



THESE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR ES NEUROSCIENCES

Délivré par l'Université de Poitiers
Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées
(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le **30 septembre 2010**
par **Claire Deschamps**

**Étude de l'expression de la molécule de guidage éphrine-A5
dans le cerveau de souris au cours du développement :
implication dans la mise en place de la voie mésostriatale**

JURY

Dr Christine Métin, Chargée de recherche INSERM, Université Pierre et Marie Curie, Paris Rapporteur
Pr Bertrand Bloch, PU-PH CNRS, Université Victor Segalen, Bordeaux Rapporteur
Dr Fatiha Nothias, Directrice de recherche, INSERM, Université Pierre et Marie Curie, Paris . Examineur
Pr Afsaneh Gaillard, Professeur des universités, CNRS, Université de Poitiers Examineur
Pr Mohamed Jaber, Professeur des universités, CNRS, Université de Poitiers Co-directeur de thèse
Dr Laetitia Prestoz, Maître de conférence, CNRS, Université de Poitiers Co-directeur de thèse

École doctorale : Bio-santé n°524
Unité de recherche : Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires CNRS UMR 6187
Equipe : Physiopathologie des troubles neurodégénératifs et adaptatifs
Secteur de recherche : Biologie, médecine, santé ; aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit de thèse représente le travail de trois années, pendant lesquelles j'ai étudié le guidage axonal des connexions dopaminergiques mésostriatales, comme doctorante à Poitiers. Mes premiers remerciements vont à mes directeurs de thèse, le Dr. Lætitia Prestoz et le Pr. Mohamed Jaber, également chef de l'équipe de Physiopathologie des troubles neurodégénératifs et adaptatifs. Je remercie également le Pr. Afsaneh Gaillard, responsable de la thématique « Parkinson » au sein de l'équipe. Un très grand merci à tous les trois, et en particulier à Lætitia, pour m'avoir fait confiance, m'avoir guidée, conseillée et soutenue dans ce travail. Je tiens également à remercier le Pr. Frédéric Becq, directeur de l'Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires UMR 6187, de m'avoir accueillie dans son unité.

J'exprime mes remerciements au Pr. Christine Métin et au Pr. Bertrand Bloch pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci également au Pr. Fatiha Nothias pour avoir bien voulu faire partie du jury en tant qu'examineur.

Je remercie aussi les chercheurs et jeunes chercheurs qui ont participé, de près ou de loin, et ceux qui m'ont aidée dans la réalisation de cette étude. En premier lieu, merci au Dr. Mylena Morel et au Pr. Guylène Page pour m'avoir enseigné la technique de Western Blot, au Dr. Thierry Janet pour m'avoir aidée dans les génotypages et les PCR, au Dr. Isabelle Frappé et au Dr. Valérie Coronas pour m'avoir aiguillée dans les protocoles de culture cellulaire et au Dr. Lara Passante pour ses précieux conseils à distance sur la culture tissulaire. Un merci particulier au Dr. Anne Cantereau pour les nombreuses heures que j'ai pu passer à la station de microscopie confocale, pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse.

Mes remerciements sincères vont également au personnel technique, Bruno Merceron, Virginie Lardeux, Lætitia Cousin, Maureen Francheteau et « Ponpon », pour leur disponibilité et leur sens de l'organisation qui ont facilité mon travail en laboratoire. Merci aux animalières, Claudine Combes et Khadra Escriva, pour s'être occupées de mes animaux. Je remercie également le personnel administratif, Françoise Communeau, Carole Desfontaines et Lalaso Raynaud pour leur disponibilité et leur gentillesse. Merci enfin à l'ensemble des équipes de Physiopathologie des Troubles Neurodégénératifs et Adaptatifs de l'UMR 6187 et au Groupe de Recherche sur le Vieillessement Cérébral, le GREVIC EA 3808. J'ai passé trois agréables années à travailler à vos côtés. Merci plus particulièrement à mes collègues et amis, Rana, Camille, Claudia, Johanna, Dorothee, Virginie, Lætitia, Sophie, Joëlle, Maureen, Bhaskar, Aude, David, Mylena, Anastasia et Julien pour nos joyeuses conversations, nos fous rires et votre amitié.

Durant ces trois années de thèse, j'ai également beaucoup appris par les formations délivrées par l'Ecole Doctorale Ingénierie, Chimie, Biologie et Géologie (ICBG) puis l'Ecole Doctorale Bio-santé. Je tiens pour cela à remercier le Pr. Boniface Kokoh, ancien directeur de l'Ecole Doctorale ICBG et sa secrétaire Sabrina Biais pour nous avoir toujours considérés, non pas comme des étudiants, mais comme de jeunes professionnels. Merci à tous les intervenants des formations transversales. Ma profonde estime et mes remerciements les plus sincères vont plus particulièrement à Mr. François Baty-Sorel pour m'avoir enseigné notamment les techniques du management et de la conduite de projet et qui n'a eu de cesse de me conseiller pendant ces trois années. Ses riches enseignements me seront très utiles et m'accompagneront dans la suite de ma carrière professionnelle.

Je tiens aussi à remercier l'équipe de Radio Pulsar et du magazine « Bouge? », bimestriel pictavien à destination des 15-30 ans et dans lequel je fus rédactrice pendant ces trois années, à Poitiers. Merci à Olivier Babin, ancien rédacteur en chef, Brigitte Baronnet, ancienne coordinatrice de rédaction, Danièle Tisserand, rédactrice en chef et Marie-Charlotte Dutheil, coordinatrice de rédaction. Être rédactrice pour « Bouge? » fut très enrichissant, professionnellement, intellectuellement et humainement. Merci pour vos précieux conseils, vos enseignements, votre exemple. C'est grâce à cette expérience que j'ai créé ma propre activité de communication en tant qu'auto-entrepreneur en janvier 2010. J'en profite par ailleurs pour remercier l'incubateur d'entreprises innovantes de la Région Poitou-Charentes, « Etincel », et plus précisément son directeur, Mr. Jean-Marc Payerne, et Mme Savéria Désert, chargée de mission, de m'avoir fait confiance en me proposant de travailler à la rédaction des articles de leur newsletter.

Enfin, parce qu'une thèse se vit également comme une aventure humaine extraordinaire, merci à mes amis doctorants internationaux et pluridisciplinaires : Pascale Mustapha, Caio Cesar Christiano, Augusto de Alencar, Federica Rassa, Anna-Maria Pietroccola, Yulia Kozlova, Erika Guevara, Nasma Najjar, Siham Hairoud, Rafik Ben Salma, Gisèle Assaf, Rana El Rawas Salti, Mohamad Mostafa Koubar, Michel Daaboul, Khodor Torro, Ghalia Khoder Yassine, Nisrine Beyrouthi, Diab Adams Freyfer, Joëlle Jandry, Elias Harika. Le Liban, le Brésil, l'Algérie, la Russie, l'Italie, le Maroc et la Costa Rica ne m'ont jamais paru aussi proches et accueillants que pendant ces trois années.

Merci à tous d'avoir fait de mes trois ans de thèse à Poitiers, une expérience à la fois universitaire, scientifique, professionnelle et fortement humaine, riche d'enseignements et de rencontres, qui m'ont fait gagner en assurance et en maturité.

À Etienne,

pour son amour, ses encouragements et son infinie patience,

À mon grand-père,

mon premier professeur, celui qui m'a offert mon premier dictionnaire,

À l'ensemble de ma famille et de ma belle-famille,

pour leur soutien constant,

À Frère Théodore Kouassi Coco,

pour ses prières à 6000 kilomètres,

À Thomas, David Bowie et David Gilmour,

pour tous ces bons moments à rédiger nos comptes-rendus de TP

À mon amie Pascale,

pour que ce manuscrit l'encourage dans la dernière ligne droite de sa thèse,

À tous mes amis Icessiens,

& à Auguste et Albert.

