.
- 6. Tessier-Lavigne M. Eph receptor tyrosine kinases, axon repulsion, and the development of topographic maps. *Cell.* Aug 11 1995;82(3):345-348.
- 7. Drescher U, Bonhoeffer F, Muller BK. The Eph family in retinal axon guidance. *Curr Opin Neurobiol*. Feb 1997;7(1):75-80.
- 8. Klein R. Bidirectional signals establish boundaries. *Curr Biol.* Sep 23 1999;9(18):R691-694.
- 9. Xu Q, Mellitzer G, Robinson V, Wilkinson DG. In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature*. May 20 1999;399(6733):267-271.
- **10.** Garwood J, Heck N, Rigato F, Faissner A. The extracellular matrix in neural development, plasticity and regeneration. In: Walz W, ed. *The neuronal microenvironment*. New Jersey, USA: Humana Press; 2002:109-158.
- **11.** Sanes JR. Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu Rev Neurosci.* 1989;12:491-516.
- 12. Hynes RO, Lander AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell.* Jan 24 1992;68(2):303-322.
- **13.** Faissner A, Steindler D. Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. *Glia.* 1995;13(4):233-254.
- **14.** Faissner A. The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res.* 1997;290(2):331-341.
- **15.** Miao HQ, Ishai-Michaeli R, Atzmon R, Peretz T, Vlodavsky I. Sulfate moieties in the subendothelial extracellular matrix are involved in basic fibroblast growth factor sequestration, dimerization, and stimulation of cell proliferation. *J Biol Chem.* Mar 1 1996;271(9):4879-4886.
- **16.** Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. Apr 3 1992;69(1):11-25.
- 17. Dedhar S, Hannigan GE. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(5):657-669.
- **18.** Fields RD, Itoh K. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 1996;19(11):473-480.
- **19.** Lander AD. Proteoglycans: master regulators of molecular encounter? *Matrix Biol.* 1998;17(7):465-472.
- **20.** Kiang WL, Margolis RU, Margolis RK. Fractionation and properties of a chondroitin sulfate proteoglycan and the soluble glycoproteins of brain. *J Biol Chem.* Oct 25 1981;256(20):10529-10537.
- **21.** Herndon ME, Lander AD. A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system. *Neuron*. Jun 1990;4(6):949-961.
- **22.** Klinger MM, Margolis RU, Margolis RK. Isolation and characterization of the heparan sulfate proteoglycans of brain. Use of affinity chromatography on lipoprotein lipase-agarose. *J Biol Chem.* Apr 10 1985;260(7):4082-4090.
- **23.** Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science*. 1996;274(5290):1123-1133.
- 24. Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell.* 1993;75(2):217-227.
- **25.** Goodman CS. Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:341-377.
- **26.** Luo Y, Raper JA. Inhibitory factors controlling growth cone motility and guidance. *Curr Opin Neurobiol*. Oct 1994;4(5):648-654.
- 27. Fournier AE, Strittmatter SM. Repulsive factors and axon regeneration in the CNS. *Curr Opin Neurobiol*. Feb 2001;11(1):89-94.
- **28.** Schwab ME, Kapfhammer JP, Bandtlow CE. Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci.* 1993;16:565-595.
- **29.** Huber AB, Schwab ME. Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem.* May-Jun 2000;381(5-6):407-419.

- **30.** Dou CL, Levine JM. Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci.* 1994;14(12):7616-7628.
- **31.** Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU. Neurocan and phosphacan: two major nervous tissuespecific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect Dev Neurobiol.* 1996;3(4):273-290.
- **32.** Zaremba S, Guimaraes A, Kalb RG, Hockfield S. Characterization of an activity-dependent, neuronal surface proteoglycan identified with monoclonal antibody Cat-301. *Neuron*. Mar 1989;2(3):1207-1219.
- **33.** Hockfield S, Tootell RB, Zaremba S. Molecular differences among neurons reveal an organization of human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 1990;87(8):3027-3031.
- **34.** Kalb RG, Hockfield S. Induction of a neuronal proteoglycan by the NMDA receptor in the developing spinal cord. *Science*. Oct 12 1990;250(4978):294-296.
- **35.** Snow DM, Steindler DA, Silver J. Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier. *Dev Biol.* Apr 1990;138(2):359-376.
- **36.** Katoh-Semba R, Matsuda M, Kato K, Oohira A. Chondroitin sulphate proteoglycans in the rat brain: candidates for axon barriers of sensory neurons and the possible modification by laminin of their actions. *Eur J Neurosci.* 1995;7(4):613-621.
- **37.** Landolt RM, Vaughan L, Winterhalter KH, Zimmermann DR. Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development*. 1995;121(8):2303-2312.
- **38.** Oakley RA, Tosney KW. Peanut agglutinin and chondroitin-6-sulfate are molecular markers for tissues that act as barriers to axon advance in the avian embryo. *Dev Biol.* Sep 1991;147(1):187-206.
- **39.** Gonzalez ML, Silver J. Axon-glia interactions regulate ECM patterning in the postnatal rat olfactory bulb. *J Neurosci*. Oct 1994;14(10):6121-6131.
- **40.** Gonzalez Mde L, Malemud CJ, Silver J. Role of astroglial extracellular matrix in the formation of rat olfactory bulb glomeruli. *Exp Neurol*. Sep 1993;123(1):91-105.
- **41.** Steindler DA. Glial boundaries in the developing nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1993;16:445-470.
- **42.** Steindler DA, Settles D, Erickson HP, et al. Tenascin knockout mice: barrels, boundary molecules, and glial scars. *J Neurosci.* 1995;15(3 Pt 1):1971-1983.
- **43.** Crandall JE, Misson JP, Butler D. The development of radial glia and radial dendrites during barrel formation in mouse somatosensory cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* Aug 1 1990;55(1):87-94.
- 44. Steindler DA, Cooper NG, Faissner A, Schachner M. Boundaries defined by adhesion molecules during development of the cerebral cortex: the J1/tenascin glycoprotein in the mouse somatosensory cortical barrel field. *Dev Biol.* Jan 1989;131(1):243-260.
- **45.** Fitch MT, Silver J. Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res.* 1997;290(2):379-384.
- **46.** Pindzola RR, Doller C, Silver J. Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions. *Dev Biol.* 1993;156(1):34-48.
- **47.** Levine JM. Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci.* 1994;14(8):4716-4730.
- **48.** McKeon RJ, Jurynec MJ, Buck CR. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci.* 1999;19(24):10778-10788.
- **49.** Haas CA, Rauch U, Thon N, Merten T, Deller T. Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J Neurosci.* 1999;19(22):9953-9963.
- **50.** Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, et al. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci*. 2000;20(7):2427-2438.
- **51.** Stichel CC, Kappler J, Junghans U, Koops A, Kresse H, Muller HW. Differential expression of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans decorin and biglycan after injury of the adult rat brain. *Brain Res.* 1995;704(2):263-274.
- **52.** Asher RA, Morgenstern DA, Shearer MC, Adcock KH, Pesheva P, Fawcett JW. Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci*. Mar 15 2002;22(6):2225-2236.
- **53.** Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S. Intracranial injury acutely induces the expression of the secreted isoform of the CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB/brevican. *Exp Neurol.* Jun 1999;157(2):327-337.
- **54.** Thon N, Haas CA, Rauch U, et al. The chondroitin sulphate proteoglycan brevican is upregulated by astrocytes after entorhinal cortex lesions in adult rats. *Eur J Neurosci.* Jul 2000;12(7):2547-2558.
- **55.** Bahr M, Bonhoeffer F. Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS. *Trends Neurosci.* 1994;17(11):473-479.

- **56.** Fawcett JW. Astrocytic and neuronal factors affecting axon regeneration in the damaged central nervous system. *Cell Tissue Res.* 1997;290(2):371-377.
- **57.** Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999;49(6):377-391.
- **58.** Fawcett JW. Spinal cord repair: from experimental models to human application. *Spinal Cord.* Dec 1998;36(12):811-817.
- **59.** Brodkey JA, Laywell ED, O'Brien TF, et al. Focal brain injury and upregulation of a developmentally regulated extracellular matrix protein. *J Neurosurg.* Jan 1995;82(1):106-112.
- **60.** Reier P. Gliosis following CNS injury: the anatomy of glial scars and their influences on axonal elongation. In: Federoff S, Vernadakis A, eds. *Astrocytes*. New York: Academic Press; 1986:263-324.
- **61.** Landis DM. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Annu Rev Neurosci.* 1994;17:133-151.
- **62.** Rudge JS, Silver J. Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci*. Nov 1990;10(11):3594-3603.
- **63.** Bähr M, Przyrembel C, Bastmeyer M. Astrocytes from adult rat optic nerves are nonpermissive for regenerating retinal ganglion cell axons. *Exp Neurol.* 1995;131:211-220.
- **64.** Liuzzi FJ, Lasek RJ. Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science*. Aug 7 1987;237(4815):642-645.
- **65.** Davies SJ, Field PM, Raisman G. Regeneration of cut adult axons fails even in the presence of continuous aligned glial pathways. *Exp Neurol*. Dec 1996;142(2):203-216.
- **66.** Gallo V, Bertolotto A, Levi G. The proteoglycan chondroitin sulfate is present in a subpopulation of cultured astrocytes and in their precursors. *Dev Biol.* Sep 1987;123(1):282-285.
- **67.** McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci.* 1991;11(11):3398-3411.
- **68.** McKeon RJ, Hoke A, Silver J. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol.* 1995;136(1):32-43.
- **69.** Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. Neurite outgrowth inhibitors associated with glial cells and glial cell lines. *Neuroreport.* 1993;5(3):345-348.
- **70.** Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M. Characterization of a neurite outgrowth inhibitor expressed after CNS injury. *Eur J Neurosci.* 1993;5(5):454-465.
- 71. Snow DM, Lemmon V, Carrino DA, Caplan AI, Silver J. Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol.* Jul 1990;109(1):111-130.
- 72. Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature*. Dec 18-25 1997;390(6661):680-683.
- 73. Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci.* Jul 15 1999;19(14):5810-5822.
- 74. Zuo J, Ferguson TA, Hernandez YJ, Stetler-Stevenson WG, Muir D. Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite- inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci.* 1998;18(14):5203-5211.
- **75.** Zuo J, Neubauer D, Dyess K, Ferguson TA, Muir D. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite- promoting potential of spinal cord tissue. *Exp Neurol.* 1998;154(2):654-662.
- 76. Yick LW, Wu W, So KF, Yip HK, Shum DK. Chondroitinase ABC promotes axonal regeneration of Clarke's neurons after spinal cord injury. *Neuroreport*. Apr 7 2000;11(5):1063-1067.
- 77. Moon LD, Brecknell JE, Franklin RJ, Dunnett SB, Fawcett JW. Robust regeneration of CNS axons through a track depleted of CNS glia. *Exp Neurol.* Jan 2000;161(1):49-66.
- **78.** Groves AK, Entwistle A, Jat PS, Noble M. The characterization of astrocyte cell lines that display properties of glial scar tissue. *Dev Biol.* 1993;159(1):87-104.
- **79.** Smith-Thomas LC, Fok-Seang J, Stevens J, et al. An inhibitor of neurite outgrowth produced by astrocytes. *J Cell Sci.* 1994;107(Pt 6):1687-1695.
- **80.** Smith-Thomas LC, Stevens J, Fok-Seang J, Faissner A, Rogers JH, Fawcett JW. Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J Cell Sci.* Mar 1995;108 (Pt 3):1307-1315.
- **81.** Powell EM, Meiners S, DiProspero NA, Geller HM. Mechanisms of astrocyte-directed neurite guidance. *Cell Tissue Res.* 1997;290(2):385-393.
- **82.** Meiners S, Powell EM, Geller HM. A distinct subset of tenascin/CS-6-PG-rich astrocytes restricts neuronal growth in vitro. *J Neurosci.* 1995;15(12):8096-8108.
- **83.** Fidler PS, Schuette K, Asher RA, et al. Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J Neurosci.* 1999;19(20):8778-8788.
- **84.** Levine JM, Stallcup WB. Plasticity of developing cerebellar cells in vitro studied with antibodies against the NG2 antigen. *J Neurosci*. Sep 1987;7(9):2721-2731.

- **85.** Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci.* Jan 2001;24(1):39-47.
- **86.** Dou CL, Levine JM. Differential effects of glycosaminoglycans on neurite growth on laminin and L1 substrates. *J Neurosci.* 1995;15(12):8053-8066.
- **87.** Stallcup WB, Beasley L. Bipotential glial precursor cells of the optic nerve express the NG2 proteoglycan. *J Neurosci*. Sep 1987;7(9):2737-2744.
- 88. Lander AD. Proteoglycans in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1993;3(5):716-723.
- **89.** Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev.* Oct 2000;80(4):1267-1290.
- **90.** Garwood J, Schnadelbach O, Clement A, Schutte K, Bach A, Faissner A. DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. *J Neurosci.* 1999;19(10):3888-3899.
- **91.** Maeda N, Noda M. Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration. *J Cell Biol.* 1998;142(1):203-216.
- **92.** Harroch S, Palmeri M, Rosenbluth J, et al. No obvious abnormality in mice deficient in receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Mol Cell Biol.* 2000;20(20):7706-7715.
- **93.** Faissner A, Clement A, Lochter A, Streit A, Mandl C, Schachner M. Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J Cell Biol.* Aug 1994;126(3):783-799.
- 94. Hoffman S, Edelman GM. A proteoglycan with HNK-1 antigenic determinants is a neuron-associated ligand for cytotactin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 1987;84(8):2523-2527.
- **95.** Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM. Molecular forms, binding functions, and developmental expression patterns of cytotactin and cytotactin-binding proteoglycan, an interactive pair of extracellular matrix molecules. *J Cell Biol*. Feb 1988;106(2):519-532.
- **96.** Clement AM, Nadanaka S, Masayama K, Mandl C, Sugahara K, Faissner A. The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 1998;273(43):28444-28453.
- **97.** Maurel P, Rauch U, Flad M, Margolis RK, Margolis RU. Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(7):2512-2516.
- **98.** Krueger NX, Saito H. A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP zeta, is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(16):7417-7421.
- **99.** Barnea G, Grumet M, Milev P, et al. Receptor tyrosine phosphatase beta is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular matrix protein tenascin. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14349-14352.
- **100.** Canoll PD, Barnea G, Levy JB, et al. The expression of a novel receptor-type tyrosine phosphatase suggests a role in morphogenesis and plasticity of the nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993;75(2):293-298.
- **101.** Canoll PD, Petanceska S, Schlessinger J, Musacchio JM. Three forms of RPTP-beta are differentially expressed during gliogenesis in the developing rat brain and during glial cell differentiation in culture. *J Neurosci Res.* 1996;44(3):199-215.
- **102.** Meyer-Puttlitz B, Milev P, Junker E, Zimmer I, Margolis RU, Margolis RK. Chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of nervous tissue: developmental changes of neurocan and phosphacan. *J Neurochem.* 1995;65(5):2327-2337.
- **103.** Nagata S, Saito R, Yamada Y, Fujita N, Watanabe K. Multiple variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase beta are expressed in the central nervous system of Xenopus. *Gene.* Jan 10 2001;262(1-2):81-88.
- **104.** Maeda N, Noda M. 6B4 proteoglycan/phosphacan is a repulsive substratum but promotes morphological differentiation of cortical neurons. *Development*. 1996;122(2):647-658.
- **105.** Meyer-Puttlitz B, Junker E, Margolis RU, Margolis RK. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol.* 1996;366(1):44-54.
- **106.** Garwood J, Rigato F, Heck N, Faissner A. Tenascin glycoproteins and the complementary ligand DSD-1-PG/phosphacan – structuring the neural extracellular matrix during development and repair. *Restor Neurol Neurosci.* 2001;19(1,2):51-64.
- **107.** Faissner A. Monoclonal antibody identifies a proteoglycan expressed by a subclass of glial cells. *Soc Neurosci Abstr.* 1988;14:920.

- **108.** Schnadelbach O, Mandl C, Faissner A. Expression of DSD-1-PG in primary neural and glial-derived cell line cultures, upregulation by TGF-beta, and implications for cell-substrate interactions of the glial cell line Oli-neu. *Glia.* 1998;23(2):99-119.
- **109.** Sakurai T, Friedlander DR, Grumet M. Expression of polypeptide variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase beta: the secreted form, phosphacan, increases dramatically during embryonic development and modulates glial cell behavior in vitro. *J Neurosci Res.* 1996;43(6):694-706.
- **110.** Engel M, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol.* 1996;366(1):34-43.
- **111.** Rauch U, Gao P, Janetzko A, et al. Isolation and characterization of developmentally regulated chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of brain identified with monoclonal antibodies. *J Biol Chem.* Aug 5 1991;266(22):14785-14801.
- **112.** Heyman I, Faissner A, Lumsden A. Cell and matrix specialisations of rhombomere boundaries. *Dev Dyn.* 1995;204(3):301-315.
- **113.** Wintergerst ES, Faissner A, Celio MR. The proteoglycan DSD-1-PG occurs in perineuronal nets around parvalbumin-immunoreactive interneurons of the rat cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci*. 1996;14(3):249-255.
- **114.** Maleski M, Hockfield S. Glial cells assemble hyaluronan-based pericellular matrices in vitro. *Glia*. 1997;20(3):193-202.
- **115.** Rauch U. Modeling an extracellular environment for axonal pathfinding and fasciculation in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* Nov 1997;290(2):349-356.
- **116.** Celio MR, Blumcke I. Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* 1994;19(1):128-145.
- **117.** Gates MA, Thomas LB, Howard EM, et al. Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. *J Comp Neurol.* 1995;361(2):249-266.
- **118.** Goldman SA, Luskin MB. Strategies utilized by migrating neurons of the postnatal vertebrate forebrain. *Trends Neurosci.* 1998;21(3):107-114.
- **119.** Thomas LB, Gates MA, Steindler DA. Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia.* 1996;17(1):1-14.
- **120.** Shintani T, Watanabe E, Maeda N, Noda M. Neurons as well as astrocytes express proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta: analysis of mice in which the PTPzeta/RPTPbeta gene was replaced with the LacZ gene. *Neurosci Lett.* 1998;247(2-3):135-138.
- **121.** Maeda N, Matsui F, Oohira A. A chondroitin sulfate proteoglycan that is developmentally regulated in the cerebellar mossy fiber system. *Dev Biol.* 1992;151(2):564-574.
- **122.** Haunso A, Celio MR, Margolis RK, Menoud PA. Phosphacan immunoreactivity is associated with perineuronal nets around parvalbumin-expressing neurones. *Brain Res.* 1999;834(1-2):219-222.
- 123. Snyder SE, Li J, Schauwecker PE, McNeill TH, Salton SR. Comparison of RPTP zeta/beta, phosphacan, and trkB mRNA expression in the developing and adult rat nervous system and induction of RPTP zeta/beta and phosphacan mRNA following brain injury. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;40(1):79-96.
- **124.** Lips K, Stichel CC, Muller HW. Restricted appearance of tenascin and chondroitin sulphate proteoglycans after transection and sprouting of adult rat postcommissural fornix. *J Neurocytol*. 1995;24(6):449-464.
- **125.** Laywell ED, Dorries U, Bartsch U, Faissner A, Schachner M, Steindler DA. Enhanced expression of the developmentally regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 1 1992;89(7):2634-2638.
- **126.** Barker RA, Dunnett SB, Faissner A, Fawcett JW. The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. *Exp Neurol*. 1996;141(1):79-93.
- **127.** Deller T, Haas CA, Frotscher M. Reorganization of the rat fascia dentata after a unilateral entorhinal cortex lesion. Role of the extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci.* Jun 2000;911:207-220.
- **128.** Deller T, Haas CA, Naumann T, Joester A, Faissner A, Frotscher M. Up-regulation of astrocyte-derived tenascin-C correlates with neurite outgrowth in the rat dentate gyrus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Neuroscience*. 1997;81(3):829-846.
- **129.** Rauch U, Karthikeyan L, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK. Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J Biol Chem.* 1992;267(27):19536-19547.
- **130.** Oohira A, Matsui F, Katoh-Semba R. Inhibitory effects of brain chondroitin sulfate proteoglycans on neurite outgrowth from PC12D cells. *J Neurosci.* 1991;11(3):822-827.
- **131.** Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, et al. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol.* 1994;127(6 Pt 1):1703-1715.

- **132.** Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* May 1994;125(3):669-680.
- **133.** Brittis PA, Canning DR, Silver J. Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science*. 1992;255(5045):733-736.
- **134.** Fichard A, Verna JM, Olivares J, Saxod R. Involvement of a chondroitin sulfate proteoglycan in the avoidance of chick epidermis by dorsal root ganglia fibers: a study using beta-D-xyloside. *Dev Biol*. Nov 1991;148(1):1-9.
- **135.** Grumet M, Flaccus A, Margolis RU. Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol*. Feb 1993;120(3):815-824.
- **136.** Miller B, Sheppard AM, Pearlman AL. Developmental expression of keratan sulfate-like immunoreactivity distinguishes thalamic nuclei and cortical domains [published erratum appears in J Comp Neurol 1997 Sep 1;385(3):490-1]. *J Comp Neurol*. 1997;380(4):533-552.
- **137.** Cole GJ, McCabe CF. Identification of a developmentally regulated keratan sulfate proteoglycan that inhibits cell adhesion and neurite outgrowth. *Neuron*. Dec 1991;7(6):1007-1018.
- **138.** Carbonetto S, Gruver MM, Turner DC. Nerve fiber growth in culture on fibronectin, collagen, and glycosaminoglycan substrates. *J Neurosci*. Nov 1983;3(11):2324-2335.
- **139.** Verna JM. In vitro analysis of interactions between sensory neurons and skin: evidence for selective innervation of dermis and epidermis. *J Embryol Exp Morphol.* Apr 1985;86:53-70.
- **140.** Muir D, Engvall E, Varon S, Manthorpe M. Schwannoma cell-derived inhibitor of the neuritepromoting activity of laminin. *J Cell Biol*. Nov 1989;109(5):2353-2362.
- 141. O'Brien TF, Faissner A, Schachner M, Steindler DA. Afferent-boundary interactions in the developing neostriatal mosaic. *Brain Res Dev Brain Res.* Feb 21 1992;65(2):259-267.
- 142. Crossin KL, Hoffman S, Tan SS, Edelman GM. Cytotactin and its proteoglycan ligand mark structural and functional boundaries in somatosensory cortex of the early postnatal mouse. *Dev Biol.* Dec 1989;136(2):381-392.
- **143.** Inatani M, Honjo M, Otori Y, et al. Inhibitory effects of neurocan and phosphacan on neurite outgrowth from retinal ganglion cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(8):1930-1938.
- 144. Chung KY, Taylor JS, Shum DK, Chan SO. Axon routing at the optic chiasm after enzymatic removal of chondroitin sulfate in mouse embryos. *Development*. Jun 2000;127(12):2673-2683.
- **145.** Moon L, Asher R, Rhodes K, Fawcett J. Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci.* 2001;4:465-466.
- **146.** Emerling DE, Lander AD. Inhibitors and promoters of thalamic neuron adhesion and outgrowth in embryonic neocortex: functional association with chondroitin sulfate. *Neuron*. 1996;17(6):1089-1100.
- **147.** Sheppard AM, Hamilton SK, Pearlman AL. Changes in the distribution of extracellular matrix components accompany early morphogenetic events of mammalian cortical development. *J Neurosci*. 1991;11(12):3928-3942.
- **148.** Bicknese AR, Sheppard AM, O'Leary DD, Pearlman AL. Thalamocortical axons extend along a chondroitin sulfate proteoglycan-enriched pathway coincident with the neocortical subplate and distinct from the efferent path. *J Neurosci.* Jun 1994;14(6):3500-3510.
- **149.** Fukuda T, Kawano H, Ohyama K, et al. Immunohistochemical localization of neurocan and L1 in the formation of thalamocortical pathway of developing rats. *J Comp Neurol*. 1997;382(2):141-152.
- **150.** Ring C, Lemmon V, Halfter W. Two chondroitin sulfate proteoglycans differentially expressed in the developing chick visual system. *Dev Biol.* Mar 1995;168(1):11-27.
- **151.** McAdams BD, McLoon SC. Expression of chondroitin sulfate and keratan sulfate proteoglycans in the path of growing retinal axons in the developing chick. *J Comp Neurol.* Feb 20 1995;352(4):594-606.
- **152.** Streit A, Nolte C, Rasony T, Schachner M. Interaction of astrochondrin with extracellular matrix components and its involvement in astrocyte process formation and cerebellar granule cell migration. *J Cell Biol.* 1993;120(3):799-814.
- **153.** Iijima N, Oohira A, Mori T, Kitabatake K, Kohsaka S. Core protein of chondroitin sulfate proteoglycan promotes neurite outgrowth from cultured neocortical neurons. *J Neurochem.* 1991;56(2):706-708.
- **154.** Oohira A, Matsui F, Matsuda M, Takida Y, Kuboki Y. Occurrence of three distinct molecular species of chondroitin sulfate proteoglycan in the developing rat brain. *J Biol Chem.* Jul 25 1988;263(21):10240-10246.
- **155.** Sakurai T, Lustig M, Nativ M, et al. Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta. *J Cell Biol.* 1997;136(4):907-918.
- **156.** Peles E, Nativ M, Campbell PL, et al. The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell*. 1995;82(2):251-260.
- **157.** Peles E, Nativ M, Lustig M, et al. Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *Embo J.* 1997;16(5):978-988.

- **158.** Streit A, Yuen CT, Loveless RW, et al. The Le(x) carbohydrate sequence is recognized by antibody to L5, a functional antigen in early neural development. *J Neurochem.* Feb 1996;66(2):834-844.
- **159.** Damon DH, D'Amore PA, Wagner JA. Sulfated glycosaminoglycans modify growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Cell Physiol.* May 1988;135(2):293-300.
- **160.** Hantaz-Ambroise D, Vigny M, Koenig J. Heparan sulfate proteoglycan and laminin mediate two different types of neurite outgrowth. *J Neurosci*. Aug 1987;7(8):2293-2304.
- **161.** Fernaud-Espinosa I, Nieto-Sampedro M, Bovolenta P. Differential effects of glycosaminoglycans on neurite outgrowth from hippocampal and thalamic neurones. *J Cell Sci.* Jun 1994;107 (Pt 6):1437-1448.
- **162.** Lafont F, Prochiantz A, Valenza C, et al. Defined glycosaminoglycan motifs have opposite effects on neuronal polarity in vitro. *Dev Biol.* Oct 1994;165(2):453-468.
- **163.** Lafont F, Rouget M, Triller A, Prochiantz A, Rousselet A. In vitro control of neuronal polarity by glycosaminoglycans. *Development*. Jan 1992;114(1):17-29.
- **164.** Nadanaka S, Clement A, Masayama K, Faissner A, Sugahara K. Characteristic hexasaccharide sequences in octasaccharides derived from shark cartilage chondroitin sulfate D with a neurite outgrowth promoting activity. *J Biol Chem.* 1998;273(6):3296-3307.
- **165.** Clement AM, Sugahara K, Faissner A. Chondroitin sulfate E promotes neurite outgrowth of rat embryonic day 18 hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* Jul 16 1999;269(3):125-128.
- **166.** Faissner A, Kruse J. J1/tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron*. 1990;5(5):627-637.
- **167.** Gotz B, Scholze A, Clement A, et al. Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J Cell Biol*. Feb 1996;132(4):681-699.
- **168.** Lochter A, Vaughan L, Kaplony A, Prochiantz A, Schachner M, Faissner A. J1/tenascin in substratebound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. *J Cell Biol.* Jun 1991;113(5):1159-1171.
- **169.** Snow DM, Letourneau PC. Neurite outgrowth on a step gradient of chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PG). *J Neurobiol.* Apr 1992;23(3):322-336.
- **170.** Walsh FS, Doherty P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:425-456.
- 171. Adamsky K, Schilling J, Garwood J, Faissner A, Peles E. Glial tumor cell adhesion is mediated by binding of the FNIII domain of receptor protein tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) to tenascin C. Oncogene. 2001;20(5):609-618.
- **172.** Kawachi H, Fujikawa A, Maeda N, Noda M. Identification of GIT1/Cat-1 as a substrate molecule of protein tyrosine phosphatase zeta /beta by the yeast substrate-trapping system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(12):6593-6598.
- 173. Kawachi H, Tamura H, Watakabe I, Shintani T, Maeda N, Noda M. Protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta interacts with PSD-95/SAP90 family. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;72(1):47-54. bin/cas/tree/store/bresm/cas_sub/browse/browse.cgi?year=1999&volume=1972&i ssue=1991&aid=72194.
- 174. Ranscht B. Sequence of contactin, a 130-kD glycoprotein concentrated in areas of interneuronal contact, defines a new member of the immunoglobulin supergene family in the nervous system. *J Cell Biol.* Oct 1988;107(4):1561-1573.
- **175.** Gennarini G, Cibelli G, Rougon G, Mattei MG, Goridis C. The mouse neuronal cell surface protein F3: a phosphatidylinositol-anchored member of the immunoglobulin superfamily related to chicken contactin. *J Cell Biol.* Aug 1989;109(2):775-788.
- **176.** Gennarini G, Durbec P, Boned A, Rougon G, Goridis C. Transfected F3/F11 neuronal cell surface protein mediates intercellular adhesion and promotes neurite outgrowth. *Neuron.* Apr 1991;6(4):595-606.
- 177. Milev P, Maurel P, Haring M, Margolis RK, Margolis RU. TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta, and N-CAM. *J Biol Chem*. 1996;271(26):15716-15723.
- **178.** Roberts C, Platt N, Streit A, Schachner M, Stern CD. The L5 epitope: an early marker for neural induction in the chick embryo and its involvement in inductive interactions. *Development*. Aug 1991;112(4):959-970.
- **179.** Streit A, Faissner A, Gehrig B, Schachner M. Isolation and biochemical characterization of a neural proteoglycan expressing the L5 carbohydrate epitope. *J Neurochem.* Nov 1990;55(5):1494-1506.
- **180.** Allendoerfer KL, Magnani JL, Patterson PH. FORSE-1, an antibody that labels regionally restricted subpopulations of progenitor cells in the embryonic central nervous system, recognizes the Le(x) carbohydrate on a proteoglycan and two glycolipid antigens. *Mol Cell Neurosci.* 1995;6(4):381-395.
- **181.** Milev P, Meyer-Puttlitz B, Margolis RK, Margolis RU. Complex-type asparagine-linked oligosaccharides on phosphacan and protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta mediate their binding to neural cell adhesion molecules and tenascin. *J Biol Chem.* 1995;270(42):24650-24653.

- **182.** Zeng L, D'Alessandri L, Kalousek MB, Vaughan L, Pallen CJ. Protein tyrosine phosphatase alpha (PTPalpha) and contactin form a novel neuronal receptor complex linked to the intracellular tyrosine kinase fyn. *J Cell Biol.* 1999;147(4):707-714.
- **183.** Rios JC, Melendez-Vasquez CV, Einheber S, et al. Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J Neurosci*. Nov 15 2000;20(22):8354-8364.
- **184.** Fujikawa A, Watanabe E, Sakaguchi G, et al. Dopaminergic dysfunction in the mice lacking the receptor tyrosine phosphatase zeta/RPTP-beta gene. *Soc Neurosci Abstr.* 2001;31:539.514.
- **185.** Ratcliffe CF, Qu Y, McCormick KA, et al. A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Nat Neurosci.* 2000;3(5):437-444.
- **186.** Milev P, Chiba A, Haring M, et al. High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. *J Biol Chem.* 1998;273(12):6998-7005.
- **187.** Joester A, Faissner A. Evidence for combinatorial variability of tenascin-C isoforms and developmental regulation in the mouse central nervous system. *J Biol Chem.* 1999;274(24):17144-17151.
- **188.** Joester A, Faissner A. The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol.* Feb 2001;20(1):13-22.
- **189.** Milev P, Fischer D, Haring M, et al. The fibrinogen-like globe of tenascin-C mediates its interactions with neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta. *J Biol Chem.* 1997;272(24):15501-15509.
- **190.** Meng K, Rodriguez-Pena A, Dimitrov T, et al. Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta /zeta [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(6):2603-2608.
- **191.** Lemons ML, Howland DR, Anderson DK. Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation. *Exp Neurol.* Nov 1999;160(1):51-65.
- **192.** Li J, Tullai JW, Yu WH, Salton SR. Regulated expression during development and following sciatic nerve injury of mRNAs encoding the receptor tyrosine phosphatase HPTPzeta/RPTPbeta. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;60(1):77-88.
- **193.** Wu YP, Siao CJ, Lu W, et al. The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. *J Cell Biol.* Mar 20 2000;148(6):1295-1304.
- **194.** Kurazono S, Okamoto M, Sakiyama J, et al. Expression of brain specific chondroitin sulfate proteoglycans, neurocan and phosphacan, in the developing and adult hippocampus of Ihara's epileptic rats. *Brain Res.* Apr 13 2001;898(1):36-48.
- **195.** Laywell ED, Steindler DA. Boundaries and wounds, glia and glycoconjugates. Cellular and molecular analyses of developmental partitions and adult brain lesions. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;633:122-141.
- **196.** Perry VH, Brown MC. Macrophages and nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 1992;2(5):679-682.
- **197.** Hu S, Martella A, Anderson WR, Chao CC. Role of cytokines in lipopolysaccharide-induced functional and structural abnormalities of astrocytes. *Glia.* Mar 1994;10(3):227-234.
- **198.** Campbell IL. Cytokine-mediated inflammation and signaling in the intact central nervous system. *Prog Brain Res.* 2001;132:481-498.
- **199.** Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci.* Aug 1996;19(8):331-338.
- **200.** Schonherr E, Jarvelainen HT, Sandell LJ, Wight TN. Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* Sep 15 1991;266(26):17640-17647.
- **201.** Redini F, Daireaux M, Mauviel A, Galera P, Loyau G, Pujol JP. Characterization of proteoglycans synthesized by rabbit articular chondrocytes in response to transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Biochim Biophys Acta.* Jul 10 1991;1093(2-3):196-206.
- **202.** Romaris M, Heredia A, Molist A, Bassols A. Differential effect of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis in human embryonic lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. Jul 10 1991;1093(2-3):229-233.
- **203.** Benton HP, Tyler JA. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 15 1988;154(1):421-428.
- **204.** Jung M, Kramer E, Grzenkowski M, et al. Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci.* 1995;7(6):1245-1265.
- **205.** Fok-Seang J, Mathews GA, ffrench-Constant C, Trotter J, Fawcett JW. Migration of oligodendrocyte precursors on astrocytes and meningeal cells. *Dev Biol.* Sep 1995;171(1):1-15.
- **206.** Flanders KC, Ren RF, Lippa CF. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol.* Jan 1998;54(1):71-85.