Résumé

Le fonctionnement du système nerveux dépend de la mise en place d'un réseau complexe de connexions neuronales au cours du développement embryonnaire et postnatal. Comprendre comment ces réseaux neuronaux s'établissent est un axe majeur de la neurobiologie du développement. Au-delà de son importance fondamentale, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires du guidage axonal représente un enjeu capital pour appréhender les situations pathologiques consécutives à des troubles lésionnels ou dégénératifs du système nerveux, compte tenu de l'importance des mécanismes développementaux dans la réparation des circuits neuronaux adultes. Au sein de l'équipe Physiopathologie des Troubles Neurodégénératifs et Adaptatifs de l'unité CNRS UMR 6187, le Pr. Afsaneh Gaillard a récemment réussi à reconstruire la voie nigrostriée dans un modèle murin de la maladie de Parkinson, par greffe de cellules embryonnaires issues du mésencéphale ventral. Afin d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu, nous nous sommes attachés à étudier les mécanismes de guidage axonal des neurones dopaminergiques issus du mésencéphale ventral vers leur région cible, le striatum, pendant l'embryogenèse chez la souris. De précédentes études ont suggéré l'implication du couple de molécules de guidage éphrine-A5/EphA5 en se basant sur l'expression de leurs ARNm respectivement mis en évidence dans le striatum et dans le mésencéphale ventral. Cependant, aucune implication fonctionnelle n'a été démontrée. Ainsi, nous sommes-nous tout d'abord attachés à décrire, *in vivo*, l'expression de la protéine éphrine-A5 par immunohistochimie dans le système nerveux central de la souris au cours du développement, avant d'émettre l'hypothèse de l'implication de l'interaction éphrine-A5/EphA5 dans la mise en place de la voie mésostriatale. Nous avons notamment détecté à proximité des axones dopaminergiques, pendant l'embryogenèse et le développement post-natal, l'expression de la protéine éphrine-A5 dans le thalamus, dans le télencéphale ventral selon un gradient décroissant rostro-caudal et ventro-dorsal, et dans le striatum. Nous avons montré, *in vitro* par immunocytochimie et *in vivo* par immunohistochimie, qu'une proportion de neurones dopaminergiques exprime la protéine réceptrice EphA5. De plus, nous avons observé, par stripe assay, que la protéine purifiée éphrine-A5 exerce un effet répulsif sur la majorité des projections dopaminergiques. Chez l'embryon dont le gène codant pour éphrine-A5 a été invalidé, nous avons mis en évidence, par western blot, une diminution de l'expression de la tyrosine hydroxylase, marqueur des neurones catécholaminergiques, dans le mésencéphale ventral. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les éphrines-A, et plus particulièrement éphrine-A5, participent au guidage axonal et à la mise en place topographique des connexions dopaminergiques mésostriatales. Ce travail nous a amenés à proposer un nouveau modèle de guidage axonal des connexions dopaminergiques mésostriatales chez la souris, dans lequel l'interaction répulsive éphrine-A5/EphA5 participerait au maintien de la trajectoire rostro-ventrale de la voie mésostriatale et à la distribution topographique des projections dans le striatum.

Mots clés : éphrine-A5 ; guidage axonal ; développement ; système dopaminergique mésostriatal ; thérapie cellulaire ; maladie de Parkinson ; immunohistochimie ; stripe assay ; culture cellulaire et tissulaire ; western blot

Abstract

Nervous system activity depends on the establishment of a complex network of neuronal connections during embryonic and postnatal development. Understanding how these neural networks are established is a major focus of developmental neurobiology. Beyond its fundamental importance and given the significance of developmental mechanisms in the repair of adult neural circuits, elucidating the cellular and molecular mechanisms of axon guidance is necessary to understand the pathological conditions resulting from lesions or degenerative disorders of the nervous system. In the "Physiopathologie des Troubles Neurodégénératifs et Adaptatifs" CNRS UMR 6187 laboratory, Prof. Afsaneh Gaillard managed to restore the nigrostriatal pathway in a mouse model of Parkinson's disease by grafting embryonic cells from the ventral midbrain in the substantia nigra. This work suggests that guidance cues are present in the adult tissue and may help to repair this pathway. In order to identify the molecular mechanisms that may be involved in this pathological condition, we investigated the mechanisms of guidance of dopaminergic neurons arising from the ventral midbrain during embryogenesis and connecting onto the striatum. Previous studies have suggested the involvement of ephrin-A5/EphA5 guidance molecules. However, no functional role neither expression of these proteins have been demonstrated up to now. We then showed, using immunohistochemistry, that ephrin-A5 protein is widely expressed in the central nervous system of mice during development. We more particularly detected ephrin-A5 in the vicinity of midbrain dopaminergic axons in the thalamus, the ventral forebrain and the striatum. Moreover, we showed, that a proportion of dopaminergic neurons express the receptor protein EphA5. In addition, we observed, in stripe assay, that the purified protein ephrin-A5 has a repellent effect on dopaminergic projections. Finally, the study of ephrin-A5 knock-out mouse embryos exhibited a decrease of tyrosine hydroxylase (used as marker for midbrain dopaminergic neurons) expression in the substantia nigra. Overall, this study suggests that ephrins-A and particularly ephrin-A5 may participate in the axon guidance of the dopaminergic mesostriatal pathway. This led us to propose a new model of axon guidance of dopaminergic mesostriatal connections in mice, in which the repulsive interaction between ephrin-A5, expressed in the microenvironment of dopaminergic fibers, and EphA5, expressed on midbrain dopaminergic neurons, participate in the maintenance of the rostro-ventral trajectory of this pathway and in the topographic distribution of dopaminergic projections onto the striatum.

Keywords : ephrin-A5 ; axon guidance ; development ; mesostriatal dopaminergic system ; cellular therapy ; Parkinson's disease ; immunohistochemistry ; stripe assay ; cell and tissue culture ; western-blot

SOMMAIRE GENERAL

PRINCIPALES ABREVIATIONS	2
AVANT-PROPOS	3
INTRODUCTION	6
I. UN BREF HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR LE GUIDAGE AXONAL	8
II. LA FAMILLE DES EPHRINES/EPH DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	11
III. LE SYSTEME DOPAMINERGIQUE ISSU DU MESENCEPHALE VENTRAL	33
IV. BUT DU TRAVAIL ET STRATEGIE D'ETUDE	42
CHAPITRE 1 : DISTRIBUTION SPATIO-TEMPORELLE DE LA PROTEINE EPHRINE-A5 DANS LE CERVEAU DE LA SOURIS AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE	44
I. RESUME	46
II. ARTICLE SOUMIS AU JOURNAL <i>BMC NEUROSCIENCE</i>	51
CHAPITRE 2 : IMPLICATION DE LA PROTEINE EPHRINE-A5 DANS LE DEVELOPPEMENT DES NEURONES DOPAMINERGIQUES DU SYSTEME MESOSTRIATAL EMBRYONNAIRE	80
I. RESUME	83
II. ARTICLE PUBLIE DANS LE JOURNAL <i>EXPERIMENTAL NEUROLOGY</i>	87
III. EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES	104
DISCUSSION GENERALE	116
I. RAPPEL DES RESULTATS	119
II. PROPOSITION D'UN NOUVEAU MODELE DE GUIDAGE AXONAL DES VOIES MESOSTRIATALE ET MESOCORTICALE	120
III. VERS DE NOUVELLES PISTES DE RECHERCHE DU ROLE DES EPHRINES/EPH DANS LA REPARATION DE LA VOIE MESOSTRIATALE LESEE CHEZ L'ADULTE	126
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES D'AMELIORATION DU GUIDAGE AXONAL APRES GREFFE DANS LA SUBSTANCE NOIRE LESEE	132
REFERENCES	134

Principales abréviations

AADC : L-aromatic amino acid decarboxylase
ADAM : A-Disintegrin-And-Metalloprotease
ATV : aire tegmentale ventrale
Calb : calbindine
Cas : Crk-associated substrate
CSPG : chondroïtin sulfate proteoglycans
DAT : dopamine transporter
DCC : récepteur « deleted colorectal cancer »
Ephexin1: Eph-interacting exchange protein 1
GEF : facteur d'échange du nucléotide guanine
GFP : green fluorescent protein
Girk2 : canal potassique à rectification entrante 2
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GRIP : glutamate receptor interacting protein
MC : mésencéphale caudal
MD : mésencéphale dorsal
MFB : fibres du faisceau reliant le mésencéphale au télencéphale
Npn : récepteur neuropiline
PDZ : domaine de liaison type-II PSD-95/Disc large/ZO-1
PICK1 : protein interacting with C-kinase
Robo : récepteur Roundabout
SAM : domaine steril- α
SH2 : Src-Homology 2
SHEP1 : SH2 domain-containing Eph receptor-binding protein 1
Shh : sonic hedghog
Smo : récepteur Smoothened
SN : substance noire
SNc : substance noire *pars compacta*
SNr : substance noire *pars reticulata*
Souris X -/- : souris dont le gène codant pour la protéine X a été invalidé
TH : tyrosine hydroxylase
X-Fc : protéine chimère X couplée à un fragment Fc

AVANT-PROPOS

Le fonctionnement du système nerveux dépend de la mise en place d'un réseau complexe de connexions neuronales au cours du développement embryonnaire et postnatal. Un des défis majeurs en neurobiologie du développement est de comprendre comment ces réseaux neuronaux s'établissent. Au-delà de son importance fondamentale, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires du guidage axonal représente un enjeu important pour appréhender les situations pathologiques consécutives à des troubles lésionnels ou dégénératifs du système nerveux. En effet, la greffe intracérébrale de cellules embryonnaires dans des modèles animaux de pathologies dégénératives est une approche thérapeutique prometteuse pour la reconstruction des circuits endommagés, à titre d'exemple dans la maladie de Parkinson (Nikkhah *et coll.*, 1994, 1995 ; Mendez *et coll.*, 1996, 1997, 2000 ; Blanco *et coll.*, 1998 ; Chiang *et coll.*, 2001 ; Sun *et coll.*, 2003 ; Gaillard *et coll.*, 2009) ou dans la chorée de Huntington (*pour revue*, Peschanski *et coll.*, 2004). Récemment, dans l'équipe du Pr. Mohamed Jaber au sein de l'UMR CNRS 6187, le Pr. Afsaneh Gaillard a montré la possibilité de reconstruction de la voie nigrostriée lésée par greffe intranigrale de cellules embryonnaires du mésencéphale ventral (MV), dans un modèle murin de la maladie de Parkinson (Gaillard *et coll.*, 2009). Deux mois après la greffe, les auteurs ont montré une différenciation des cellules embryonnaires en neurones dopaminergiques, le rétablissement d'une connectivité entre les neurones greffés et le striatum et une récupération fonctionnelle ainsi qu'une augmentation du taux de dopamine dans le striatum par rapport aux souris lésées non greffées. Ces résultats mettent ainsi en évidence les potentialités de développement axonal des neurones embryonnaires dans le système nerveux central adulte. Le maintien, dans le cerveau adulte sain, de l'expression de certaines molécules de guidage présentes pendant l'embryogenèse et la réexpression d'autres dans le cerveau adulte post-lésionnel (Symonds *et coll.*, 2007 ; Figueroa *et coll.*, 2006 ; Goldshmit *et coll.*, 2006 ; Knöll *et coll.*, 2001a) participent sans doute au développement des axones de neurones greffés. L'étude du rôle de

ces molécules impliquées dans les mécanismes cellulaires et moléculaires du guidage axonal pendant le développement est donc le préalable nécessaire à la compréhension de leurs rôles dans les processus de la repousse axonale et la reconstruction des circuits neuronaux endommagés chez l'adulte.

Ainsi, mon travail de thèse au sein de l'équipe « Physiologie des troubles neurodégénératifs et adaptatifs » dirigée par le Pr. Mohamed Jaber a consisté à mieux comprendre les mécanismes de guidage axonal de la voie mésostriatale, permettant aux axones des neurones dopaminergiques localisés dans le MV de trouver leur chemin vers le striatum, pendant le développement du système nerveux chez la souris. J'ai plus particulièrement cherché à comprendre le rôle d'éphrine-A5, une molécule de guidage axonal exprimée dans le système mésostriatal embryonnaire, dans la mise en place de ces connexions dopaminergiques. Dans ce manuscrit, je présente en introduction l'historique du concept de guidage axonal et la découverte des principales familles de molécules de guidage, dont la famille des éphrines/Eph et plus particulièrement éphrine-A5 et son implication dans le développement du système nerveux. Je développe ensuite les connaissances actuelles des mécanismes de guidage axonal de la voie mésostriatale. La description de mes travaux s'organise ensuite en deux chapitres : le premier décrit la localisation de la protéine éphrine-A5, mise en évidence par immunohistochimie, dans l'ensemble de l'encéphale au cours du développement (Deschamps *et coll.*, soumis à *BMC Neuroscience*), puis le second se concentre sur la mise en évidence du rôle d'éphrine-A5 dans l'établissement de la voie mésostriatale *in vitro* et *in vivo* (Deschamps *et coll.*, 2009). L'ensemble des résultats obtenus montre que les éphrines-A, et plus particulièrement éphrine-A5, participent au guidage axonal et à la mise en place topographique des connexions dopaminergiques mésostriatales. Je propose ainsi, dans la discussion générale de ce manuscrit, un nouveau modèle de guidage axonal des connexions mésostriatales chez la souris, pendant le développement.

INTRODUCTION

I.	UN BREF HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR LE GUIDAGE AXONAL	8
II.	LA FAMILLE DES EPHRINES/EPH DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	11
1.	<i>Aspects structurels</i>	12
a.	Structure des récepteurs Eph	12
b.	Structure des ligands éphrines	13
2.	<i>Mécanismes moléculaires liés à l'interaction des éphrines/Eph</i>	13
a.	Interactions éphrine/Eph	13
b.	Voies de signalisation mises en jeu après interaction éphrine/Eph	14
c.	Mécanismes de répulsion ou d'adhérence	18
3.	<i>Résumé des rôles des éphrines et de leurs récepteurs Eph durant le développement embryonnaire et postnatal chez le rongeur</i>	20
a.	Morphogenèse et migration cellulaire précoce	20
b.	Régulation de la prolifération et de l'apoptose	21
c.	Guidage axonal et ligne médiane	22
d.	Établissement des cartes topographiques	23
4.	<i>Une éphrine de la sous-classe A : l'éphrine-A5</i>	26
a.	Généralités et aspect structurel	27
b.	Patron d'expression d'éphrine-A5 durant le développement du système nerveux central	27
c.	Implication d'éphrine-A5 dans le développement de l'encéphale	30
III.	LE SYSTEME DOPAMINERGIQUE ISSU DU MESENCEPHALE VENTRAL	33
1.	<i>Rappel anatomique des voies dopaminergiques issues du mésencéphale ventral chez l'adulte</i>	33
2.	<i>Mise en place des voies mésostriatale et mésocorticale au cours de l'embryogenèse</i>	35
a.	Ontogénie chez le rongeur :	35
b.	Influence de l'environnement sur le guidage axonal :	37
IV.	BUT DU TRAVAIL ET STRATEGIE D'ETUDE	42