- **207.** Flanders KC, Ludecke G, Engels S, et al. Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system. *Development*. Sep 1991;113(1):183-191.
- **208.** Krieglstein K, Suter-Crazzolara C, Fischer WH, Unsicker K. TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity. *Embo J.* Feb 15 1995;14(4):736-742.
- **209.** Krieglstein K, Rufer M, Suter-Crazzolara C, Unsicker K. Neural functions of the transforming growth factors beta. *Int J Dev Neurosci.* Jun-Jul 1995;13(3-4):301-315.
- **210.** Unsicker K, Meier C, Krieglstein K, Sartor BM, Flanders KC. Expression, localization, and function of transforming growth factor-beta s in embryonic chick spinal cord, hindbrain, and dorsal root ganglia. *J Neurobiol.* Feb 1996;29(2):262-276.
- **211.** Rapraeger A. Transforming growth factor (type beta) promotes the addition of chondroitin sulfate chains to the cell surface proteoglycan (syndecan) of mouse mammary epithelia. *J Cell Biol.* Nov 1989;109(5):2509-2518.
- **212.** Lindholm D, Castren E, Kiefer R, Zafra F, Thoenen H. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol.* Apr 1992;117(2):395-400.
- **213.** Logan A, Berry M, Gonzalez AM, Frautschy SA, Sporn MB, Baird A. Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci*. Mar 1 1994;6(3):355-363.
- **214.** Bronner-Fraser M. Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *Faseb J.* Jul 1994;8(10):699-706.
- **215.** Perris R, Johansson S. Inhibition of neural crest cell migration by aggregating chondroitin sulfate proteoglycans is mediated by their hyaluronan-binding region. *Dev Biol.* Jan 1990;137(1):1-12.
- **216.** Perris R, Perissinotto D, Pettway Z, Bronner-Fraser M, Morgelin M, Kimata K. Inhibitory effects of PG-H/aggrecan and PG-M/versican on avian neural crest cell migration. *Faseb J*. Feb 1996;10(2):293-301.
- **217.** Small RK, Riddle P, Noble M. Evidence for migration of oligodendrocyte--type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature*. Jul 9-15 1987;328(6126):155-157.
- **218.** Pringle NP, Richardson WD. A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development*. Feb 1993;117(2):525-533.
- **219.** Wolswijk G, Riddle PN, Noble M. Coexistence of perinatal and adult forms of a glial progenitor cell during development of the rat optic nerve. *Development*. Jul 1990;109(3):691-698.
- **220.** Hardy RJ, Friedrich VL, Jr. Oligodendrocyte progenitors are generated throughout the embryonic mouse brain, but differentiate in restricted foci. *Development*. Jul 1996;122(7):2059-2069.
- **221.** Milner R, Edwards G, Streuli C, Ffrench-Constant C. A role in migration for the alpha V beta 1 integrin expressed on oligodendrocyte precursors. *J Neurosci*. Nov 15 1996;16(22):7240-7252.
- **222.** Wang C, Rougon G, Kiss JZ. Requirement of polysialic acid for the migration of the O-2A glial progenitor cell from neurohypophyseal explants. *J Neurosci.* Jul 1994;14(7):4446-4457.
- **223.** Wang C, Pralong WF, Schulz MF, et al. Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: a critical role in regulating polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration. *J Cell Biol*. Dec 1996;135(6 Pt 1):1565-1581.
- **224.** Milner R, Anderson HJ, Rippon RF, et al. Contrasting effects of mitogenic growth factors on oligodendrocyte precursor cell migration. *Glia.* Jan 1997;19(1):85-90.
- 225. McKinnon RD, Piras G, Ida JA, Jr., Dubois-Dalcq M. A role for TGF-beta in oligodendrocyte differentiation. *J Cell Biol.* Jun 1993;121(6):1397-1407.
- **226.** Frost E, Kiernan BW, Faissner A, ffrench-Constant C. Regulation of oligodendrocyte precursor migration by extracellular matrix: evidence for substrate-specific inhibition of migration by tenascin-C. *Dev Neurosci.* 1996;18(4):266-273.
- **227.** Luckenbill-Edds L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997;23(1-2):1-27.
- **228.** Lee EC, Lotz MM, Steele GD, Jr., Mercurio AM. The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor. *J Cell Biol.* May 1992;117(3):671-678.
- **229.** Delwel GO, Hogervorst F, Kuikman I, Paulsson M, Timpl R, Sonnenberg A. Expression and function of the cytoplasmic variants of the integrin alpha 6 subunit in transfected K562 cells. Activation-dependent adhesion and interaction with isoforms of laminin. *J Biol Chem.* Dec 5 1993;268(34):25865-25875.
- **230.** Muller U, Bossy B, Venstrom K, Reichardt LF. Integrin alpha 8 beta 1 promotes attachment, cell spreading, and neurite outgrowth on fibronectin. *Mol Biol Cell*. Apr 1995;6(4):433-448.
- **231.** Varnum-Finney B, Venstrom K, Muller U, et al. The integrin receptor alpha 8 beta 1 mediates interactions of embryonic chick motor and sensory neurons with tenascin-C. *Neuron*. Jun 1995;14(6):1213-1222.

- **232.** Yokosaki Y, Palmer EL, Prieto AL, et al. The integrin alpha 9 beta 1 mediates cell attachment to a non-RGD site in the third fibronectin type III repeat of tenascin. *J Biol Chem.* Oct 28 1994;269(43):26691-26696.
- **233.** Bauvois B, Van Weyenbergh J, Rouillard D, Wietzerbin J. TGF-beta 1-stimulated adhesion of human mononuclear phagocytes to fibronectin and laminin is abolished by IFN-gamma: dependence on alpha 5 beta 1 and beta 2 integrins. *Exp Cell Res.* Jan 10 1996;222(1):209-217.
- **234.** Kumar NM, Sigurdson SL, Sheppard D, Lwebuga-Mukasa JS. Differential modulation of integrin receptors and extracellular matrix laminin by transforming growth factor-beta 1 in rat alveolar epithelial cells. *Exp Cell Res.* Dec 1995;221(2):385-394.
- **235.** Paulus W, Sage EH, Jellinger K, Roggendorf W. Type VIII collagen in the normal and diseased human brain. *Acta Histochem Suppl.* 1992;42:195-199.
- **236.** Iida J, Skubitz AP, Furcht LT, Wayner EA, McCarthy JB. Coordinate role for cell surface chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 4 beta 1 integrin in mediating melanoma cell adhesion to fibronectin. *J Cell Biol.* Jul 1992;118(2):431-444.
- **237.** Milner R, Ffrench-Constant C. A developmental analysis of oligodendroglial integrins in primary cells: changes in alpha v-associated beta subunits during differentiation. *Development*. Dec 1994;120(12):3497-3506.
- **238.** Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*. Feb 6 1997;385(6616):537-540.
- **239.** Revest JM, Faivre-Sarrailh C, Maeda N, Noda M, Schachner M, Rougon G. The interaction between F3 immunoglobulin domains and protein tyrosine phosphatases zeta/beta triggers bidirectional signalling between neurons and glial cells. *Eur J Neurosci.* 1999;11(4):1134-1147.
- **240.** Snow DM, Brown EM, Letourneau PC. Growth cone behavior in the presence of soluble chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), compared to behavior on CSPG bound to laminin or fibronectin. *Int J Dev Neurosci.* Jun 1996;14(3):331-349.

Manuscrit 9

"Tenascin glycoproteins and the complementary ligand DSD-1-PG/phosphacan - structuring the neural extracellular matrix during development and repair"

Jeremy Garwood, Franck Rigato, Nicolas Heck et Andreas Faissner

Restorative Neurology and Neuroscience 2001 Vol. 19 (1-2): 51-64

TENASCIN GLYCOPROTEINS AND THE COMPLEMENTARY LIGAND DSD-1-PG/PHOSPHACAN – STRUCTURING THE NEURAL EXTRACELLULAR MATRIX DURING DEVELOPMENT AND REPAIR

Jeremy Garwood, Franck Rigato, Nicolas Heck and Andreas Faissner*

Laboratoire de Neurobiologie du Développement et de la Régénération (LNDR), Centre de Neurochimie, 5, Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France.

*since 15/10/00 at: Department of Cell Morphology and Molecular Neurobiology, Ruhr-University, Building NDEF 05/593, Universitätsstr. 150, 44780 Bochum, Germany.

Corresponding author:

Jeremy Garwood, Laboratoire de Neurobiologie du Développement et de la Régénération (LNDR), Centre de Neurochimie, 5, Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France.

e-mail: garwood@neurochem.u-strasbg.fr

Telephone: +33-388 45 66 53

Fax: +33-388 41 17 80

Keywords: RPTP-beta, chondroitin sulphate proteoglycan, glial scar, glioma, neurite outgrowth, migration,morphogenesis.

Summary.

The differentiation and morphogenesis of neural tissues involves a diversity of interactions between neural cells and their environment. Many potentially important interactions occur with the extracellular matrix (ECM), a complex association of extracellular molecules organised into aggregates and polymers. The large modular glycoprotein, Tenascin-C, and the chondroitin sulphate proteoglycan, DSD-1-PG/Phosphacan, have complex and frequently overlapping expression patterns in the developing CNS. Their presence in zones of cell proliferation, migration, and differentiation, as well as in boundary structures, suggest that they may be involved in the modulation of an extensive range of cellular processes. They are both strongly up-regulated in a range of CNS lesions and pathologies, being components of the glial scar, and expressed by gliomas. Functional roles in many cellular processes are possible through their extensive molecular interactions sites both with each other and with many of the same cell surface receptors, adhesion molecules, growth factors and other matrix proteins. These multiple interactions involve sites on both their protein domains and on the heterogeneous carbohydrate groups which they are post-translationally modified. In vitro assays demonstrate cell-type specific effects on adhesion, migration and the formation and extension of cellular processes, including neurites and axons.

Introduction: The neural environment.

The differentiation and morphogenesis of neural tissues involves a diversity of interactions between neural cells and their environment. Many potentially important interactions occur with the extracellular matrix (ECM), a complex association of extracellular molecules organised into aggregates and polymers [1, 24, 31].

Extracellular matrix is the term generally given to any material produced by cells and secreted into the surrounding medium. The ECM can be divided into three component classes: fibrous elements, particularly collagen and elastin; link proteins such as fibronectin and laminin, and space-filling molecules, principally glycosaminoglycan polymers (GAGs).

The ECM of connective tissue is particularly extensive and determines the properties of the tissue: it may be mineralised to resist compression, as in bone, or predominantly composed of tension-resistant fibres, as in tendons.

Basement membrane is the ECM characteristically found under epithelial cells and consists of two distinct layers: the basal lamina, immediately adjacent to the cells, is a product of the epithelial cells themselves and contains collagen type IV; the reticular lamina is produced by fibroblasts of the underlying connective tissue and contains fibrillar collagen.

The extracellular matrix can be considered as both a structural support for the overall shape of a tissue, as a means of delimiting different tissue sub-types, for example, cortical layers, and as a medium of cell-cell communication, filled with many kinds of signalling molecules.

Hence, the ECM of tissue serves not only to hold the cells together in a tissue, and to give the tissue its characteristic shape and texture, it also plays an important role in the development and functional maintenance of tissue, influencing the proliferation, survival, migration and differentiation of cells [51, 93].

The neuronal ECM is relatively extensive since although there are some populations of astrocytes, beneath the meninges and at certain other locations in the central nervous system (CNS), which are linked by gap junctions with a subsequently narrow extracellular space between them, the neurons and glial cells forming the CNS are mostly separated by extracellular space, filled with a dynamic ECM composed of a wide variety of proteins and carbohydrate structures [71]. In quantitative terms, it is estimated that this ECM could represent up to 20% of the total volume of the adult brain with all of the potential roles in development and functional maintenance of the tissue that this implies [72].

Relative to other body tissues, most of the ECM of the CNS seems to have a fairly loose structure. There are however several regions where relatively organised connective tissue and basement membranes are formed, most notably the meningeal coverings: the dura mater, the arachnoid mater, and the pia mater, which are composed of interlacing collagenous bundles surrounded by fine elastic networks [5]. Nevertheless, it is possible to extract many of the elements of the neural ECM from tissue homogenates using physiological buffers suggestive of a much more open structure than that found in other tissues.

Type of molecules present in the extracellular space.

The extracellular space is filled with an assortment of molecules, ranging from small ionic species to huge polymers attaining sizes of several million daltons. The ECM is composed of proteins and carbohydrate polymers which are secreted into the space between the cells and which are likely to contribute to the higher organisation structure of the ECM by interacting with each other and with the surfaces of the cells. The interactions of the molecules of the ECM with the membrane-bound receptors on the cell surface, provides structural coherence to the organisation of the tissue, and a means of transmitting extracellular signals into the cells, or alternatively of sending signals from cells via molecules in the ECM.

In compositional terms, the ECM of the CNS is relatively rich in chondroitin sulfate proteoglycans and hyaluronan but poor in fibrous elements. Although there are many ECM components which are also found in non-neural tissues, such as tenascins, fibronectin, and laminin, there are also many components which appear to be specific to the CNS, including the chondroitin sulphate proteoglycans, DSD-1-PG/phosphacan and neurocan.

As a general feature, the proteins described tend to be of a modular nature, that is, they are composed of varying combinations of conserved protein domains which occur in other extracellular proteins, the number and juxtaposition of these domains tending to be characteristic of particular protein families [24, 35].

In addition, there is extensive glycosylation of many of these proteins, the most extreme example being some of the proteoglycans, in which the sugar modifications account for the majority of the molecule.

ECM in neural regeneration.

Traumatic injury to the adult central nervous system(CNS) results in a rapid response from resident astrocytes, a process often referred to as reactive astrogliosis or glial scarring [57]. As with wound repair in other tissues, there are three underlying processes which seem to follow a specific time sequence, the initial inflammatory phase being followed by tissue formation and tissue remodelling, although these three phases of wound repair are not mutually exclusive [11]. Within the first few hours after injury, neuronal and glial cells undergo cell death at the injury site, with a concurrent recruitment of CNS microglia and peripheral monocytes (including macrophages). Leptomeningeal cells, which are normally found on the surface of the CNS, as well as fibroblasts migrate into the wound cavity and aid in the reformation of the basal lamina. Within 3-5 days after injury, reactive astrocytes have begun to "wall-off" the lesioned region. Astrocytes accomplish this by migrating from the adjacent undamaged parenchyma towards the injured site, and interdigitating their processes. These astrocytic responses create a dense plexus, or wall, of astroglial cells, which is often referred to as anisomorphic gliosis, whereas isomorphic gliosis refers to reactive astrocytes that have yet to form an interdigitating wall [57].

Functional CNS regeneration following injury/neurotrauma is clearly impaired in mammals

compared to other animal families. Many studies of CNS regeneration models over the last decade indicate that the robust formation of the glial scar and its associated extracellular matrix (ECM) molecules are preventing any subsequent neural repair or CNS axonal regeneration. Hence, considerable effort is being directed toward understanding the mechanisms of astrogliosis and the roles which the associated ECM molecules play in the process of regeneration [21].

Many of the components of the ECM which are expressed in the glial scar have been identified and the aim of our laboratory has been to further understand the roles that these molecules of the ECM play in the normal development of the nervous system and as such to gain a better insight into the roles that they might be playing in neural lesions, tumours and neurodegenerative pathologies. We have concentrated our research on two particular ECM molecules, the glycoprotein, tenascin-C, and the chondroitin sulphate proteoglycan, DSD-1-PG/phosphacan.

Our approach has combined the development of molecular and immunological tools which have been employed in in vitro assays on neuronal cultures and in localisation studies on normal and lesioned animals.

Tenascins.

The tenascin family comprises five distinct members: tenascin-C (TN-C), tenascin-R (TN-R), tenascin-W (TN-W), tenascin-X (TN-X), and tenascin-Y (TN-Y). The tenascins display highly restricted and dynamic patterns of expression in the embryo, particularly during neural development, skeletogenesis, and vasculogenesis. These molecules are reexpressed in the adult during normal processes such as wound healing, nerve regeneration, and tissue involution, and in pathological states including vascular disease, tumorigenesis, and metastasis [17, 38, 39]. Of the tenascins, TN-C, TN-R, and TN-Y have been documented in the CNS [17].

TN-C has been the subject of most of the functional and regulatory studies of tenascins in general as well as in our laboratory, hence we will focus on TN-C in more detail.

Structure of Tenascin-C.

Tenascins are characterised by a serial arrangement of a cysteine-rich amino-terminus, followed by varying numbers of epidermal growth factor-type repeats (EGF), succeeded by multiple fibronectin type III repeats (FNIII), and a carboxy-terminus with homologies to fibrinogen-beta and –gamma [37-39] (Figure 1).

Hence, the basic TN-C protein in mouse comprises 14.5 EGF-type repeats, followed by 8 FNIII repeats. However, there is considerable splicing of upto six additional FNIII domains between the fifth and sixth FNIII units of the basic structure, potentially resulting in upto 64 different isoforms, of which 27 have been shown to be expressed as mRNAs [36].

TN-C monomers range in size between 190 and 300 kDa but it seems likely that they occur as disulfide-linked oligomers. Rotary shadowing images show that, in vitro, TN-C forms a striking, highly symmetrical structure called a hexabrachion. The six monomer chains are linked at their amino termini via a tenascin assembly (TA) domain which contains cysteine residues and between 3 and 4 alpha-helical heptad repeats that enable the amino termini of TN polypeptides to be linked into oligomeric structures. Assembly of the TN-C hexabrachion is a two-step process, involving formation of trimers and then linkage of trimers into hexamers. Trimer formation is initiated by association of three TN-C polypeptides in a triple-stranded coiled coil by the heptad repeats. Trimers are further stabilized by interchain disulfide bonds at two cysteine residues amino terminal to the heptad region. The clustering of TN-C chains creates a multivalent TA domain that interacts homophilically with another trimer to form a hexamer. Hexamers are then stabilized by disulfide linkages at a cysteine residue that is located 50 residues amino terminal to the heptad repeat. TN-C is currently the only member of the TN family known to form hexabrachions, while TN-R has been shown to form trimers [39, 40].

TN-C is also capable of forming nonamers, indicating that native TN-C molecules exist predominantly as multiples of three. Heterotypic hexamers have been observed in which a trimer containing a particular variant of TN-C is linked to a trimer containing a different variant. Overall, these observations suggest that two types of heterotypic trimers (one made up of more than one splice variant of TN-C and another composed of more than one tenascin family member, e.g., TN-C and TN-R) might be possible. Assembly of heterotypic TN multimers might provide additional combinatorial diversity of ECM structure and function in cellular contexts in which more than one TN gene or splice variant is expressed. It is uncertain how prevalent TN oligomers are in the ECM and whether binding to particular ligands influences the ability of TNs to form such oligomers.

The EGF-like repeats in tenascin are 31 amino acids in length and contain six cysteine residues that participate in intrachain disulfide bonds. Tenascin EGF domains are more compact structures than EGF itself and, unlike EGF repeats found elsewhere, such as in the Notch, Delta, and Serrate receptors, they lack the acidic residues required for calcium binding [39, 40].

The fibronectin type III domains contain approximately 90 amino acids and are extended globular structures composed of seven antiparallel beta-strands arranged in two sheets. FNIII arrays are highly elastic and can be stretched to several times their length and refolded rapidly. Particular peptide motifs within individual FNIII domains bind to several ligands including other ECM proteins, glycosaminoglycans, and a number of different cell surface receptors. FNIII domains are susceptible to proteolytic degradation, allowing TN-containing matrices to be selectively remodeled, particularly by matrix metalloproteinases (MMPs) and serine proteases [38, 39]. The nature and number of FNIII domains in tenascin polypeptides are altered by alternative RNA splicing. This can generate a considerable diversity in the functions of TN polypeptides. Thus, in mouse, there are six spliced FNIII domains, whereas in human TN-C, at least nine different FNIII domains have been identified that are differentially included or excluded by RNA splicing. Some of the TN-C splice variants occur at distinct frequencies during development of the nervous system, in smooth muscle, kidney, and the cornea. Using RT-PCR, as many as 27 different FNIII variants of TN-C have been found during mouse brain development, indicating that many of the theoretically possible combinations of FNIII repeats are likely to be expressed during tissue morphogenesis. Selection of particular TN-C splice variants is modulated by the proliferative state of the cell, by extracellular pH, and by polypeptide growth factors such as TGF-beta1. Currently, however, the mechanisms that determine preferential splice site selection of TN mRNAs in the region of the FNIII repeats are unknown [37-39].

TN-C occurs as a glycoprotein with upto 20 Nglycosylation sites in the full-length isoform. Enzymatic digestion of TN-C with N-glycosidase F reduces its apparent size on SDS-PAGE by around 20-30 kD. Interestingly a disproportionate number of the Nglycosylation sites occur in the alternatively spliced FNIII domains: there are 3 sites on the 8 constitutive FNIII domains but upto 11 sites are present in the spliced domains. The differential addition of sugars with additional functions, such as the HNK-1 epitope, which is implicated in neural cell migration, is another level at which the properties of TN-C protein may be altered.

The fibrinogen globe contains polypeptide loops formed by two consecutive intrachain disulfide bonds. It can bind calcium through an EF-hand motif and this calciumbinding property can also influence interactions with other proteins [38, 39].

In the ECM, TN-C can be classified as a link protein, placing it with other modular oligomerising glycoproteins such as laminin and fibronectin.

Tenascin-C expression in CNS development.

TN-C has been detected as early as embryonic day 10 in the developing mouse nervous system. The molecule is mainly secreted by immature and reactive astrocytes, and by subsets of radial glia cells. In addition, a restricted number of immature neurons including granule cells in the hippocampus and some motoneurons of the spinal cord as well as a subclass of neurons of the developing retina produce TN-C. In the adult, the protein is restricted to regions such as the molecular layer of the cerebellum, the olfactory bulb, and the optic nerve head [6, 69].

TN-C expression can be correlated with key events of neurohistogenesis, such as cell proliferation in the ventricular and subventricular zones, neuronal migration, segregation of neuronal assemblies and extension of neuronal processes.

In many cases TN-C immunoreactivity is located in a discrete fashion, and one remarkable feature of the resulting patterns is the development of a transient boundary-like appearance, which correlates with the functional subdivision of neuroanatomical systems. Thus, TN-C has been found in the so-called barrel boundaries of the somatosensory cortex in the striatal mosaic, in fibre tracts of the internal capsule, in functional compartments of the trigeminal nucleus, in glomeruli of the mouse olfactory bulb and in the optic nerve head. The emergence of these patterns can be correlated with periods when such brain structures are sensitive to modelling by environmental factors [17, 20].

Although these findings indicate that TN-C is a boundary constitutent, other studies have highlighted extensive TN-C co-expression with vigorous fibre growth or ongoing plasticity, e.g. in the developing mouse optic nerve, in the cerebellar and cerebral cortices, in hypothalamic nuclei, in the regenerating sciatic nerve and in tibial nerve implants to the adult thalamus. These observations imply that the growth of axon tracts through TN-C-containing territories is not generally impeded.

By comparison, TN-R displays a more restricted expression than TN-C and seems to be confined to the CNS where it is primarily produced by oligodendrocytes [97].

The differential distribution, regulation, and function of TN-C variants have been investigated primarily by comparing large with small TN-C isoforms. As a result of these studies the occurrence of large TN-C isoforms has been correlated with processes of cell migration and tissue remodelling, e.g. the migration of cerebellar granule cells along Bergmann glia fibres and the progression of glioblastoma [37]. While TN-C is absent from most regions of the normal adult brain, the protein persists in areas known to retain a high degree of plasticity, in particular in the nuclei of the hypothalamus which are implicated in aspects of endocrine regulation [95].

Functions of tenascin-C.

TN-C has been shown in different in vitro assays to exert both inhibitory and stimulatory actions on neuronal cells affecting cell adhesion and migration, and axon growth and guidance [14, 17, 19, 27, 28, 34, 61]. These diverse functions have been localised to distinct functional domains using proteolytic fragments and fusion proteins. Hence, for example, an analysis of the alternatively spliced FNIII domains shows that together they support short-term, but not long-term, adhesion of embryonic and early post-natal neurons, whilst FNIII domains A1, A2, and A4 together exhibit repulsive properties on hippocampal neurons, whereas FNIII BD and D6 promote neurite-outgrowth [27]. These contrary cellular functions also seem to depend on their mode of presentation, that is, whether the proteins are soluble or substrate-bound, and also upon the cell types and differentiation states of the target tissues [28].

In light of the restricted expression in boundaries, TN-C has been examined for anti-adhesive, inhibitory properties and this was one of the first functional activities ascribed to this glycoprotein [19, 20]. The antiadhesive properties of TN-C emerge in choice situations where TN-C alternates with a polycation as growth substrate, or when contrasted with a supportive glycoprotein such as laminin-1 [15, 94]. The antiadhesive properties induce a growth cone turning which is probably associated with the reorganization of the cytoskeleton at the interface between TN-C and the substrate containing laminin-1. Although TN-C displays these anti-adhesive properties in choice situations, it permits neurite- and axon growth in no choice situations, when exposed as a homogeneous substrate [27, 49, 50]. Other substrates such as TN-R [80] and DSD-1-PG/phosphacan (see later) have also been found to have this effect in such assays. Under the conditions of a homogeneous substrate, both TN-C and TN-R were found to promote elongation of neurites from E18 hippocampal neurons in a 24 h assay *in vitro* [49, 50]. On the other hand, some neuronal types did not show process formation on a tenascin-containing substrate, for example retinal neurons *in vitro*, indicating that the lineage of the neuronal type in question is important for the outcome of the assay [17].

The effect of TN-C on the behavior of oligodendrocyte precursors was also examined in view of its presence in a plug in the adult mouse optic nerve head which seems to serve as a demarcation barrier for these cells [6]. It could be shown that TN-C has anti-adhesive properties for oligodendrocytes and their precursors and that these antiadhesive properties correlate with anti-migratory effects of the glycoprotein.

Using different cell types it could, however, be shown that the anti-adhesive properties and inhibition of oligodendrocyte precursor motility were encoded by different domains. Hence, based on *in vitro* assays, it appears that TN-C and contains binding sites for defined cell types, sites which are involved in the phenomenon of anti-adhesion and growth cone deflection, a site which is involved in the promotion of axon growth and, sites which selectively influence the migratory behavior of oligodendrocyte precursors [23, 42].

Antibody blocking studies with specific monoclonal antibodies show that these multiple functions of TN-C are associated with different sites on the molecule. Thus, an antibody which blocks neurite outgrowth promotion by TN-C was not efficient in blocking the anti-adhesive properties of the glycoprotein, or its influence on oligodendrocyte precursor motility [23, 42, 50].

To further analyse the differential properties of the different domains of TN-C, fusion proteins have been expressed and purified from bacterial and mammalian expression systems and the resulting constructs have been tested in *in vitro* bioassays. Thus, a cell binding site for cerebellar neurons could be attributed to the FNIII-domains 1-3 while a neurite outgrowth promoting site

could be attributed to TN FNIII-repeats, TNfnBD and TNfnD6 around the distal splice site of TN-C [27].

Using analogous methods, the site responsible for the inhibition of oligodendrocyte precursor migration could be attributed to TNfn7,8 [42]. TN-R also contains distinct functional sites, as shown by a combined approach using specific monoclonal antibodies and recombinant TN-R-domains [99]. A summary of the functions ascribed to the different domains of TN-C is shown in Figure 2.

Receptors and Binding Partners for TN-C.

It is probable that the different functions of TN-C are enacted by distinct receptors, which might recognize selective sites in the different functional domains. In this regard, the interaction of TN-C with CNS neurons might imply the integrin alpha8beta1 in embryonic chick motor- and sensory-neurons [96]. Another connection is probably linked to the Ig-superfamily member contactin/F11/F3, an adhesion molecule which seems to interact both with TN-C and TN-R [17, 99]. It is probable that this interaction is linked to signal transduction events because F3/F11/contactin is a GPIlinked glycoprotein of the neuronal surface and associated with the signal transduction mediator CASPR/paranodin and the non-receptor tyrosine kinase fyn [74]. Another receptor which seems to react both with TN-C and TN-R has recently been described, the neuronal ligand CALEB (Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain-containing brain protein). This protein has been presented as a neuronal competence factor that is implicated in neurite outgrowth of E10 chicken tectal neurons on a variety of substrates, including laminin-1, Ng-CAM and F3/F11/contactin. CALEB might activate neuronal responses involved in the regulation of neurite growth via interaction with TN-C [83]. In this regard, TN-C might link cell surface proteins of neurons in a bridge-like fashion to other constituents of the matrix, and such a bridge function of TN-C has recently been set forward [100]. In these approaches, tenascins have been presented as modulators of neural-cell-interactions with their environment.

TN-C also interacts with other ECM components such as the CSPGs, neurocan [76] and DSD-1-PG/phosphacan [2, 68](see later). Since these molecules can also bind to many of the same cell-surface receptors, there is likely to be competition for binding sites in a concentrationdependent fashion. However, interactions in the ECM are probably more complex since, for example, interactions between TN-C and phosphacan may serve to mask sites on these molecules to prevent them from binding to the cell surface until other triggers such as selective proteolytic degradation of TN-C exposes them again. Hence the relative localised concentration of the different binding sites on these molecules may be subject to a variety of regulatory mechanisms in the ECM about which we still know relatively little.

Expression of tenascins is regulated by a variety of growth factors, cytokines, vasoactive peptides, ECM proteins, and biomechanical factors [4, 8, 40]. The signals generated by these factors converge on particular combinations of cis-regulatory elements within the recently identified TN gene promoters via specific transcriptional activators or repressors [4, 13, 39, 85], for example, Sp1 and Ets proteins act as potent activators of TN-C expression [85], and OTX2 binds and represses the human tenascin-C promoter [26].

Tenascin expression in lesions and pathologies.

The association of TN-C with development and its downregulation after histogenesis in most organs is consistent with the hypothesis that the glycoprotein is associated with tissue re-modelling [17, 38, 39]. In view of its various effects on neuronal fibre growth, this raises the possibility that it is involved in axon growth behaviour in lesioned neuronal tissue. Up-regulation of TN-C after denervation was first reported in the neuromuscular junction, at the original synaptic site, where it was detectable until re-innervation had proceeded. TN-C might thus contribute to the regeneration of this structure, which contains specific cues directing and halting regrowing motor fibres.

TN-C is also considerably enhanced in the lesioned peripheral nerve, in close association with collagen fibres

and with Schwann cell basal laminae, reflecting interactions with ECM constituents [19, 55]. Here, its appearance and subsequent down-regulation closely follows the schedule of retrograde nerve fibre degeneration and subsequent regrowth to the peripheral target [102]. The continuous application of polyclonal antibodies to TN-C results in a quantifiable reduction of the degree of re-innervation of the denervated neuromuscular junctions, both in frog and mouse, which implies a supportive role in vivo [47, 60]. However, the TN-C knockout mutant does not exhibit impaired regeneration of lesioned peripheral nerves [22].

With respect to CNS lesions, upregulation of TN-C has been documented in the outer molecular layer of the fascia dentata of the dentate gyrus, after transsection of the entorhinal cortex afferents. This region is repopulated by fibre sprouts from various CNS regions and serves as a model for regenerative sprouting in the CNS. TN-C is upregulated in conjunction with DSD-1-PG/phosphacan in a territory confined to the outer molecular layer of the fascia, consistent with the view that it might pave the way for sprouting and synaptogenesis [14]. In contrast, the upregulation of TN-C in the mouse dorsal root entry zone after lesion of the afferents has been interpreted as forming an active barrier that prevents the ingrowth of regenerating DRG-derived afferents into the dorsal horn of the spinal cord [75]. TN-C glycoproteins also exhibit enhanced expression in stab wounds of mouse and human CNS, in the hippocampus of adult rats upon injection of kainic acid and in cases of Ammon's horn sclerosis [48, 59, 81]. Adult brain membranes attached to nitrocellulose brain implants that habour TN-C reduce neurite outgrowth from dissociated retinal neurons plated onto this substrate [59]. These inhibitory properties, however, could also be the result of the enhanced expression of proteoglycans in these preparations and a direct link of inhibitory activity to TN-C has not yet been established. Therefore, the biological significance of the up-regulation of TN-C in CNS wounds in experimental animals, human subjects and human CNS tumours remains at present unknown [17, 73, 101].

Functional studies of tenascins in vivo.

In light of the numerous activities attributed to tenascins in vitro, it was surprising that TN-C knock-out mice were viable, fertile and did not show an overtly abnormal phenotype [78, 91]. However, more detailed studies have begun to reveal subtle abnormalities. The most impressive phenotype so far has been identified outside the nervous system in a model of experimental glomerulonephritis which can be induced by the injection of snake venom into mice. In the case of TN-C mice, the recovery from glomerulonephritis was impaired [41]. This observation is consistent with the fact that TN-C is expressed in response to lesion, so that future investigations of its function should be directed towards amelioration of pathological conditions. With regard to the nervous system, systematic analysis of the behaviour of TN-C mice showed that they display abnormalities in motor co-ordination and exploratory behaviour. This indicates that TN-C is important for the fine-tuning of neuronal connections and/or synaptogenesis, consistent with the observations relating to TN-C functions in vitro. TN-R knockout mice display a more striking neural phenotype with decreased axonal conduction velocities in the CNS. While the anatomy of major brain areas and myelination appeared normal, immunostaining for DSD-1-PG/phosphacan was weak and diffuse in the optic nerve of the mutant when compared with wild type animals in which there was a punctate staining of the distal myelinated part of the optic nerve. This abnormality in the extracellular matrix correlated with changes in compound action potentials and a significant decrease of conduction velocity along the nerve. No alterations in the distribution of Na+channels at the nodes of Ranvier were apparent in these animals so that the detailed cause of the neurological deficit remains to

In summary, the present results obtained with mouse mutants deficient for TN-C and TN-R indicate that the functional significance of individual tenascins might be limited. However, in addition to the possibility of an overt phenotype of tenascin mutation displayed only after lesion it remains to be established if there is redundancy

be established.

of function between members of the family and/or compensatory up-regulation of tenascins. Certainly the functional potentials of TN-R and TN-C appear to be similar as demonstrated by a variety of in vitro approaches. Thus, the combination of individual knockouts within the tenascin gene family may be necessary to generate phenotypes delineating the full function of the tenascins, as has been shown for other families of genes with redundant phenotypes.

DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan: Proteoglycans in the CNS.

Proteoglycans (PGs) are proteins bearing sulfated glycosaminoglycans (GAGs) which are located at strategic sites such as the cell surface and extracellular matrix spaces, not only in connective tissues, but also in the nervous system [7, 24, 45]. It has been shown that they can bind many extracellular matrix components and growth factors via both their core proteins and their sugar chains and it is through such interactions that they can play important regulatory roles in cellular processes such as proliferation, migration, cell-cell and cell-substratum adhesions, as well as in morphological changes and differentiation [46, 84].

The role of proteoglycans (PGs) in the normal development and functioning of the nervous sytem as well as in regeneration of damaged nervous tissue is the subject of much recent investigation, with reports demonstrating their involvement in cell migration, axon guidance, neural plasticity, and neuronal survival [7, 32]. Chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs) are the most abundant subtype of PG in the CNS. They have a wide distribution in the brain which often coincide with that of growing axon tracts [53, 54]. In the rat brain CS expression has been detected as early as E13 with peaking amounts at E18. CSPGs are expressed in several regions in the ventral rhombencephalon and pons, in dorsal thalamus, hypothalamic nuclei, the medial eminence, the striatum as well as in the developing dopaminergic forebrain bundle. This last location has been strongly correlated with the establishment of the nigro-striatal system. After birth, levels of CSPGs appear to decrease dramatically, but they are still abundantly detected in those regions whose development extends postnatally, as cerebellum and hippocampus [7, 32, 54].

Structure of DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and RPTP-beta.

DSD-1-proteoglycan (DSD-1-PG) originally was identified using the monoclonal antibody 473HD which recognises a chondroitin sulfate (CS) epitope, DSD-1, on the proteoglycan [18]. It was purified from postnatal detergent-free mouse brain extracts using affinity chromatography with 473HD. The DSD-1-PG has an apparent molecular mass around 800-1000 kiloDaltons (kD) which upon enzymatic digestion of its CS GAG chains is reduced to a prominent core glycoprotein around 350-400 kD. Peptide sequences from the core protein and screening of cDNA expression libraries using a polyclonal antibody raised against the protein led to the identification of DSD-1-PG as the mouse homolog of the rat CSPG, phosphacan [25] (also known as 6B4proteoglycan [52]). The protein has a predicted molecular mass of 180 kD but can be upto 800kD due to extensive glycosylation. PGs are constituted of a polypeptide backbone (core protein) and by one or more linear chains of polysaccharides known as glycosaminoglycans (GAGs) [43]. In many cases, N- and O-linked oligosaccharides are also covalently bound to the protein core, further increasing the structural diversity of these molecules. PGs are very different from typical glycoproteins not only because of the composition of the sugar moieties but also because of their molecular mass, which can be enormous and made of up to 95% of sugar chains [43].