Index des figures et tableaux

Figure I – Les différentes familles de molécules de guidage axonal et leurs récepteurs. (Modifiée d’après Dickson, 2002)	8
Figure II – Homologies de séquences des récepteurs Eph et de leurs ligands, les éphrines. (D’après Eph Nomenclature Committee, 1997).	12
Figure III – Représentation schématique de l’organisation en domaine des récepteurs Eph et de leurs ligands, les éphrines. (Modifiée d’après Yamaguchi et Pasquale, 2004)	13
Figure IV – Schéma des différentes modalités d’interaction possibles des récepteurs Eph et des ligands éphrines. (Modifiée d’après Arvanitis et Davy, 2008)	14
Figure V – Activation de la signalisation bidirectionnelle. (Himanen <i>et coll.</i> , 2007).	15
Figure VI – Schéma récapitulatif des interactions impliquées dans la signalisation directe. (Modifiée d’après Aoto et Chen, 2007)	15
Figure VII – Schéma modélisant l’endocytose du complexe ligand/récepteur. (Modifiée d’après Egea et Klein, 2007)	16
Figure VIII – Schéma récapitulatif des interactions impliquées dans la signalisation inverse. (Modifiée d’après Aoto et Chen, 2007)	17
Figure IX – Mécanisme de répulsion par clivage protéolytique lors de l’interaction d’EphA3 avec ses ligands éphrine-A2 ou éphrine-A5. (Modifiée d’après Egea et Klein, 2007)	18
Figure X – <i>Trans</i> -endocytose bidirectionnelle des complexes éphrine/Eph. (D’après Egea et Klein, 2007)	19
Figure XI – Représentation tridimensionnelle des noyaux dopaminergiques A8 ou aire rétro-rubrale, A9 ou substance noire <i>pars compacta</i> et A10 ou aire tegmentale ventrale chez le rat. (D’après German et Manaye, 1993).	33
Figure XII – Emergence des projections dopaminergiques du mésencéphale ventral. (Modifiée d’après Nakamura <i>et coll.</i> , 2000)	35
Figure XIII – Mise en place des connexions dopaminergiques issues du mésencéphale ventral et innervant le striatum et le cortex, au cours du développement, chez le rat. (Modifiée d’après Van Den Heuvel et Pasterkamp, 2008)	36
Figure XIV – Schéma représentant l’influence de l’environnement dans la mise en place des connexions dopaminergiques mésostriatales et mésocorticales, chez le rat. (D’après Van Den Heuvel et Pasterkamp, 2008)	37
Tableau I – Nomenclatures actuelle et ancienne des récepteurs Eph et de leurs ligands, les éphrines. (Actualisé d’après Lemke, 1997)	12
Tableau II – Localisation de l’expression de l’ARNm codant pour éphrine-A5 et de la protéine au cours du développement embryonnaire du rongeur.	27
Tableau III – Localisation de l’expression de l’ARNm codant pour éphrine-A5 et de la protéine au cours du développement postnatal du rongeur.	28

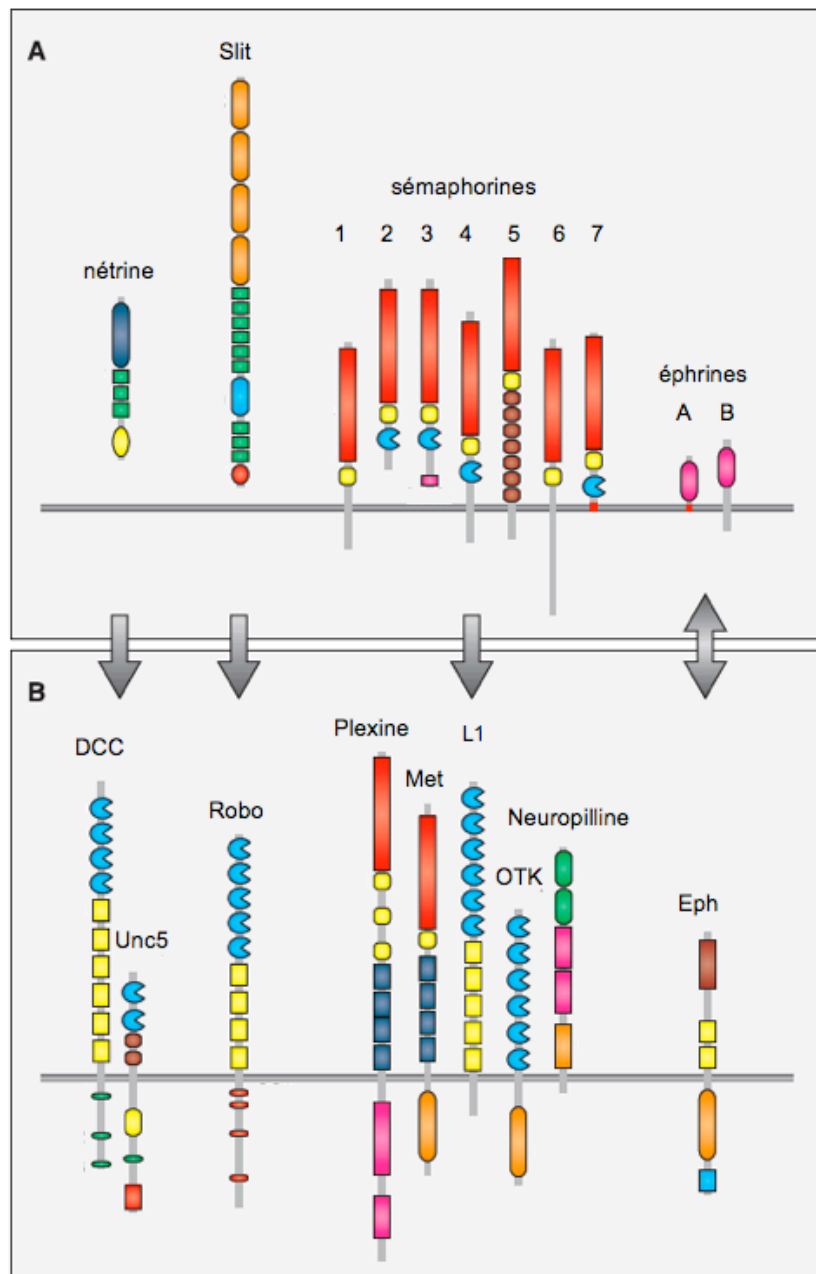


Figure I – Les différentes familles de molécules de guidage axonal (A) et leurs récepteurs (B). La nétrine lie les récepteurs DCC et Unc5, tandis que Slit interagit avec Robo et les sémaphorines 1 à 7 avec la Plexine, Met, L1, OTK et la neuropilline. Les éphrines se lient aux récepteurs Eph. (Modifiée d'après Dickson, 2002)

I. Un bref historique des recherches sur le guidage axonal

Les recherches sur le guidage axonal débutent au XIXe siècle avec la découverte en 1893 du « cône croissance » des axones par Santiago Ramón Y Cajal. L'observation de cette structure l'amène à proposer l'idée d'une « croissance dirigée » des axones, pendant le développement. L'inventeur de la technique de culture tissulaire, Ross Harisson, confirmera, 17 ans plus tard, les propriétés mobiles des cônes de croissance. Se pose alors la question du guidage des axones vers leur cible *in vivo*. Il faut attendre les années 1940 et les études de Roger Sperry sur la reconstitution des connexions visuelles et la restauration de la vision après lésion du nerf optique chez l'amphibien pour voir émerger une réponse : en 1963, Sperry formule son postulat de la « chimioaffinité ». Cette théorie suggère qu'il existe des gradients de protéines de guidage dans l'environnement. Les cônes de croissance, possédant les récepteurs capables de reconnaître ces signaux, sont dirigés par chimioattraction ou chimiorépulsion.