At its amino-terminus there is a carbonic anhydrase-like domain followed by a single fibronectin type III domain although the remainder of the protein has no apparent strong homology with other known proteins. It is equivalent to the entire extracellular portion of a receptor protein tyrosine phosphatase, RPTP-beta [56, 66] (also known as PTP-zeta [44]) (Figure 3). Receptor protein tyrosine phosphatases (RPTPs) contain a variable extracellular domain, a transmembrane domain and one or two intracellular tyrosine phosphatase domains. Depending on the RPTP subtype, the extracellular domain exhibits immunoglobulin- and fibronectin-like regions and other sequence motifs involved in cell-cell adhesion [92]. There are two forms of RPTP-beta: in the long form, the entire extracellular domain is identical to DSD-1-PG/phosphacan, while in the short form half of the extracellular domain, equivalent to the C-terminus of phosphacan is spliced out (Figure 3).

In the ECM, PGs are considered to be space-filling molecules because of their size and hydrodynamic properties. As a highly glycosylated PG, DSD-1-PG/phosphacan probably occupies a relatively large molecular volume (Figure 4). This is because of the relatively rigid structure of the sugar modifications. Hence, a typical N-linked sugar of less than 1 kD is comparable in size to a folded protein domain of more than 50 amino acids (e.g. an immunoglobulin domain) [77]. Glycosaminoglycan chains (GAGs) are large and fairly rigid linear polymers which extend perpendicularly from the protein core. CS GAG chains are typically polymers of 50 to 100 repeating disaccharides composed of D-glucuronic acid and N-acetyl-galactosamine, hence the addition of several GAG chains can considerably augment the molecular space occupied by the protein. In addition to CS GAG chains, of which there are at least four with a molecular weight of around 25kD each, phosphacan can possess keratan sulfate GAG chains (of around 10kD), and a variety of smaller N-linked sugars, including the HNK-1 epitope and Lewis-X [3, 63].

Another consideration is the presence of carboxyl groups and sulphates on the GAGs. Apart from giving the GAG chains a highly negative charge, the complex addition of these sulphated groups along the GAG chains provides an inherent heterogeneity to each GAG structure [43, 54]. In addition, because each chain has a singular arrangement of the monosaccharide residues, each individual proteoglycan molecule probably represents a unique chemical entity. The DSD-1 epitope on DSD-1-PG/phosphacan is an example of such a specific GAG sequence. Biochemical studies of the epitope have so far shown it to be enriched in CS D disaccharides and to be less than 14 dissacharides in length. Recognition of the epitope by the 473HD antibody is dependent on the sulphation of this oligosaccharide [12].

Expression of DSD-1-PG/Phosphacan in the developing CNS.

Studies of the distribution of both the phosphacan mRNA [16] and of the expressed protein [62] show that, for example, at E13-16, the phosphacan mRNA is largely confined to areas of active cell proliferation such as the ventricular zone of the brain and the ependymal laver surrounding the central canal of the spinal cord. Also, although the mRNA is mostly in the neuroepithelium of the embryonic brain and spinal cord, the protein is widely distributed in these tissues, presumably as a consequence of transport in or along glial processes, local secretion and/or redistribution as a consequence of cell migration [62]. Based on the punctual expression pattern of phosphacan throughout the developing nervous system, it has been proposed that it may play a role in neuronal migration, differentiation and circuit formation [52, 62].

Interestingly the expression of phosphacan often overlaps with that of TN-C. Hence the distribution of DSD-1-PG/ phosphacan during development has been found to correspond to regions related to the formation of axonal trajectories. In this respect, it might play either a neurite promoting role as in the interrhomberic boundaries in chick [33], or an inhibitory role which would correspond to its presence in glial barrel field boundaries in the developing somatosensory cortex of mouse [91].

RPTP-beta is predominantly expressed in the nervous system where it is mainly found in glial precursors, radial glia and astrocytes [9] as well as in certain neurons [89]. The expression of the different forms of RPTP-beta is regulated during development of the glial lineage. Early in development, high levels of the receptor forms are found in proliferating precursor cells at the subventricular zones. As development progresses and cells mature, these receptor forms are replaced by the secreted non-phosphatase form [10, 79].

Expression of DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan in Lesions and Pathologies.

In models of CNS lesions, the upregulation of proteoglycan expression by reactive astrocytes has been reported, mostly using antibodies directed against CSPGs. Several laboratories have investigated the expression of specific proteoglycans at the lesion sites and most of the CSPGs expressed in the CNS, including NG2, neurocan, and versican have been found to be upregulated after injury [21].

DSD-1-PG has also been found to be strongly upregulated in the context of CNS lesions. Hence, in stab wounds to the cortex and thalamus, DSD-1-PG/phosphacan and RPTP-beta expression by reactive astrocytes in the region surrounding the knife entry site has been shown by immunohistochemistry and in situ hybridization [48, 58, 90]. However, an attempt to quantify this expression seems to show that although the levels of mRNA increase in the chronic glial scar (as shown by RT-PCR), the phosphacan protein levels on immunoblots may be lower than in uninjured control tissue [58].

In the enthorhinal cortex lesion model, which leads to the destruction of the perforant path innervating the hippocampus, an upregulation of DSD-1-PG/phosphacan is seen in the molecular layer of the dentate gyrus [14]. In another study, combined lesions of the enthorhinal cortex and fimbria-fornix pathway showed an upregulation of RPTP-beta mRNA in the molecular layer of the dentate gyrus and of the CA1 region of the hippocampus [89].

Interestingly, an upregulation of RPTP-beta is also seen in the hippocampus after seizure induced by pilocarpine in a model of epilepsy [70], and the same result has also been observed for phosphacan in kainate-induced seizures [98]. In addition, it has been shown that phosphacan is inhibitory for the growth of mossy fibers in vitro [98]. However, the precise role of phosphacan/RPTP-beta in the context of lesion or epilepsy models is still unknown.

A study of the effects on DSD-1-PG expression of soluble mediators known to be implicated in

inflammation or wound reaction has shown that it is strongly upregulated by TGF-B in Oli-Neu, an oligodendrocytic precursor cell line [82].

The adhesion of glioblastoma cells to TN-C is modulated by the secretion of phosphacan [65, 79]. The short receptor form of RPTP-beta is also expressed on glial tumor cells, and it has now been shown that adhesion of these cells on TN-C is through interactions of the FNIII domain on the receptor with the spliced FNIII domains, A1/A2/A4, of TN-C [2].

A unique feature of this adhesion system is that it is regulated by the presence of the short receptor form of RPTP-beta on the cell surface, as well as by the secretion of its proteoglycan form, phosphacan. Given the high expression of TN-C at the edges of glial tumors [101], this may have important implications for the progression of the disease. The extracellular matrix of glial tumors is involved in a variety of cell functions, such as cell attachment, migration and proliferation, which are mediated by complex interactions with cell surface receptors. Hence, the modulation of the interactions between RPTP-beta and TN-C represents an example of how tumor cells can remodel their environment by regulating their binding to the ECM [2].

Functions of DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan.

There have been a number of studies demonstrating that PGs can influence axonal and neurite outgrowth in both a positive and negative manner [7, 21, 32]. While there is agreement that some PGs can inhibit outgrowth, there appear to be several mechanisms by which they exert their inhibitory effect [86, 87]. In most cases, the enzymatic removal of the GAG chains inactivates the molecules, indicating that the main activity resides in these GAG chains [88]. However, there are also examples where the core protein following GAG removal has the same activity as the whole molecule [29] and even some cases where proteolytic digestion of the protein serves to eliminate the inhibitory effects of the GAG chains suggesting that the GAG chains need to be held in a particular conformation [86]. The activity of such inhibitory PGs may be through blocking of other

permissive matrix molecules such as laminin or through effects on adhesion molecule interaction.

Neurite-outgrowth studies with cell culture systems have demonstrated that phosphacan can play both outgrowthpromoting and inhibitory roles. Outgrowth-promotion from embryonic hippocampal neurons was shown to be dependent on a CS GAG chain motif recognised by the monoclonal antibody, 473HD, whilst inhibition of laminin-promoted outgrowth from dorsal root ganglion explants was associated with the core glycoprotein [25].

The anatomical localisation of phosphacan in areas of active neural extension correlates well with its postulated function as a neurite outgrowth permissive molecule. Indeed, in vitro it is able to promote neurite extension of different types of neurones cultured in the presence of either polylysine or fibronectin [52, 62]. However, a potent and dose dependent inhibition of neurite outgrowth was also observed when neurones were grown on tissue culture plastic directly coated with low concentrations of phosphacan [30, 66]. Similar results were obtained with a 'stripe assay' in which the substrates are arranged in narrow alternating stripes that forced growing axons to choose between them [53]. In all cases phosphacan inhibited the outgrowth of cerebellar, cortical and thalamic axons. These striking differences can, however, be reconciled if the molecular interaction of phosphacan with neurite-promoting molecules is taken into account. Phosphacan binding to cultured neurones can be completely inhibited by antibodies against Ng-CAM and N-CAM, indicating that these adhesion molecules are major receptors for the PG [66]. Moreover, interaction of phosphacan with TN-C (see earlier), TN-R, and the heparin-binding growthassociated molecule (HB-GAM) has also been reported [64]. It is therefore possible that in vivo the inhibitory effects of phosphacan could be masked and equilibrated by its interaction with different adhesion molecules.

Receptors and binding partners for DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan.

DSD-1-PG/phosphacan can bind specifically to cell adhesion molecules, including NCAM , NrCAM,

NgCAM [66], F3/contactin, and TAG-1/axonin-1 [67], as well as many other cell surface and ECM proteins, including tenascin-C, tenascin-R, heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM/pleiotrophin) [64], and tissue plasminogen activator (tPA/plasmin) [98]. Some of these interactions are mediated through sugar residues, for example, sialylated complex-type oligosaccharides in the CA and FNIII domains are necessary for binding to NgCAM/L1, NCAM, and tenascin-C [65, 68].

It seems that the different forms of RPTP-beta can also bind to these ligands, however it is possible that there are variations in the glycosylation of the long receptor relative to phosphacan, and the short receptor lacks the GAG attachment region. Nevertheless, one of the principal functions of phosphacan may be the regulation of RPTP-beta through competitive binding of their common ligands [2]. When the PG is abundantly expressed it seems unlikely that any ligands on adjacent cell surfaces or in the extracellular space could reach the binding sites on RPTP-beta. At present though, there is relatively little known about the role of RPTP-beta activation in cell behaviour nor about the targets of RPTP-beta phosphatase activity and the downstream signal transduction pathways.

Acknowledgements.

The authors would like to acknowledge the support of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the International Spinal Research Trust (ISRT), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Schwerpunktprogramme 'Regeneration', la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), l'Association pour la Recherche sur la Sclerose en Plaques (ARSEP), le Ministere de la Recherche, and the Region Alsace.

^[1] Adams, J.C., Watt, F.M. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117** (1993) 1183-1198.

^[2] Adamsky, K., Schilling, J., Garwood, J., Faissner, A., Peles, E. Glial tumor cell adhesion is mediated by binding of the FNIII domain of receptor protein tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) to tenascin C. *Oncogene* **20** (2001) 609-618.

^[3] Allendoerfer, K.L., Durairaj, A., Matthews, G.A., Patterson, P.H. Morphological domains of Lewis-X/FORSE-1 immunolabeling in

the embryonic neural tube are due to developmental regulation of cell surface carbohydrate expression. *Dev Biol* **211** (1999) 208-219.

[4] Alvarez-Dolado, M., Gonzalez-Sancho, J.M., Navarro-Yubero, C., Garcia-Fernandez, L.F., Munoz, A. Retinoic acid and 1,25dihydroxyvitamin D3 inhibit tenascin-C expression in rat glioma C6 cells. *J Neurosci Res* **58** (1999) 293-300.

[5] Angevine, J. The nervous tissue. In W. Bloom and D. Fawcett (Eds.), *The nervous tissue*, WB Saunders, Philadelphia, 1975, pp. 333-385.

[6] Bartsch, U., Faissner, A., Trotter, J., Dorries, U., Bartsch, S., Mohajeri, H., Schachner, M. Tenascin demarcates the boundary between the myelinated and nonmyelinated part of retinal ganglion cell axons in the developing and adult mouse. *J Neurosci* **14** (1994) 4756-4768.

[7] Bovolenta, P., Fernaud-Espinosa, I. Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol* **61** (2000) 113-132.

[8] Burkhardt-Holm, P., Kafitz, K.W., Guttinger, H.R., Schachner, M. Testosterone elevates expression of tenascin-R and oligomannosidic carbohydrates in developing male zebra finches. J Neurosci Res 46 (1996) 385-392.

[9] Canoll, P.D., Barnea, G., Levy, J.B., Sap, J., Ehrlich, M., Silvennoinen, O., Schlessinger, J., Musacchio, J.M. The expression of a novel receptor-type tyrosine phosphatase suggests a role in morphogenesis and plasticity of the nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* **75** (1993) 293-298.

[10] Canoll, P.D., Petanceska, S., Schlessinger, J., Musacchio, J.M. Three forms of RPTP-beta are differentially expressed during gliogenesis in the developing rat brain and during glial cell differentiation in culture. *J Neurosci Res* **44** (1996) 199-215.

[11] Clark, R.E.*The molecular and cellular biology of wound repair*. Plenum, New York, 1996, 611.

[12] Clement, A.M., Nadanaka, S., Masayama, K., Mandl, C., Sugahara, K., Faissner, A. The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. *J Biol Chem* **273** (1998) 28444-28453.

[13] Copertino, D.W., Edelman, G.M., Jones, F.S. Multiple promoter elements differentially regulate the expression of the mouse tenascin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (1997) 1846-1851.

[14] Deller, T., Haas, C.A., Naumann, T., Joester, A., Faissner, A., Frotscher, M. Up-regulation of astrocyte-derived tenascin-C correlates with neurite outgrowth in the rat dentate gyrus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Neuroscience* **81** (1997) 829-846.

[15] Dorries, U., Taylor, J., Xiao, Z., Lochter, A., Montag, D., Schachner, M. Distinct effects of recombinant tenascin-C domains on neuronal cell adhesion, growth cone guidance, and neuronal polarity. *J Neurosci Res* **43** (1996) 420-438.

[16] Engel, M., Maurel, P., Margolis, R.U., Margolis, R.K. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol* **366** (1996) 34-43.

[17] Faissner, A. The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res* **290** (1997) 331-341.

[18] Faissner, A., Clement, A., Lochter, A., Streit, A., Mandl, C., Schachner, M. Isolation of a neural chondroitin sulfate proteoglycan with neurite outgrowth promoting properties. *J Cell Biol* **126** (1994) 783-799.

[19] Faissner, A., Kruse, J. J1/tenascin is a repulsive substrate for central nervous system neurons. *Neuron* **5** (1990) 627-637.

[20] Faissner, A., Steindler, D. Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. *Glia* 13 (1995) 233-254.

[21] Fawcett, J.W., Asher, R.A. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* **49** (1999) 377-391.

[22] Forsberg, E., Hirsch, E., Frohlich, L., Meyer, M., Ekblom, P., Aszodi, A., Werner, S., Fassler, R. Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (1996) 6594-6599.

[23] Frost, E., Kiernan, B.W., Faissner, A., ffrench-Constant, C. Regulation of oligodendrocyte precursor migration by extracellular matrix: evidence for substrate-specific inhibition of migration by tenascin-C. *Dev Neurosci* **18** (1996) 266-273.

[24] Garwood, J., Heck, N., Rigato, F., Faissner, A. The extracellular matrix in neural development, plasticity and regeneration. In W. Walz (Ed.) *The extracellular matrix in neural development, plasticity and regeneration*, Humana Press, New Jersey, 2001, pp109-158.

[25] Garwood, J., Schnadelbach, O., Clement, A., Schutte, K., Bach, A., Faissner, A. DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. *J Neurosci* **19** (1999) 3888-3899.

[26] Gherzi, R., Briata, P., Boncinelli, E., Ponassi, M., Querze, G., Viti, F., Corte, G., Zardi, L. The human homeodomain protein OTX2 binds to the human tenascin-C promoter and trans-represses its activity in transfected cells. *DNA Cell Biol* **16** (1997) 559-567.

[27] Gotz, B., Scholze, A., Clement, A., Joester, A., Schutte, K., Wigger, F., Frank, R., Spiess, E., Ekblom, P., Faissner, A. Tenascin-C contains distinct adhesive, anti-adhesive, and neurite outgrowth promoting sites for neurons. *J Cell Biol* **132** (1996) 681-699.

[28] Gotz, M., Bolz, J., Joester, A., Faissner, A. Tenascin-C synthesis and influence on axonal growth during rat cortical development. *Eur J Neurosci* **9** (1997) 496-506.

[29] Grumet, M., Flaccus, A., Margolis, R.U. Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* **120** (1993) 815-824.

[30] Grumet, M., Friedlander, D.R., Sakurai, T. Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect Dev Neurobiol* **3** (1996) 319-330.

[31] Gumbiner, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84** (1996) 345-357.

[32] Hartmann, U., Maurer, P. Proteoglycans in the nervous system - the quest for functional roles in vivo. *Matrix Biol* **20** (2001) 23-35.

[33] Heyman, I., Faissner, A., Lumsden, A. Cell and matrix specialisations of rhombomere boundaries. *Dev Dyn* **204** (1995) 301-315.

[34] Husmann, K., Faissner, A., Schachner, M. Tenascin promotes cerebellar granule cell migration and neurite outgrowth by different domains in the fibronectin type III repeats. *J Cell Biol* **116** (1992) 1475-1486.

[35] Hutter, H., Vogel, B.E., Plenefisch, J.D., Norris, C.R., Proenca, R.B., Spieth, J., Guo, C., Mastwal, S., Zhu, X., Scheel, J., Hedgecock, E.M. Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* **287** (2000) 989-994.

[36] Joester, A., Faissner, A. Evidence for combinatorial variability of tenascin-C isoforms and developmental regulation in the mouse central nervous system. *J Biol Chem* **274** (1999) 17144-17151.

[37] Joester, A., Faissner, A. The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol* **20** (2001) 13-22.

[38] Jones, F.S., Jones, P.L. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* **218** (2000) 235-259.

[39] Jones, P.L., Jones, F.S. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol* **19** (2000) 581-596.

[40] Jones, P.L., Jones, F.S., Zhou, B., Rabinovitch, M. Induction of vascular smooth muscle cell tenascin-C gene expression by denatured type I collagen is dependent upon a beta3 integrin-mediated mitogenactivated protein kinase pathway and a 122-base pair promoter element. *J Cell Sci* **112** (1999) 435-445.

[41] Jyo, Y., Sasaki, T., Nomura, S., Tamai, H., Kawai, S., Osawa, G., Nakao, N., Kusakabe, M. Expression of tenascin in mesangial injury in experimental glomerulonephritis. *Exp Nephrol* **5** (1997) 423-428.

[42] Kiernan, B.W., Gotz, B., Faissner, A., ffrench-Constant, C. Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms. *Mol Cell Neurosci* **7** (1996) 322-335.

[43] Kjellen, L., Lindahl, U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* **60** (1991) 443-475.

[44] Krueger, N.X., Saito, H. A human transmembrane proteintyrosine-phosphatase, PTP zeta, is expressed in brain and has an Nterminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (1992) 7417-7421.

[45] Lander, A.D. Proteoglycans: master regulators of molecular encounter? *Matrix Biol* **17** (1998) 465-472.

[46] Lander, A.D., Selleck, S.B. The elusive functions of proteoglycans: in vivo veritas. *J Cell Biol* **148** (2000) 227-232.

[47] Langenfeld-Oster, B., Faissner, A., Irintchev, A., Wernig, A. Polyclonal antibodies against NCAM and tenascin delay endplate reinnervation. *J Neurocytol* **23** (1994) 591-604.

[48] Laywell, E.D., Steindler, D.A. Boundaries and wounds, glia and glycoconjugates. Cellular and molecular analyses of developmental partitions and adult brain lesions. *Ann N Y Acad Sci* **633** (1991) 122-141.

[49] Lochter, A., Taylor, J., Fuss, B., Schachner, M. The extracellular matrix molecule janusin regulates neuronal morphology in a substrate- and culture time-dependent manner. *Eur J Neurosci* **6** (1994) 597-606.

[50] Lochter, A., Vaughan, L., Kaplony, A., Prochiantz, A., Schachner, M., Faissner, A. J1/tenascin in substrate-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. *J Cell Biol* **113** (1991) 1159-1171.

[51] Lukashev, M.E., Werb, Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* **8** (1998) 437-441.

[52] Maeda, N., Nishiwaki, T., Shintani, T., Hamanaka, H., Noda, M. 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin- binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Biol Chem* **271** (1996) 21446-21452.

[53] Margolis, R.K., Rauch, U., Maurel, P., Margolis, R.U. Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect Dev Neurobiol* **3** (1996) 273-290.

[54] Margolis, R.U., Margolis, R.K. Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. *Cell Tissue Res* **290** (1997) 343-348.

[55] Martini, R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* **23** (1994) 1-28.

[56] Maurel, P., Meyer-Puttlitz, B., Flad, M., Margolis, R.U., Margolis, R.K. Nucleotide sequence and molecular variants of rat receptor-type protein tyrosine phosphatase-zeta/beta. *DNA Seq* **5** (1995) 323-328.

[57] McGraw, J., Hiebert, G.W., Steeves, J.D. Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J Neurosci Res* **63** (2001) 109-115.

[58] McKeon, R.J., Jurynec, M.J., Buck, C.R. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci* **19** (1999) 10778-10788.

[59] McKeon, R.J., Schreiber, R.C., Rudge, J.S., Silver, J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* **11** (1991) 3398-3411.

[60] Mege, R.M., Nicolet, M., Pincon-Raymond, M., Murawsky, M., Rieger, F. Cytotactin is involved in synaptogenesis during regeneration of the frog neuromuscular system. *Dev Biol* **149** (1992) 381-394.

[61] Meiners, S., Powell, E.M., Geller, H.M. A distinct subset of tenascin/CS-6-PG-rich astrocytes restricts neuronal growth in vitro. *J Neurosci* **15** (1995) 8096-8108.

[62] Meyer-Puttlitz, B., Junker, E., Margolis, R.U., Margolis, R.K. Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol* **366** (1996) 44-54.

[63] Meyer-Puttlitz, B., Milev, P., Junker, E., Zimmer, I., Margolis, R.U., Margolis, R.K. Chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of nervous tissue: developmental changes of neurocan and phosphacan. *J Neurochem* 65 (1995) 2327-2337.

[64] Milev, P., Chiba, A., Haring, M., Rauvala, H., Schachner, M., Ranscht, B., Margolis, R.K., Margolis, R.U. High affinity binding and overlapping localization of neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta with tenascin-R, amphoterin, and the heparin-binding growth-associated molecule. *J Biol Chem* **273** (1998) 6998-7005.

[65] Milev, P., Fischer, D., Haring, M., Schulthess, T., Margolis, R.K., Chiquet-Ehrismann, R., Margolis, R.U. The fibrinogen-like globe of tenascin-C mediates its interactions with neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta. *J Biol Chem* **272** (1997) 15501-15509.

[66] Milev, P., Friedlander, D.R., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Flad, M., Margolis, R.K., Grumet, M., Margolis, R.U. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* **127** (1994) 1703-1715.

[67] Milev, P., Maurel, P., Haring, M., Margolis, R.K., Margolis, R.U. TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta, and N-CAM. *J Biol Chem* **271** (1996) 15716-15723.

[68] Milev, P., Meyer-Puttlitz, B., Margolis, R.K., Margolis, R.U. Complex-type asparagine-linked oligosaccharides on phosphacan and

protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta mediate their binding to neural cell adhesion molecules and tenascin. *J Biol Chem* **270** (1995) 24650-24653.

[69] Mitrovic, N., Dorries, U., Schachner, M. Expression of the extracellular matrix glycoprotein tenascin in the somatosensory cortex of the mouse during postnatal development: an immunocytochemical and in situ hybridization analysis. *J Neurocytol* **23** (1994) 364-378.

[70] Naffah-Mazzacoratti, M.G., Arganaraz, G.A., Porcionatto, M.A., Scorza, F.A., Amado, D., Silva, R., Bellissimo, M.I., Nader, H.B., Cavalheiro, E.A. Selective alterations of glycosaminoglycans synthesis and proteoglycan expression in rat cortex and hippocampus in pilocarpine-induced epilepsy. *Brain Res Bull* **50** (1999) 229-239.

[71] Nicholson, C. Extracellular space as the pathway for neuronglial cell interaction. In H. K. B. Ransom (Ed.) *Extracellular space as the pathway for neuron-glial cell interaction*, Oxford University Press, New York, 1995, .

[72] Nicholson, C., Sykova, E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* **21** (1998) 207-215.

[73] Niquet, J., Jorquera, I., Faissner, A., Ben-Ari, Y., Represa, A. Gliosis and axonal sprouting in the hippocampus of epileptic rats are associated with an increase of tenascin-C immunoreactivity. *J Neurocytol* **24** (1995) 611-624.

[74] Peles, E., Nativ, M., Lustig, M., Grumet, M., Schilling, J., Martinez, R., Plowman, G.D., Schlessinger, J. Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *Embo J* **16** (1997) 978-988.

[75] Pindzola, R.R., Doller, C., Silver, J. Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions. *Dev Biol* **156** (1993) 34-48.

[76] Rauch, U., Clement, A., Retzler, C., Frohlich, L., Fassler, R., Gohring, W., Faissner, A. Mapping of a defined neurocan binding site to distinct domains of tenascin-C. *J Biol Chem* **272** (1997) 26905-26912.

[77] Rudd, P.M., Wormald, M.R., Stanfield, R.L., Huang, M., Mattsson, N., Speir, J.A., DiGennaro, J.A., Fetrow, J.S., Dwek, R.A., Wilson, I.A. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol* **293** (1999) 351-366.

[78] Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Sakakura, T., Aizawa, S. Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 6 (1992) 1821-1831.

[79] Sakurai, T., Friedlander, D.R., Grumet, M. Expression of polypeptide variants of receptor-type protein tyrosine phosphatase beta: the secreted form, phosphacan, increases dramatically during embryonic development and modulates glial cell behavior in vitro. *J Neurosci Res* **43** (1996) 694-706.

[80] Schachner, M., Taylor, J., Bartsch, U., Pesheva, P. The perplexing multifunctionality of janusin, a tenascin-related molecule. *Perspect Dev Neurobiol* **2** (1994) 33-41.

[81] Scheffler, B., Faissner, A., Beck, H., Behle, K., Wolf, H.K., Wiestler, O.D., Blumcke, I. Hippocampal loss of tenascin boundaries in Ammon's horn sclerosis. *Glia* **19** (1997) 35-46.

[82] Schnadelbach, O., Mandl, C., Faissner, A. Expression of DSD-1-PG in primary neural and glial-derived cell line cultures, upregulation by TGF-beta, and implications for cell-substrate interactions of the glial cell line Oli-neu. *Glia* **23** (1998) 99-119.

[83] Schumacher, S., Volkmer, H., Buck, F., Otto, A., Tarnok, A., Roth, S., Rathjen, F.G. Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein (CALEB), a neural member of the EGF family of differentiation factors, is implicated in neurite formation. *J Cell Biol* **136** (1997) 895-906.

[84] Selleck, S.B. Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet* **16** (2000) 206-212.

[85] Shirasaki, F., Makhluf, H.A., LeRoy, C., Watson, D.K., Trojanowska, M. Ets transcription factors cooperate with Sp1 to activate the human tenascin-C promoter. *Oncogene* **18** (1999) 7755-7764.

[86] Smith-Thomas, L.C., Fok-Seang, J., Stevens, J., Du, J.S., Muir, E., Faissner, A., Geller, H.M., Rogers, J.H., Fawcett, J.W. An inhibitor of neurite outgrowth produced by astrocytes. *J Cell Sci* **107** (1994) 1687-1695.

[87] Smith-Thomas, L.C., Stevens, J., Fok-Seang, J., Faissner, A., Rogers, J.H., Fawcett, J.W. Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J Cell Sci* **108** (1995) 1307-1315.

[88] Snow, D.M., Lemmon, V., Carrino, D.A., Caplan, A.I., Silver, J. Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* **109** (1990) 111-130.

[89] Snyder, S.E., Li, J., Schauwecker, P.E., McNeill, T.H., Salton, S.R. Comparison of RPTP zeta/beta, phosphacan, and trkB
mRNA expression in the developing and adult rat nervous system and induction of RPTP zeta/beta and phosphacan mRNA following brain injury. *Brain Res Mol Brain Res* **40** (1996) 79-96.

[90] Steindler, D.A., O'Brien, T.F., Laywell, E., Harrington, K., Faissner, A., Schachner, M. Boundaries during normal and abnormal brain development: in vivo and in vitro studies of glia and glycoconjugates. *Exp Neurol* **109** (1990) 35-56.

[91] Steindler, D.A., Settles, D., Erickson, H.P., Laywell, E.D., Yoshiki, A., Faissner, A., Kusakabe, M. Tenascin knockout mice: barrels, boundary molecules, and glial scars. *J Neurosci* 15 (1995) 1971-1983.

[92] Stoker, A., Dutta, R. Protein tyrosine phosphatases and neural development. *Bioessays* **20** (1998) 463-472.

[93] Streuli, C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **11** (1999) 634-640.

[94] Taylor, J., Pesheva, P., Schachner, M. Influence of janusin and tenascin on growth cone behavior in vitro. *J Neurosci Res* **35** (1993) 347-362.

[95] Theodosis, D.T., Pierre, K., Cadoret, M.A., Allard, M., Faissner, A., Poulain, D.A. Expression of high levels of the extracellular matrix glycoprotein, tenascin-C, in the normal adult hypothalamoneurohypophysial system. *J Comp Neurol* **379** (1997) 386-398.

[96] Varnum-Finney, B., Venstrom, K., Muller, U., Kypta, R., Backus, C., Chiquet, M., Reichardt, L.F. The integrin receptor alpha 8 beta 1 mediates interactions of embryonic chick motor and sensory neurons with tenascin-C. *Neuron* **14** (1995) 1213-1222.

[97] Weber, P., Bartsch, U., Rasband, M.N., Czaniera, R., Lang, Y., Bluethmann, H., Margolis, R.U., Levinson, S.R., Shrager, P., Montag, D., Schachner, M. Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci* **19** (1999) 4245-4262.

[98] Wu, Y.P., Siao, C.J., Lu, W., Sung, T.C., Frohman, M.A., Milev, P., Bugge, T.H., Degen, J.L., Levine, J.M., Margolis, R.U., Tsirka, S.E. The tissue plasminogen activator (tPA)/Plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate [In Process Citation]. *J Cell Biol* **148** (2000) 1295-1304.

[99] Xiao, Z.C., Taylor, J., Montag, D., Rougon, G., Schachner, M. Distinct effects of recombinant tenascin-R domains in neuronal cell functions and identification of the domain interacting with the neuronal recognition molecule F3/11. *Eur J Neurosci* **8** (1996) 766-782.

[100] Zacharias, U., Norenberg, U., Rathjen, F.G. Functional interactions of the immunoglobulin superfamily member F11 are differentially regulated by the extracellular matrix proteins tenascin-R and tenascin-C. *J Biol Chem* **274** (1999) 24357-24365.

[101] Zagzag, D., Friedlander, D.R., Dosik, J., Chikramane, S., Chan, W., Greco, M.A., Allen, J.C., Dorovini-Zis, K., Grumet, M. Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. *Cancer Res* **56** (1996) 182-189.

[102] Zhang, Y., Campbell, G., Anderson, P.N., Lieberman, A.R., Martini, R., Schachner, M. The extracellular matrix molecule, tenascin is associated with adult rat CNS axons regenerating into peripheral nerve grafts. *Gene Ther* **1** (1994) S67.

Figure legends.

Figure 1:

The structure of Tenascin-C.

The modular structure of mouse TN-C is shown, consisting of 14.5 EGF repeats and 8 FN III domains in the basic protein. Alternative splicing between FN III 5 and 6 can result in the addition of upto another six FN III domains. In human TN-C, there are upto 9 alternatively spliced FN III domains. The representation of the TN-C hexamer or hexabrachion is based on rotary shadowing images of the purified protein.

Figure 2:

Structure-function assignments of TN-C domains based on in vitro assays of neural cells. The combined application of monoclonal antibodies, perturbation studies, and the use of recombinant protein constructs resulted in the localisation of different functions to distinct parts of the molecule.

Figure 3:

The structure of DSD-1-PG/Phosphacan and the isoforms of RPTP-beta. The Spacer (S) region is present in all three forms whereas the Intervening Sequence (IS) is spliced out of the short RPTP-beta. The black box represents the transmembrane domain. The absence of GAG chains on the short receptor indicates that the GAG attachment sites are present in the Spacer region. There are upto 16 N-glycosylation and 30 predicted O-glycosylation sites in DSD-1-PG/Phosphacan and the long RPTP-beta.

Figure 4:

Glycosylation can significantly increase the molecular volume of the core protein of DSD-1-PG/Phosphacan. The presence of multiple CS and KS GAG chains in the S region and of other classes of N- and O-linked glycans throughout the molecule result in a very large hydrodynamic species. Such sugar modifications represent additional sites of interaction between DSD-1-PG/Phosphacan and other molecules, and are likely to modulate interactions with sites on the underlying core protein. Such glycosylation also serves to protect the proteoglycan from proteolytic degradation and may serve as a means of stocking growth factors and cytokines in the ECM.





Constitutive FN III domains







Garwood et al. Figure 4.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Présentation de poster

Heck N, Garwood J, Calco V, Schutte K, Faissner A. "Astrocytic expression of collagen-like proteins" Congress of the Federation of European Neurosciences Societies, Paris 2002

Heck N, Garwood J, Calco V, Schutte K, Faissner A. « Etude de l'expression de protéines de type collagène par les cellules gliales » (*"Study of the expression of collagen proteins by astrocytes"*) Cinquième colloque de la Société Francaise des Neurosciences, Toulouse 2001

Heck N, Dobbertin A, Garwood J, Faissner A "Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for neurite growth : role of extracellular matrix and membrane related proteins" Neurex meeting, Basel 1999

Communication orale

« The absence of collagen fibers is a unique property of the brain extracellular matrix which depends on crosstalk between astrocytes and meningeal cells and implies the EGF pathway" Neurex meeting, Basel April 2003

METHODES

METHODES

1. Immunohistochimie

1.1 Préparation des tissus et obtention de coupes

1.1.1. Préparation du tissu

Les rats, au 1^{er} ou 7ème jour postnatal, ont été sacrifiés par décapitation. La peau recouvrant la tête a été enlevée et le museau coupé, afin d'obtenir une meilleure pénétration du fixateur dans les tissus. La tête ainsi préparée a été plongée dans un bain de paraformaldéhyde 4% à 4°C pendant 12 heures.

Pour la préparation de cerveaux de rats adultes, l'animal est anesthésié avec 1 ml de pentobarbital. La cage thoracique est ouverte et une canule est implantée dans le cœur et les ventricules séctionnés. 100 ml de paraformaldéhyde 4% sont injectés dans la système sanguin avec une pompe alimentant la canule. Le cerveau de l'animal fixée est récupéré.

Il a été observé que la méthode de fixation employée por les animaux postnataux était plus simple et donnait des résultats équivalents en comparaison à une méthode de fixation par perfusion de l'animal anesthésié.