Les intégrines, fasciclinae et les molécules d'adhérence des cellules neuronales (NCAM), furent les premières protéines candidates comme actrices du guidage axonal. Cependant, ces molécules agissent généralement en fournissant un substrat qui favorise la croissance axonale plutôt qu'en dirigeant directement le cône de croissance (Lilienbaum *et coll.*, 1995). C'est à la fin des années 1980 et le début des années 1990 qu'une série de facteurs contribuant activement à attirer ou repousser les axones fut identifiée. On découvre alors que la croissance axonale est contrôlée par l'action concertée sur le cône de croissance de molécules attractives et répulsives, nécessitant soit un contact avec le cône de croissance soit une action à distance. Parmi elles, quatre familles de molécules de guidage axonal présentent un rôle majeur : les nétrines, les molécules Slits, les sémaphorines et les Eph et leurs ligands les éphrines (Figure I).

Les nétrines tirent leur nom du terme « netr » en sanskrit signifiant « celui qui guide » (Serafini *et coll.*, 1994). Au nombre de 5 chez le rat, la souris et l'homme (les nétrines-1, 3 et 4 et les nétrines G1 et G2), les nétrines-1, 3 et 4 agissent sur les cellules neuronales via leur interaction avec les récepteurs de la néogénine, DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma) et la famille des UNC5, A à D, tandis que les nétrines G1 et G2 agissent sur les récepteurs NGL (Mehlen et Mazelin, 2003, *pour revue*, Moore *et coll.*, 2007). Sécrétées, nétrine-1, 3 et 4 présentent de multiples rôles dans le domaine du guidage axonal, agissant à distance comme des molécules chimioattractives ou chimiorépulsives suivant le contexte environnemental (Round et Stein, 2007 ; *pour revue*, Rajasekharan et Kennedy, 2009). Les nétrines régulent ainsi le développement des axones commissuraux dans la moelle épinière et dans le cerveau, au niveau notamment du corps calleux, de la commissure hippocampique et du chiasma optique (Serafini *et coll.*, 1996). Elles sont aussi impliquées dans la migration des neurones, des précurseurs des oligodendrocytes et des cellules du mésoderme, durant l'embryogenèse (*pour revue*, Plachez *et coll.*, 2005).

La famille des protéines Slits regroupe trois sous-types de glycoprotéines, Slit1, Slit2 et Slit3, de respectivement 168, 170 et 169 kDa, caractérisées par la présence de quatre domaines riches en leucine au niveau de leur séquence N-terminale. Slit a été identifiée comme ligand pour le récepteur Roundabout (Robo) (Brose et Tessier-Lavigne, 2000, *pour revue*, Chédotal, 2007). Son interaction avec Robo peut conduire à une répulsion ou à une attraction des axones et est impliquée dans de multiples rôles comme la régulation de la migration neuronale (Wu *et coll.*, 1999), le guidage axonal (Brose *et coll.*, 1999 ; Kidd *et coll.*, 1999 ; Marin *et coll.*, 2002 ; Kawano *et coll.*, 2003) et la régulation des branchements axonaux et dendritiques (Ozdinler et Erzurumlu, 2002). Un rôle majeur des protéines Slits est la prévention du croisement de la ligne médiane par les axones commissuraux (Hohenester *et coll.*, 2006).

Les sémaphorines furent découvertes initialement chez les invertébrés (Kolodkin *et coll.*, 1992). Cette famille de molécules comprend à la fois des protéines sécrétées et d'autres ancrées à la membrane plasmique. Parmi les 8 classes de sémaphorines, les classes 3, 4, 5, 6 à 7 sont présentes chez les vertébrés (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). La classe 3 présente les sémaphorines sécrétées tandis que les classes 4, 5, 6 et 7 comprennent les sémaphorines ancrées à la membrane et les sémaphorines transmembranaires. Les sémaphorines interagissent avec deux familles majeures de récepteurs : les neuropilines 1 et 2 (Npn1 et Npn2) et les Plexines A1 à A4, B1 à B3, C1 et D1. Les sémaphorines de la classe 3 se fixent sur un complexe de récepteurs, incluant la Npn comme co-récepteur obligatoire. Associée aux récepteurs de Plexines, la réponse induite par la fixation des sémaphorines de classe 3 sur ce complexe est alors dépendante de la nature de la combinaison des récepteurs Npn et Plexine. Ainsi, l'interaction des sémaphorines de classe 3 avec le complexe Plexines-A1, A2 et A4 co-exprimés avec Npn1 et Npn2 induit une contraction du cytosquelette (Suto *et coll.*, 2003). Les axones de neurones sympathiques en culture issus d'une souris dont le gène codant pour la Plexine-3 a été invalidé, ne sont plus repoussés par Sema3F et perdent partiellement leur capacité de réponse à Sema3A (Cheng *et coll.*, 2001). D'autres récepteurs peuvent également interagir avec les sémaphorines de classe 3. C'est le cas de la molécule d'adhérence L1 qui, associée à Npn1, permet la transduction d'une réponse chimioréulsive vis-à-vis des neurones corticaux (Castellani *et coll.*, 2000, 2002). Il a également été mis en évidence le rôle de l'interaction de la sémaphorine de classe 7, Sema7A, avec les récepteurs intégrines dans la croissance des axones des neurones olfactifs (Pasterkamp *et coll.*, 2003). Enfin, l'implication de SemaA4 dans le collapsus du cône de croissance des neurones de l'hippocampe (Yukawa *et coll.*, 2005) et celles de Sema5A et Sema6A dans le guidage axonal des motoneurones axiaux (Hilario *et coll.*, 2009) et des tractus corticospinaux (Runker *et coll.*, 2008) respectivement, ont été mises en évidence.

Les récepteurs Eph ont été identifiés et clonés pour la première fois dans des cellules issues de carcinomes hépatocellulaires humains produisant de l'érythropoïétine (erythropoietin-producing hepatoma cell line) (Hirai *et coll.*, 1987). *Leurs ligands, les éphrines*, ont été décrits par Walter *et coll.* (1987) dans le système rétinotectal puis identifiés quelques années plus tard (Bartley *et coll.*, 1994 ; Beckmann *et coll.*, 1994 ; Cheng *et Flanagan*, 1994). Les Eph, protéines tyrosine kinases, et leurs ligands les éphrines sont abondamment exprimés dans le cerveau au cours du développement et sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires durant le développement. Le paragraphe suivant leur est consacré.

II. La famille des éphrines/Eph dans le système nerveux central

La famille des éphrines/Eph a reçu une attention considérable de la part de la communauté scientifique ces dernières années : récepteurs et ligands ont été identifiés à une vitesse vertigineuse et paraissent impliqués dans de multiples étapes clés du développement du système nerveux central, comme dans la segmentation du rhombencéphale, la migration des cellules des crêtes neurales, le guidage axonal ou encore l'établissement de projections topographiques. À ce jour, 16 récepteurs et 9 ligands distincts ont été identifiés chez les vertébrés à sang chaud (mammifères et oiseaux) et de nombreuses protéines connexes sont décrites chez les vertébrés à sang froid et les invertébrés. En raison du rythme rapide de la découverte de ces récepteurs et ligands dans diverses espèces, de nombreux noms différents ont été utilisés pour les désigner, rendant le suivi des recherches dans ce domaine difficile pour la communauté scientifique. En septembre 1996, s'est donc tenu l'atelier "Molecular Biology of Axon Guidance" au EMBL d'Heidelberg, réunissant les représentants de plus de vingt laboratoires impliqués dans la recherche sur la famille des Eph, afin d'unifier et de

Tableau I – Nomenclatures actuelle et ancienne des récepteurs Eph et de leurs ligands, les éphrines. L'ancienne nomenclature désigne chaque récepteur et chaque ligand de chacune des deux classes par un chiffre arabe attribué en fonction de la date de publication de la séquence. GPI : glycosylphosphatidylinositol. (Actualisé d'après Lemke, 1997)

Récepteurs Eph						
	Nom actuel	Nom du locus du gène	Noms originaux (ancienne nomenclature)			
			<i>humain</i>	<i>souris</i>	<i>rat</i>	<i>poulet</i>
<i>Lient généralement les éphrines de classe A, qui sont ancrés à la membrane plasmique par un GPI</i>	EphA1	EPHA1	Eph	Esk		
	EphA2	EPHA2	Eck	mEck/Myk2/Sek2		
	EphA3	EPHA3	Hek	Mek4	Tyro4	Cek4
	EphA4	EPHA4	Hek8	Sek1	Tyro1	Cek8
	EphA5	EPHA5	Hek7	Bsk	Ehk1/Rek7	Cek7
	EphA6	EPHA6		mEhk2	Ehk2	
	EphA7	EPHA7	Hek11	Mdk1/Ebk	Ehk3	
	EphA8	EPHA8	Eek	mEek	Eek	
	EphA9	EPHA9				
	EphA10	EPHA10				
<i>Lient généralement les éphrines de classe B, qui sont transmembranaires</i>	EphB1	EPHB1	Net		Elk	Cek6
	EphB2	EPHB2	Erk/Hek5/Drt	Nuk/Sek3	Tyro5	Cek5
	EphB3	EPHB3	Hek2	Sek4/Mdk5	Tyro6	Cek10
	EphB4	EPHB4	Htk	Myk1/Mdk2	Tyro11	
	EphB5	EPHB5				Cek9
	EphB6	EPHB6		Mep		

Ligands éphrines						
	Nom actuel	Nom du locus du gène	Noms originaux (ancienne nomenclature)			
			<i>humain</i>	<i>souris</i>	<i>rat</i>	<i>poulet</i>
<i>Ancrés à la membrane plasmique par un GPI</i>	Ephrine-A1	EFNA1	B61	B61	B61	
	Ephrine-A2	EFNA2		ELF1		ELF1
	Ephrine-A3	EFNA3	Ehk1-L/LERK3			
	Ephrine-A4	EFNA4	LERK4			
	Ephrine-A5	EFNA5	AL-1/LERK7			RAGS
	Ephrine-A6	EFNA6				
<i>Transmembranaires</i>	Ephrine-B1	EFNB1	LERK2/Elk-L	Cek5-L	LERK2	cCek5-L
	Ephrine-B2	EFNB2	Htk-L/LERK5	ELF2		
	Ephrine-B3	EFNB3	NLERK2/Elk-L3			

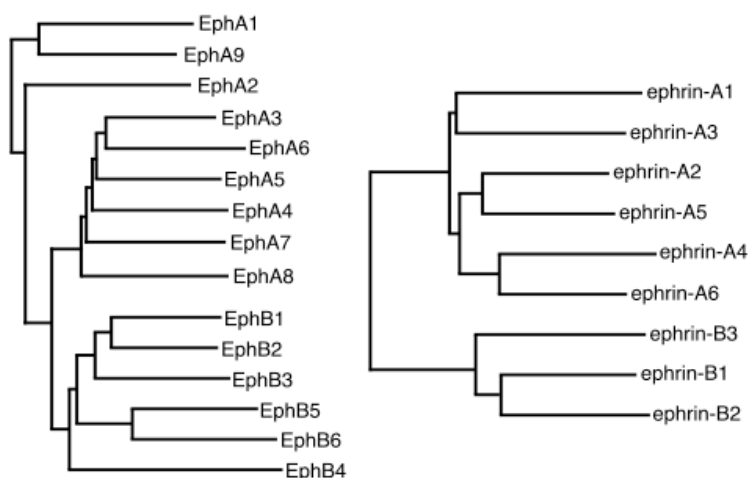


Figure II – Homologies de séquences des récepteurs Eph et de leurs ligands, les éphrines. Ces dendrogrammes ont été produits avec le programme « Clustal », en utilisant le domaine extracellulaire des récepteurs et les séquences de bases conservées des ligands. (D'après Eph Nomenclature Committee, 1997).

systematiser la nomenclature de ces ligands et de ces récepteurs (Tableau I). Depuis 1997, les ligands sont dénommés « éphrines » (Lemke, 1997). Ce terme est issu de l'abréviation pour "Eph family receptor interacting proteins" ou du mot grec de l'Antiquité, "ephoros" (εφορος), qui signifie « surveillant » ou « contrôleur ». Les ligands sont divisés en deux types, A et B, les premiers étant ancrés à la membrane cellulaire par un glycosylphosphatidylinositol et les autres possédant un domaine transmembranaire hydrophobe et un court domaine cytoplasmique. Leurs structures respectives sont détaillées dans le paragraphe II. 1.b.. En outre, ces deux sous-groupes de ligands peuvent se différencier sur la base de leurs homologies de séquence et fonctionnellement sur la base de leurs liaisons préférentielles aux deux sous-groupes de récepteurs correspondants (Figure II).

En effet, les récepteurs Eph sont également divisés en deux groupes basés sur la parenté de séquences de leurs domaines extracellulaires (Figure II). Ce regroupement semble également correspondre à la capacité des récepteurs à se lier aux éphrines-A ou éphrines-B. Aussi le groupe de récepteurs interagissant préférentiellement avec les éphrines-A est appelé EphA et celui qui comprend les récepteurs interagissant préférentiellement avec les éphrines-B est appelé EphB (Gale *et coll.*, 1996). Il existe cependant deux exceptions connues à ce jour : EphA4 lie éphrine-B2 et B3 (Blits-Huizinga *et coll.*, 2004) et EphB2 lie éphrine-A5 (Himanen *et coll.*, 2004).

1. Aspects structurels

a. Structure des récepteurs Eph

Comme tous les récepteurs tyrosine kinases, les récepteurs Eph sont des protéines transmembranaires de classe I, comme présentés dans la figure III. Ils sont caractérisés par une région extracellulaire N-terminale comprenant un domaine de liaison au ligand, un motif riche en cystéines impliqué dans la modulation des interactions récepteur/récepteur lors des