Avant de réaliser l'immunohistochimie, un lavage des coupes au TBS (Tris Buffer Saline) peut être réalisé. Le Tris bloque les sites aldéhydiques libres laissés par le fixateur et empêche ainsi la fixation sur la coupe des anticorps. Cependant, un étape de blocage avec de la BSA est suffisante.

Préparation de la solution de paraformaldéhyde 4% :

Une solution de formaldéhyde 8% est préparée (8g pour 100ml d'eau). Cette solution est chauffée à 80°C. Du NaOH 10M est ajouté jusqu'à éclaircissement total. La solution est conservée à -20°C.

Pour utilisation, un volume égal de tampon phosphate 0,2M est ajouté et la solution chauffée à 65°C puis refroidie dans la glace. La solution peut être conservée 1 à 2 semaines à 4°C.

1.1.2. Préparation de coupes cryostats

Après fixation, le cerveau a été isolé et plongé dans une solution de sucrose 20% à 4°C pendant 6 à 8 heures.

Après deux lavages au PBS, le cerveau a subi une congélation rapide dans l'isopentane à -45°C pendant 60 secondes. Le cerveau congelé a été conservé à -80°C. Des coupes de 15µm ont été obtenues avec un cryostat Leica.

Le temps d'incubation dans le sucrose est critique. Le sucrose permet un maintien du tissu idéal pour l'obtention de coupes, mais un temps d'incubation trop long fait qu'un marquage non spécifique est observé avec les anticorps et que la morphologie cellulaire est affectée.

1.1.3. Préparation de coupes vibratomes

Après fixation, le cerveau a été isolé et lavé au PBS. Des coupes vibratomes ont été obtenues avec un vibratome Leica.

Pour l'étude de la localisation de la Tenascine-C dans l'hippocampe postnatal (Manuscrit 6), des coupes vibratomes ont été réalisées car la congélation du tissu ne permettait pas de révéler un signal avec l'anticorps monoclonal 578.

1.2. Immunohistochimie

Le protocole utilisé est le suivant :

- 1. Blocage des sites non spécifiques avec un tampon PBS contenant 3% de serum albumine bovine (PBS, BSA 3%) pendant 2 heures à température ambiante
- Incubation de l'anticorps primaire dans PBS BSA 3% pendant 12 heures à température ambiante.
- 3. Lavage au PBS (3 cycles de 15 minutes)

- 4. Incubation de l'anticorps secondaire dans PBS BSA 3% pendant 2 heures à temprérature ambiante.
- 5. Lavages au PBS (3 cycles de 5 minutes)
- 6. Montage sous lamelle de verre dans un mélange 60% glycérol 40% PBS

Dans certains cas, une méthode d'amplification du signal a été réalisée comme suit :

4. Incubation d'un anticorps secondaire biotinylé dans PBS BSA 3% pendant 1 heure à température ambiante

5. Lavages au PBS (5 cycles de 15 minutes)

6. Incubation de streptavidine couplé au fluorochrome cy3 dans PBS pendant 15 minutes à température ambiente

- 7. Lavages au PBS (3 cycles de 5 minutes)
- 8. Montage sous lamelle de verre dans un mélange 60% glycérol 40% PBS

Cette méthode a été utilisée sur coupes vibratomes pour obtenir un signal avec les anticorps monoclonaux 578, 473HD, 412 et 1D1.

2. Immunohistochimie avec l'anticorps F1C3

Différentes techniques de préparation du tissu et de fixation ont été utilisées afin d'obtenir un signal avec l'anticorps F1C3.

La technique d'immunohistochimie sur coupe crysostat (cf. 1.1.2.) a été utilisée. Elle a permis d'obtenir un signal dans les méninges uniquement. Nous avons testé différentes méthodes, sans obtenir de meilleurs résultats. Nous décrivons ces méthodes ci-dessous. Ces méthodes ont été utilisées dans des expériences faites sur des rats au 7ème jour postnatal.

La reconnaissance d'un antigène par l'anticorps peut être affectée par le mode de préparation du tissu. Différentes méthodes de préparations ont donc été testées : coupes cryostats, coupes vibratome, coupes paraffine.

2.1. Préparation de coupes paraffine

1. Préparation du tissu (cf. 1.1.1.).

2. Déshydratation à température ambiante par bains successifs :

Ethanol 50% (3 cycles de 15 minutes), ethanol 70% (3cycles de 15 minutes), ethanol 95% (3 cycles de 15 minutes), ethanol 100% (3 cycles de 1 heure), butanol-1 (2 cycles de 1 heure), butanol-1 (1 cycle de 12 heures).

3. Imprégnation dans le paraffine par bains successifs :

Butanol-1 50%, paraffine 50% (48 heures à 60°C), paraffine pure (24 heures à 60°C).

4. Durcissement à froid de la paraffine à température ambiante.

5. Réalisation de coupes de 8 µm d'épaisseur.

6. Déparaffinage par bains successifs :

Xylène (2 cycles de 4 minutes), butanol-1 (2 cycles de 30 secondes), ethanol 95% (5 minutes), ethanol 70% (5 minutes), ethanol 50% (1 minute), eau (2 cycles de 1 minute), PBS.

Des expériences d'immunohistochimies (cf. 1.2.) avec l'anticorps F1C3 ont été réalisées avec ces trois types de coupes, avec et sans technique d'amplification.

2.2. Méthodes de préparation du tissu

La fixation au paraformaldéhyde peut empêcher l'interaction anticorps – antigène, puisque des liaisons covalentes (ponts aldéhydiques) sont formés entre les protéines de tissu. Différentes techniques de fixations ont donc été testées :

2.2.1.Immunohistochimie sur tissu non fixé

- 1. Sacrifice du rat par décapitation
- 2. Prélévement du cerveau
- 3. Inclusion dans l'agarose 4%
- 4. Préparation de coupes vibratomes (cf. 1.1.3.)
- 5. Immunohistochimie (cf. 1.2.)

2.2.2. Immunohistochimie sur tissu postfixé

- 1. Sacrifice du rat par décapitation
- 2. Prélévement du cerveau
- 3. Congélation dans l'isopentane à -45°C pendant 60 secondes
- 4. Réalisation de coupes cryostat
- 5. Postfixation au paraformaldéhyde 4% à 4°C pendant 5 minutes
- 6. Immunohistochimie (cf. 1.2.)
- 2.2.3. Immunohistochimie sur tissu fixé par les sels de zinc
 - 1. Anesthésie dur rat au pentobarbital
 - Perfusion avec une solution de sels de zinc : acétate de zinc 0,3%, dichlorure de zinc 0,3%, acétate de calcium 0,05%, dans Tris-HCl 0,1M.
 - 3. Prélévement du cerveau
 - 4. Incubation dans le fixateur pendant 12 heures à température ambiante.
 - 5. Préparation de coupes paraffine (cf. 2.1.)
 - 6. Immunohistochimie (cf. 1.2.)

2.2.4. Immunohistochimie sur tissu postfixé à l'acétone

Cette méthode a été utilisée avec succés dans des expériences d'immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre le collagène de type I (Sigma, clone COL-1, C2456)

- 1. Sacrifice du rat par décapitation
- 2. Prélévement du cerveau
- 3. Congélation dans l'isopentane à -45°C pendant 60 secondes
- 4. Réalisation de coupes cryostat (cf. 1.1.2.)
- 5. Fixation dans l'acétone à -80°C pendant 5 minutes
- 6. Immunohistochimie (cf. 1.2.)

2.3. Restauration de l'antigène

Des techniques de restauration d'antigène ont été testées sur coupes paraffine :

2.3.1. Technique classique de restauration de l'antigène

1. Préparation de coupes paraffine (cf. 2.1.)

2. Placer les lames avec les coupes dans un bécher contenant un tampon citrate 10mM à pH6.

3. Chauffer au micro-ondes à 750W pendant 5 min., trois fois de suite. L'ébullition est normale. Un bécher rempli d'eau est placé à côté pour saturer le four en vapeur d'eau et ainsi éviter l'évaporation du tampon citrate.

4. Laisser les lames refroidir pendant 20 min. hors du four.

- 5. Rincer les lames avec du PBS.
- 6. Immunohistochimie (cf. 1.2.)

2.3.2. Technique de digestion enzymatique

- 1. Préparation de coupes paraffine (cf. 2.1.)
- 2. Digestion à la collagénase (3%), incubation à 37°C pendant 2, 5 et 10 minutes
- 3. Immunohistochimie (cf. 1.2.)
- 1. Préparation de coupes paraffine (cf. 2.1.)
- 2. Digestion à la trypsine (0,25%), incubation à 37°C pendant 2, 5 et 10 minutes
- 3. Immunohistochimie (cf. 1.2.)

2.3.3. Technique de dénaturation sur coupes

L'anticorps F1C3 reconnaît les collagènes dans la technique de western blot, donc reconnaît les collagènes dénaturés par le sodium dodécyl sulfate. Nous avons testé une technique de dénaturation sur coupe.

1. Préparation de coupes paraffine (cf. 2.1.)

- Incubation dans un tampon Tris 50mM pH8, NaCl 50mM, SDS 1% pendant 1, 2 et 5 minute à température ambiante et à 90°C.
- 3. Immunohistochimie (cf. 1.2.)

On observe une dégradation importante du tissu pour l'incubation à température ambiante, et totale pour l'incubation à 90°C.

Aucune de ces techniques n'a permis d'améliorer les résultats obtenus sur coupes cryostats de tissu fixé au paraformaldéhyde. Pour cette raison, nous avons choisi d'utiliser la technique d'hybridation *in situ* afin d'étudier la possibilité d'une expression astrocytaire de collagène.

3. Hybridation in situ

Les hybridation *in situ* ont été réalisées sur des coupes cryostats de tissu fixé au paraformaldéhyde 4% (cf. 1.1.1. et 1.1.2.).

Des sondes ont été synthétisées avec des nucléotides couplés à la digoxigenin (DIG). Les sondes hybridées sur le tissu ont ainsi pu être révélées avec un anticorps dirigé contre la DIG. L'anticorps utilisé est couplé à la phosphatase alcaline et la révélation est faite par incubation d'un substrat de l'enzyme (NBT et BCIP) qui donne un précipité violet.

3.1. Protocole

Le protocole utilisé est le suivant

- Déshydratation des coupes
 Ethanol 50% 1 minute, ethanol 75% 1 minute, ethanol 95% 1 minute, ethanol 100% 1 minute
- 2. Incubation dans le tetraethylammonium (TEA) à température ambiante pendant 5 minutes

- Ajout de d'acétate anhydre (500µL pour 200 mL de TEA), incubation sous agitation pendant 10 minutes à température ambiante.
- 4. Lavage dans le SSC 2x pendant 5 minutes
- Incubation dans le tampon d'hybridation avec les sondes pendant 12 à 18 heures, à 55°C
- 6. Lavage au SSC 2x pendant 5 minutes
- 7. Lavage dans le SSC 0,1x pendant 1 heure à 55°C
- 8. Lavage dans le SSC 2x pendant 5 minutes
- 9. Digestion à la RNAaseA dans le SSC 2x, pendant 30 minutes à 37°C
- 10. Lavage dans le SSC 2x pendant 5 minutes
- 11. Incubation dans le tampon B1 pendant 30 minutes
- 12. Incubation dans le tampon B2 pendant 30 minutes
- 13. Incubation avec l'anticorps anti-DIG dans le tampon B2 pendant 2 heures à température ambiante
- 14. Lavage dans le tampon B1 pendant 15 minutes
- 15. Incubation dans le tampon B3 pendant 1 heure
- 16. Incubation avec les substrats NBT et BCIP dans le tampon B3 jusqu'à obtention du signal
- 17. Lavage dans le PBS
- 18. Montage sous lamelle de verre dans un mélange glycérol 60%, PBS 40%

3.2. Paramètres à considérer dans l'élaboration du protocole

Les conditions critiques dans la technique d'hybridation *in situ* sont la température d'hybridation et les conditions de lavages. La stringence augmente avec l'augmentation de la température et la diminution de la concentration en sel. Le premier paramètre est critique lors de l'hybridation et du lavage. Différentes températures ont été testées afin d'obtenir une température optimale. Le deuxième paramètre est critique lors du lavage. Différentes dilutions du tampon SSC ont été testées. Des résultats probants ont aussi été obtenus avec un tampon de lavage SSC 0,2x 50%, tampon d'hybridation 50%. Les conditions optimales pour l'obtention du signal ont été estimées en comparant les résultats obtenus avec les sondes sens et antisens.

La préincubation des coupes dans le tampon d'hybridation sans les sondes (préhybridation) avant l'incubation avec les sondes a été testée, mais n'apporte pas d'amélioration significatives à nos résultats.

3.3. Contrôle de la spécificité des signaux

Quatre points sont à considérer afin de conclure à une spécificité du signal.

La spécificité de l'anticorps a été testée en réalisant l'expérience sans les sondes. Dans ce cas, aucun signal n'est observé, ce qui montre que l'anticorps ne reconnaît pas d'antigène endogène au tissu.

La présence de phosphatase alcaline dans le tissu a été testée en réalisant l'expérience sans les sondes et sans l'anticorps. Dans ce cas, aucun signal n'est observé, ce qui montre que le tissu ne contient pas de phosphatase alcaline.

La digestion à la RNAase A permet d'éliminer les sondes non hybridées qui seraient restées sur les coupes après lavages. Cela permet d'exclure un signal provenant de sondes non hybridées qui seraient restées sur la coupe malgré les lavages.

La spécificité des sondes a été vérifiée dans chaque expérience en comparant le résultat à celui obtenu en parallèle avec une sonde sens. La sonde sens est complémentaire de la sonde antisens qui s'hybride avec l'ARNm d'interêt. Deux paramètres à considérer pour la sonde sens : celle-ci doit avoir une longueur (nombre de nucléotides) identique à la sonde antisens, et elle ne doit pas être complémentaire d'un ARNm présent dans le tissu.

3.4. Utilisation de la sonde PSI

L'utilisation de la sonde PSI s'est révélée être délicate du fait de l'absence d'une sonde sens. En effet, la sonde sens de PSI est complémentaire de l'ARN ribosomal 28S et ne peutdonc pas être utilisée.

Cependant, on doit considérer que les seuls paramètres à considérer pour la sonde contrôle sont la taille de la sonde et le fait que la sonde ne soit pas complémentaire d'un ARNm présent transcrit dans le tissu. Ainsi, nous avons considéré une sonde sens répondant à ces critères comme étant un contrôle valide. Plus précisément, mous avons considéré les sondes sens issues d'autres constructions de sondes qui correspondent à ces deux critères.

De plus, dans des conditions identiques, on observe un signal avec la sonde PSI dans le cortex mais pas dans le cervelet, ce qui est un argument en faveur de la spécificité de la sonde. Ce résultat a été confirmé au niveau de la protéine par des expériences de western blot.

3.5. Tampons utilisés

- Tampon d'hybridation :50% formamide4x SSC10% dextran sulfate1,5mg/ml DTT (à ajouter extemporanément)250µg/ml tARN de levure500µg/ml de ADN de sperme de hareng
- SSC 20x : NA Cl 3M Na₃ Citrate 2 H₂O Ph 7,0

Triethylammonium (TEA) : 3,35ml TEA 1ml HCl 37% qsp 250 ml H₂0

- B1 : Acide maléique 100mM pH 7,5 Na Cl 150mM
- B2 : B1 supplémenté de 2% de sérum albumine bovine

B3 : Tris 100mM pH 9,5 Na Cl 100mM Mg Cl₂ 50mM à préparer extemporanément

B4 : 100ml de B3 supplémenté de 3,5µl de NBT et 4,5µl de BCIP

NBT : Solution stock à -20°C de Nitro Blue Tetrazolium (75mg/ml, Biorad) dans 70% dimethylformamide, 30% eau.

BCIP : Solution stock à -20°C de 5 bromo-4-chloro-3-indoyl phopshate (50mg/ml, Biorad) dans 100% dimethylformamide.

3.6. Préparation des sondes

Le plasmide est linéarisé par digestion enzymatique. Les enzymes sont choisies de telle façon à obtenir une séquence linéaire débutant par le site d'initiation de l'ARN polymérase suivie de la séquence codant la sonde. La digestion est faite avec 1µg de plasmide pour 1U d'enzyme pendant 1 heure à 37°C. Après digestion, le plasmide linéarisé est précipité en ajoutant du NaOAc (1/10éme du volume de tampon de digestion utilisé) et de l'ethanol (2,5 fois le volume du tampon de digestion). Le plasmide linéaire précipité est culotté par centrifugation (14000rpm, 15 minutes), rincé à l'ethanol 70%, séché puis resuspendu dans un tampon.

La transcription *in vitro* en présence de 1U d'ARN polymérase, d'1U d'inhibiteur de RNAase et de 2µl de nucléotides couplés à la digoxygenin (Roche). Le volume est ajusté à 20µl avec de l'eau ultrapure et la transcription effectuée à 37°C pendant au minimum 2 heures.

Les sondes obtenues sont précipitées en ajoutant 3µl de NaOAc 3M, 1µl de glycogen et 60µl d'eau. Après centrifugation à 14000rpm pendant 20 minutes, le culot est rincé à l'ethanol 70% est séché. La taille des sondes et la quantitée obtenue sont estimées par observation après migration sur gel d'agarose.

4. Tests de croissance neuritique

Les tests de croissance neuritiques ont été réalisés selon le protocole suivant :

- 1. Incubation des lamelles de verre à la poly-ornithine à 37°C pendant 1 heure (cf. 5.1.)
- 2. Lavage au PBS
- 3. Lavage à l'eau, séchage
- 4. Incubation avec les protéines purifiées diluées dans du PBS pendant 2 heures à 37°C
- 5. Lavage au DMEM
- 6. Mise en culture des cellules
- 7. Fixation des cellules après 48 heures de culture (paraformaldéhyde 4%, 15 minutes)
- 8. Révélation des neurites

La progression de l'axone se fait par attachement au substrat de culture (cf.). Pour cette raison, les tests de croissance neuritique se font en utilisant les protéines d'interêt comme substrat. Nous avons utilisé un protocole classique de traitement du substrat de culture. Le traitement à la poly-ornithique permet d'obtenir un substrat de culture chargé positivement qui favorise l'attachement des cellules au substrat. De plus, la présence de charges positives favorise sans doute l'adhésion des protéines purifiées. L'attachement des protéines purifiées sur le substrat de culture prétraité à la poly-ornithine a été montrée (ref.). Les protéines utilisées comme substrat de croissance ont été purifiées dans des conditions non dénaturantes, afin de conserver leur conformation native.