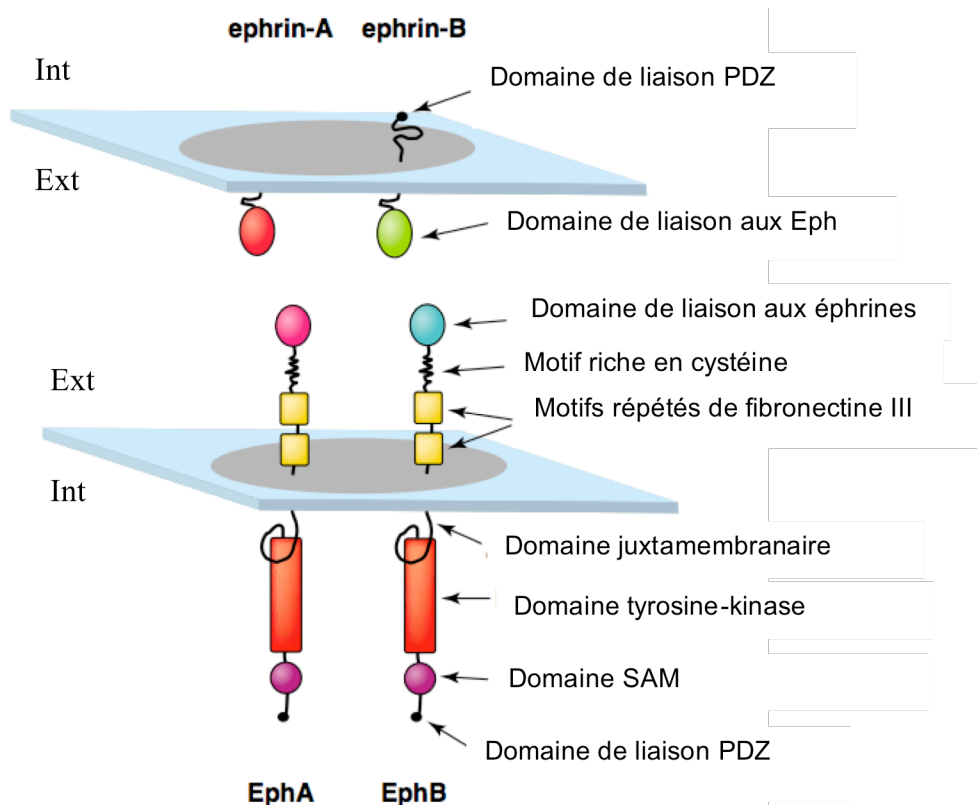


Figure III – Représentation schématique de l'organisation en domaine des récepteurs Eph et de leurs ligands, les éphrines. Les récepteurs Eph sont caractérisés par une région extracellulaire N-terminale comprenant un domaine de liaison au ligand, un motif riche en cystéine et deux motifs fibronectine de type III. Le domaine intracellulaire peut être divisé en quatre unités fonctionnelles : le domaine juxtamembranaire suivi d'un domaine tyrosine-kinase hautement conservé, un domaine stéril- α (SAM) suivi d'un domaine de liaison type-II PSD-95/Disc large/ZO-1 (PDZ). Les éphrines-B possèdent un domaine cytoplasmique dont les 33 derniers acides aminés sont hautement conservés : cette portion comporte 5 résidus tyrosine ainsi qu'un domaine liant le motif PDZ (PSD-95/Disc large/ZO-1) en position C-terminale. Int : compartiment intracellulaire ; Ext : compartiment extracellulaire (Modifiée d'après Yamaguchi et Pasquale, 2004)

oligomérisations (Boyd *et coll.*, 2001), et deux motifs fibronectine de type III qui peuvent également interagir avec le ligand en configuration *cis* (Yamaguchi et Pasquale, 2004). Le domaine intracellulaire peut être divisé en quatre unités fonctionnelles : le domaine juxtamembranaire suivi d'un domaine tyrosine kinase hautement conservé, un domaine stérile- α (SAM) suivi d'un domaine de liaison type-II PSD-95/Disc large/ZO-1 (PDZ), particulièrement important pour le regroupement des Eph (Torres *et coll.*, 1998), à l'extrémité C-terminale (Kullander et Klein, 2002).

b. Structure des ligands éphrines

Les éphrines-A sont ancrées à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol et ne possèdent pas de domaine cytoplasmique, tandis que les éphrines-B en possèdent un dont les 33 derniers acides aminés sont hautement conservés : cette portion comporte 5 résidus tyrosine ainsi qu'un domaine liant le motif PDZ en position C-terminale qui intervient dans l'interaction avec les effecteurs de la signalisation, comme indiqué dans la figure III (Yamaguchi et Pasquale, 2004).

2. Mécanismes moléculaires liés à l'interaction des éphrines/Eph

a. Interactions éphrine/Eph

Comme les récepteurs Eph et leurs ligands, les éphrines, sont tous deux liés à la membrane plasmique, leur activation nécessite donc une interaction cellule/cellule. La reconnaissance et l'interaction entre les récepteurs et les ligands exprimés à la surface de deux cellules proches est donc la première étape de la signalisation cellulaire. Chaque couple de récepteur Eph et de ligand éphrine forme tout d'abord des hétérodimères de haute affinité. Ces dimères peuvent ensuite former des hétérotétramères avec cependant une affinité

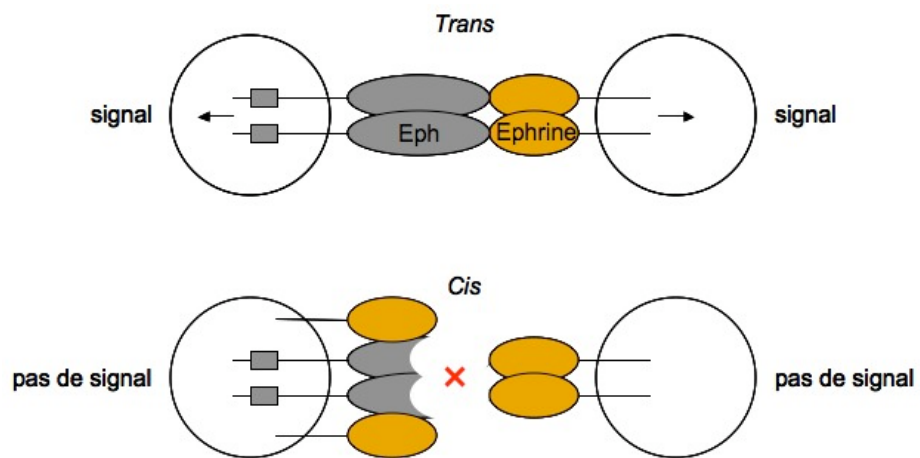


Figure IV – Schéma des différentes modalités d’interaction possibles des récepteurs Eph (en gris) et des ligands éphrines (en orange). Les récepteurs Eph et les ligands éphrines de deux cellules différentes interagissent en *trans* et peuvent activer un signal bidirectionnel. Les récepteurs et les ligands d’une même cellule interagissent en *cis*. Une interaction en *cis* empêche une nouvelle interaction en *trans* et inhibe le signal. (Modifiée d’après Arvanitis et Davy, 2008)

moindre, qui, à forte concentration, se regrouperont eux-mêmes en oligomères, comme c'est le cas par exemple pour le couple éphrineB2/EphB2 dont la structure du complexe a été cristallisée par Himanen *et coll.* (2001). La spécificité de cette famille de molécule réside dans le fait que l'interaction des éphrines sur leurs récepteurs Eph peut transduire un signal non seulement dans la cellule exprimant le récepteur mais également dans la cellule exprimant le ligand. Classiquement, les complexes ligands/récepteurs de signalisation unidirectionnelle sont des trimères composés de deux récepteurs Eph et d'un ligand, tandis que les complexes de signalisation bidirectionnelle sont au moins des tétramères (Himanen et Nikolov, 2003). Une autre caractéristique est le fait que l'interaction entre les récepteurs Eph et leurs ligands, les éphrines, peut avoir lieu en *trans*, c'est-à-dire entre deux cellules différentes, mais également en *cis*, le récepteur et son ligand étant exprimés par une même cellule (Hornberger *et coll.*, 1999). Il est communément admis qu'une interaction en *trans* active la signalisation intracellulaire bidirectionnelle et qu'une interaction en *cis* empêche une interaction en *trans* (Arvanitis et Davy, 2008) (Figure IV). L'activation éphrine/Eph entraîne ensuite différents comportements en fonction du type cellulaire activé, mais généralement, transduit un signal répulsif entre les deux cellules exprimant le ligand et le récepteur. De façon plus générale, les voies de signalisation en aval des éphrines et des Eph tendent à réguler le cytosquelette, notamment l'actine et médient ainsi différents processus développementaux comme la croissance axonale, le guidage axonal ou le collapsus du cône de croissance, comme détaillé ci-après (Kullander et Klein, 2002).