La révélation des neurites peut être obtenue par différentes méthodes. Un marquage immunocytochimique peut être réalisé en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines du cytosquelette (beta3 tubuline) ou des protéines membranaires (L1). Une autre méthode consiste à colorer les cellules avec du bleu de toluidine. Ces méthodes donnent des résultats équivalents.

Les mesures ont été réalisées après 24 heures de culture. Seules les cellules ayant un neurite plus long que le diamètre du corps cellulaire ont été prises en compte - le comptage des cellules ayant un neurite plus court correspondrait à une estimation de l'initiation de la croissance neuritique. Dans le cas de cellules ayant plusieurs neurites, le neurite le plus long a été mesuré - c'est ce neurite qui correspond à l'axone. La mesure de la longueur neuritique a été réalisée avec le logiciel *ImageTool*.

Dans toutes les expériences, chaque condition était dupliquée, et au minimum 200 neurites choisies au hasard et réparties sur l'ensemble de la surface de culture ont été mesurés. Chaque expérience a été répétée au minimum trois fois.

L'analyse statistique statistique a été réalisée avec le logiciel *Kyplot*. Dans le cas de la comparaison des échantillons indépendants, une analyse de la variance a été faite. Le test de comparaison multiple utilisé est le test de Tukey. Tous les tests ont été réalisés au seuil alpha=0,05.

5. Culture cellulaire

5.1. Préparation du support de culture

Les cultures sont faites sur support plastique ou verre prétraité à la poly lysine 15 μ M dans du PBS pendant 1 heure à 37°C. Après deux lavages à l'eau le support est séché sous la hotte. Pour les tests de croissance neuritique, le support est prétraité avec la poly ornithine 15 μ M dans de l'acide borique 0,1M pH 8,3 pendant 1 heure à 37°C.

5.2. Culture d'astrocytes

Les hémisphères de rat nouveau-né sont isolés et les méninges retirées. Les hémisphères sont dissociées par passage au travers d'un tamis (taille des pores 48 μ m) et les cellules dissociées mises dans le milieu de culture à raison d'1 hémisphère pour 40 ml de milieu. Le milieu de culture contenant les cellules est mis en culture sur un support plastique ou verre prétraité à la poly lysine. Le milieu de culture est composé de DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal.

Après 5 jours en culture, le milieu est renouvelé puis renouvelé tous les trois jours. On observe la formation d'un tapis d'astrocytes après 12 à 15 jours de culture. La présence de précurseurs d'oligodendrocytes est vérifiée par observation au microscope et , le cas échéant, les précurseurs sont retirées de la culture par agitation manuelle et renouvellement du milieu. Cette méthode est permise de par la faible adhésion de ces cellules sur le substrat.

5.3. Culture de cellules des méninges

Les hémisphères de rat nouveau-né sont isolés et les méninges retirées. Les méninges sont incubés dans du PBS avec 0,25 % de trypsin et 3% de collagénase pendant 10 minutes à 37°C. Après centrifugation pendant 5 minutes à 800 rpm, les cellules sont resuspendues dans le milieu de culture et dissociées avec une pipette pasteur puis mises en culture dans du DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau foetal.

5.4. Coculture astrocytes – cellules des méninges

Pour les cocultures, les hémisphères et les méninges de rat nouveau-né préparés selon les protocoles précédents sont mis en culture ensemble. On observe la formation de monocouches cellulaires séparées.

La coculture réalisée avec le système *millicell* (Transwell) permet de cultiver deux types cellulaires différents sans qu'il y ait contact cellulaire mais dans un milieu de culture commun où les cellules sont en contact avec les facteurs sécrétés par les deux types cellulaires.

Pour ce type de coculture, une culture d'astrocyte est réalisée, et les cellules des méninges sont mises en culture dans une nacelle. La nacelle est mise dans le puit de culture d'astrocytes lorsque les astrocytes et les méninges forment une monocouche. Le système *millicell* utilisé présente un filtre avec des pores de $0,4 \mu m$.

5.5. Culture de neurones corticaux

La souris au 17^{eme} jour de gestation est sacrifiée et les embryons isolés dans du PBS à 4°C. Les hémisphères des embryons sont isolés, les méninges retirées. Les hémisphères sont dissociés par incubation dans du PBS avec 0,25% de trypsin pendant 10 minutes à 37°C suivi d'un passage au travers d'un tamis (taille des pores 48 µm). Après centrifugation pendant 5 minutes à 800 rpm, les cellules sont resuspendues dans le milieu de culture et dissociées avec une pipette pasteur. Les cellules sont mises en culture à une densité de 7000 cellules par cm² dans un milieu composé de MEM (Invitrogen) supplémenté en N2, 0,1% ovalbumine et 0,1mM pyruvate..

5.6. Traitements des cultures

Pour les traitements avec les cytokines, le milieu de culture est changé pour un milieu défini (DMEM, 50μ g/ml insuline, 100μ g/ml transferrine et 500μ g/ml sérum albumine bovine). Après 48 heures, le milieu défini est renouvelé additionné d'une cytokine purifiée (description et concentrations données dans les manuscrits). Après 48 heures, les cellules sont fixées. Pour les traitements à l'acide ascorbique et à la fibronectine, le milieu de culture (DMEM 10% sérum) est supplémenté de 50 µg/ml d'acide ascorbique et/ou avec de la fibronectine purifiée (10μ g/ml). Le traitement est effectué durant tout le temps de culture.

5.7. Immunocytochimie

Pour les immunocytochimie, les cellules sont cultivées sur lamelles de verre. Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes. Après deux lavages au PBS, les cellules sont perméabilisées (5 minutes au methanol à température ambiante pour les astrocytes et les méninges, 2 minutes au triton 0,1x dans le PBS pour les neurones corticaux). Après un lavage au PBS, les sites non spécifiques sont bloqués par incubation au PBS supplémenté de 3% sérum albumine bovine (PBS 3 % BSA) pendant 30 minutes. L'anticorps primaire est incubé pendant 2 à 4 heures à température ambiante dans PBS 3 % BSA. Après 5 lavages au PBS, l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Jackson chemicals) est incubé pendant 1 heure dans PBS 3 % BSA. Après 5 lavages au PBS et un lavage à l'eau, la lamelle est montée sur lame dans du mowiol 488.

Pour observer la matrice extracellulaire, du paraformaldéhyde 4% est ajouté au milieu (à volume égale) pendant 10 minutes, puis du paraformaldéhyde 4% seul est incubé sur les cellules pendant 10 minutes. Les cellules ne sont pas perméabilisées.

6. Techniques de biochimie et biologie moléculaire

6.1. Préparation de lysat cellulaire et de milieu conditionné

Les cerveaux ou les cellules en culture sont récupérées dans un tampon Tris 50mM, acétate de sodium 50mM, urée 8M, EDTA 25mM pH 8 additionée d'inhibiteurs de protéases (Tablette *Complete*, Boehringer Mannheim) et dissociées à la pipette (pointe jaune) puis à la seringue (aiguille 27G). Après centrifugation pendant 15 minutes à 10000 rpm, le surnageant est récupéré. Le surnageant est centrifugé pendant 1 heure à 100000g. Le culot correspond à la fraction membranaire totale et le surnageant aux protéines solubles dans les conditions de tampons utilisées.

Pour la préparation du milieu conditionné, le milieu de culture est renouvelé et laissé en culture pendant 48 heures avant d'être récupéré. Des inhibiteurs de protéases sont ajoutés (EGTA 25mM, tablette *Complete* Boehringer Mannheim).

6.2. Traitement des lysats cellulaires

Pour le traitement à la collagénase, un ajout au lysat ($100\mu g$ de protéines total) de tampon Tris 50mM pH8, Acétate de sodium 50mM pour ajuster le volume à 50 μ l est fait suivi d'un traitement avec 0,1 μg de collagénase pendant 1 heure à 37°C.

Dans ces conditions, la spécificité de la collagénase a été vérifiée en utilisant la tenascine-C comme contrôle.

Pour le traitement à la pepsine, 1µl d'acide trifluoroacétique 9% est ajoutée au lysat (100 µg de protéines total) ajustée à un volume de 50µl avec de l'eau. La digestion est faite en présence de 1 µg de pepsine pendant 1 heure à 37°C. L'acide permet d'ajuster le pH à une valeur de 2, qui correspond à l'optimum d'activité enzymatique de la pepsine. Après digestion, 3µl de Tris 1M pH8,8 sont ajoutés afin de rétablir un pH neutre, nécessaire à une migration sur gel d'électrophorèse.

En parallèle au traitements à la collagénase et à la pepsine, une incubation du lysat dans des conditions identiques (Tampon, volume, pH, durée et température) mais en absence d'enzyme a été systématiquement faite et considérée comme contrôle.

6.3. Western blot

La concentration en protéine des lysats et milieux conditionnés est estimé par un test de Bradford (BioRad). 100µg de protéines sont chargés sur le gel d'électrophorèse dans un tampon Laemmli. Les gels d'électrophorèse 8% sont composés comme suit : Acrylamide 40% 3ml, Tris 1M pH 8,8 5,6ml, eau 6,25ml et SDS 10% 0,15ml. Le gel de stascking est composé de Acrylamide 40% 2,25ml, Tris 1M pH 6,8 2,5ml et SDS 10% 0,2ml. La polymérisation est faite par addition de TEMED (50µl) et APS 10% (200µl). La séparation des protéines sur gel est faite en ajustant un courant électrique de 10 mA durant 12 heures.

Pour le transfert semi-sec, le gel est posé sur une membrane PVDF (Hybond-P Amersham) préincubé dans du methanol puis un tampon composé de Tris 0,025M, methanol 20% pH10,4. Un « sandwich » est réalisé avec dans l'ordre : du papier wathmann préincubé dans un tampon Tris 0,3M, 20% methanol, le filtre PVDF, le gel, du papier wathmann préincubé dans le tampon Tris 0,025M, 20% methanol pH10,4 et du papier wathmann préincubé dans le tampon Tris 0,025M, 20% methanol pH9,4. Le transfert est effectué dans un champ électrique de 250mA pendant 1 heure.

Après transfert, la membrane est incubé pendant 30 minutes dans une solution de blocage composée de PBS 0,05% Tween20, 4% lait ecrémé (PBS-T + Lait). L'anticorps primaire est incubé sur la membrane pendant 2 heures à température ambiante dans du PBS-T + Lait. Après 3 lavages de 10 minutes au PBS-T, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Jackson chemicals) est incubé pendant 1 heure dans du PBS-T + Lait. Après 3 lavages de 10 minutes, le signal est révélé à l'ECL grâce à un kit de détection (Amersham).

6.4. Technique de la PCR

Une extraction des ARN totaux est faite dans 800µl de tampon RNA plus. Après homogénéisation, 80µl de chlorophorme sont ajoutés. La solution est vortexée puis centrigugée pendant 15 min à 14000rpm. La phase aqueuse est récupérée et ajoutée à 400µl d'isopropanol. Après agitation puis centrifugation pendant 15min à 14000rpm, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 200µl d'eau, 600µl d'ethanol et 20µl d'acétate. Après 1 heure d'incubation, la solution est centrifugée pendant 15min à 14000rpm. Le surnageant est éliminé, le culot lavé avec de l'ethanol 75% pui séché. Après resuspension dans l'eau, la quantitée d'ARN obtenue est estimé avec un spectrophotomètre. Les ARN sont stockés à -80°C.

Pour la transcription réverse, 4 μ g d'ARN et 500 ng d'amorces de séquence aléatoire sont ajoutés à 25 μ l d'eau. Après une incubation de 5 minutes à 65°C et retour à température ambiante puis addition de 5 μ l de tampon de transcription (Life Technologies), 1,25 μ l de 0,1M dithiothreitol, 1,25 μ l de 10mM dTPs, 0,5 μ l d'inhibiteur de RNAase et de 1,25 μ l de transcriptase reverse (200 IU/ml, Life Technologies), la réaction est faite à 37°C pendant 50 minutes, puis stoppé par incubation à 95°C pendant 5 minutes. La réaction de PCR est effectuée en utilisant 2 μ l de produit de transcription reverse avec 500 nM d'amorces spécifiques dans 20 μ l de tampon de PCR composé de Tris 60mM pH8,8, (NH4)₂SO4 15mM, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0,5mM et 1IU de polymérase *Taq* (AGS, Heidelberg). La réaction, réalisée dans un appareil de type PE-9600 (Applied Biosystems) est débutée par une dénaturation de 3 minutes à 94°C suivi de 21 à 43 cycles (selon la quantitée de transcrit) définis comme suit : 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C. La réaction est terminée par une étape à 72°C de 7 minutes. Les produits de la réaction sont observés en présence de bromure d'ethidium sous ultra-violets après séparation sur un gel d'agarose 0,5%.

Antigène	Anticorps	Animal	Histologie	Culture	Western
					blot
Tenascine-C	KAF14	lapin	1/400	1/400	1/1000
Tenascine-C	578	rat	1/50, amplifié		
FNIII – D			vibratome		
Phosphacan/	KAF13	lapin	1/400	1/400	1/1000
RPTPβ					
Phosphacan/	S2	lapin	1/400		
RPTPβ					
Phosphacan/	473HD	Rat	1/100	1/200	
RPTPβ (GAGs)		IgM			
L1	324	rat		1/400	
F3		lapin	1/50	1/50	
GFAP		lapin	1/400	1/400	
β3 tubuline		lapin		1/300	
A2B5		souris		1/2	
				(surnageant)	
HNK-1	412	rat	1/50, amplifié		
Laminine		lapin	1/400		
Fibronectine		lapin	1/400	1/400	1/1000
Neurocan	1D1	rat	1/50, amplifié		
Collagène I,III,V	F1C3	souris		1/200	1/1000
Collagène I		souris	1/50,	1/50	
			postfixation	amplifié	
			acétone -80°C		

Annexe : liste des anticorps, amorces et sondes

Espèce	Groupement	Utilisation	Dilution	Origine
reconnue	couplé			
lapin	peroxydase	Western blot	1/10000	Jackson chemicals
Souris	peroxydase	Western blot	1/5000	Jackson chemicals
rat	peroxydase	Western blot	1/5000	Jackson chemicals
lapin	Cy3	immuno	1/400	RD systems
souris	Cy3	immuno	1/400	RD systems
lapin	Alexa 488	immuno	1/400	RD systems
lapin	biotin	immuno	1/400	Vectastain
rat	biotin	immuno	1/400	Vectastain
	Streptavidine -cy3	immuno	1/1000	Jackson chemicals

Tableaux récapitulatifs des anticorps avec les conditions d'utilisation.

Transcrit	Séquences des amorces	Cycles	Temp.
GAPDH	5'-GAGTATGTCGTGGAGTCTAC	21	55°C
	5'-TGAGCTTCCCGTTCAGCTCT	21	55 C
Phosphacan	Sense : 5'-ACT ACC TAA CAT GAG TTA CG	45	55°C
/RPTPβ	Antisense : 5'-AAG AGT CAT CGG CTC CCG TAT	43	55 C
Phosphacan	Sense : 5'-TAT GCT ACC CCA GAA GCA CA	45	55°C
	Antisense : 5'-TCT GCT GGT GGA CCA GAA T	45	55 C
RPTPβ	Sense : 5'-TTT GAG ACA CTG AAA GAG	45	55°C
	Antisense : 5'-TTG TGT TTC TTA GGG TGA	73	55 C
Collagène	Sense : 5' – TGG TGA ACG TGG TGT ACA AGG T	28	55°C
α1(I)	Antisense : 5' – AGC ACC AGG AGA TCC TTT CTC A	20	55 C
Collagène	Sense : 5' – CAG GTA TCA AGG GTG AAA GTG G	34	55°C
α1(III)	Antisense : 5' – AGA CTT TTC ACC TCC AAC TCC A	54	55 C
Collagène	Sense : 5' – AGA AGG TCC GGC TGG TAA TGA T	26	55°C
α2(V)	Antisense : 5' – TGT TTG TGT CAT CTG GAG CTG C	20	55 C

Tableau récapitulatif des amorces utilisées dans les expériences de PCR.

Nom	Plasmide	Insert	Sonde	Sonde
			antisens	sens
4-form	pBS	665-1100	Sma1 digest	HindIII digest
		(NotI-EcoRV)	T7 RNApolymérase	T3 RNA polymérase
3-form	ТА-ТОРО	1899F-2383R	HindIII digest	HindIII digest
(2 plasmides)	pCR 2.1		T7 RNA ploymérase	T7 RNA ploymérase
			clone 16, p3.6	clone 19, p2.4
PSI	pBS	PSI+1391-	BamH1 digest	Homologie avec le
		fin du 3'UTR	T7 RNA polymérase	28S ARN
РТР	ТА-ТОРО	5269F-5617R	HindIII digest	HindIII digest
(2 plasmides)	pCR 2.1		T7 RNA polymérase	T7 RNA polymérase
			clone 1	clone 2
Col I	ТА-ТОРО	2012F-2784R	HindIII digest	HindIII digest
(2 plasmides)	pCR 2.1		T7 RNA polymérase	T7 RNA polymérase
Col III	TA-TOPO	3035F-3730R	HindIII digest	HindIII digest
(2 plasmides)	pCR 2.1		T7 RNA polymérase	T7 RNA polymérase
ColV		2160E 2780D	HindIII digast	HindIII digast
(2 plasmides)	nCP 2 1	3100F-3/80K	T7 RNA polyméroso	TT RNA polyméroso
(2 plasifices)	PCK 2.1		1 / KINA porymetase	1 / ININA porymetase

Tableau récapitulatif des sondes utilisées pour les expériences d'hybridation in situ