b. Voies de signalisation mises en jeu après interaction éphrine/Eph

La spécificité de l'interaction éphrine/Eph réside dans le fait qu'elle puisse entraîner une signalisation bidirectionnelle : directe via les récepteurs Eph et inverse via les ligands

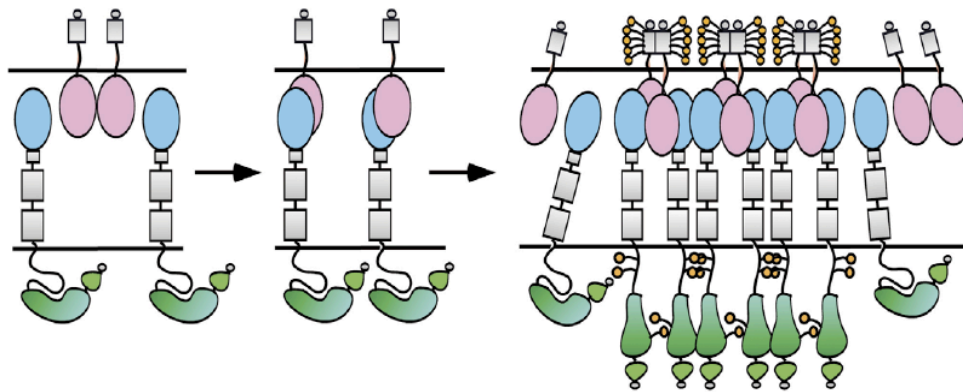


Figure V – Activation de la signalisation bidirectionnelle. Le modèle actuel décrit une interaction initiale de haute affinité entre un récepteur Eph (en bleu) et son ligand (en rose), suivie par la tétramérisation, l'oligomérisation et le regroupement des protéines aux sites de contact cellule/cellule. La phosphorylation (en orange) des résidus de la boucle d'activation et du segment juxtamembranaire au niveau des domaines cytoplasmiques des récepteurs Eph et des éphrines-B conduit à l'activation de la kinase (en vert) (Himanen *et coll.*, 2007).

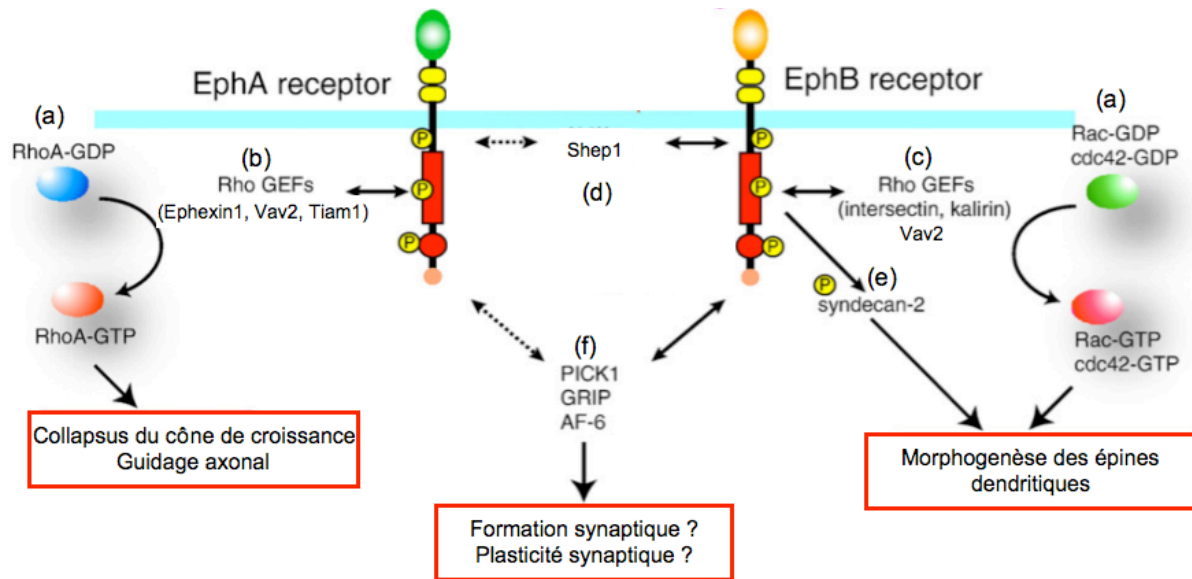


Figure VI – Schéma récapitulatif des interactions impliquées dans la signalisation directe. Les lignes fléchées continues indiquent les interactions vérifiées tandis que les lignes fléchées discontinues indiquent les interactions probables. Les interactions des récepteurs Eph avec les facteurs d'échange du nucléotide guanine (Rho GEFs) comme l'éphexine1, Vav2 et Tiam1 pour les récepteurs EphA (b), l'intersectine, la kalirine et Vav2 pour les récepteurs EphB (c) sont impliquées dans différents processus comme le guidage axonal, le collapsus du cône de croissance et la morphogenèse des épines dendritiques, via la famille des GTPases Rho (a). L'interaction des récepteurs EphB avec le syndecan-2 (e) intervient également dans la morphogenèse des épines dendritiques, tandis que celle avec Shep1 (d) module la migration cellulaire. L'interaction des récepteurs Eph avec les protéines PICK1, GRIP et AF-6 (f) serait impliquée dans la formation et la plasticité des synapses. (Modifiée d'après Aoto et Chen, 2007)

éphrines.

- Voies de signalisation directe via les récepteurs Eph

L'oligomérisation des complexes éphrines/Eph et leur regroupement aux sites de contact cellule/cellule entraîne la phosphorylation en *trans* des résidus tyrosine du segment juxtamembranaire des récepteurs Eph. Ceci interrompt l'association entre ce domaine et le domaine tyrosine kinase et conduit ainsi à la levée de l'autoinhibition de l'activité enzymatique, capable alors de phosphoryler les résidus tyrosine du récepteur voisin (Figure V). Dans le même temps, les résidus tyrosine nouvellement phosphorylés recrutent, via les domaines SH2 (Src-Homology 2), différents partenaires protéiques médiateurs de la réponse cellulaire (Himanen *et coll.*, 2003). Comme les récepteurs Eph interagissent avec des ligands non-diffusibles ancrés à la membrane plasmique, la réponse cellulaire médiée par ces récepteurs est non seulement fonction du degré de regroupement des récepteurs mais également de la concentration des ligands sur la membrane cellulaire opposée (Davis *et coll.*, 1994). La principale famille de médiateurs de la signalisation cellulaire des récepteurs Eph, décrite dans la figure VI, est la famille des GTPases Rho, comprenant RhoA, Cdc42 et Rac (Figure VI, a) (Noren et Pasquale, 2004). Ces GTPases fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires en passant d'un état lié au GDP à un état lié au GTP, conformation dans laquelle elles peuvent lier d'autres protéines effectrices. Leur activation est régulée par des facteurs d'échange du nucléotide guanine (GEFs) (Figure VI, b et c). Parmi ceux-ci, on peut citer l'éphexin1 (Eph-interacting exchange protein 1), Vav2 et Tiam1 impliqués dans le guidage axonal (Shamah *et coll.*, 2001 ; Cowan *et coll.*, 2005 ; Tanaka *et coll.*, 2004). Ainsi, l'éphexine1 lie de manière constitutive un récepteur EphA quel que soit l'état de ce récepteur (Figure VI, b) (Shamah *et coll.*, 2001) tandis que Vav2 lie indifféremment des récepteurs EphA ou EphB activés via SH2 (Cowan *et coll.*, 2005) (Figure VI, b et c). La présence ou non du ligand sur le récepteur Eph entraîne ainsi différentes réponses cellulaires sur le

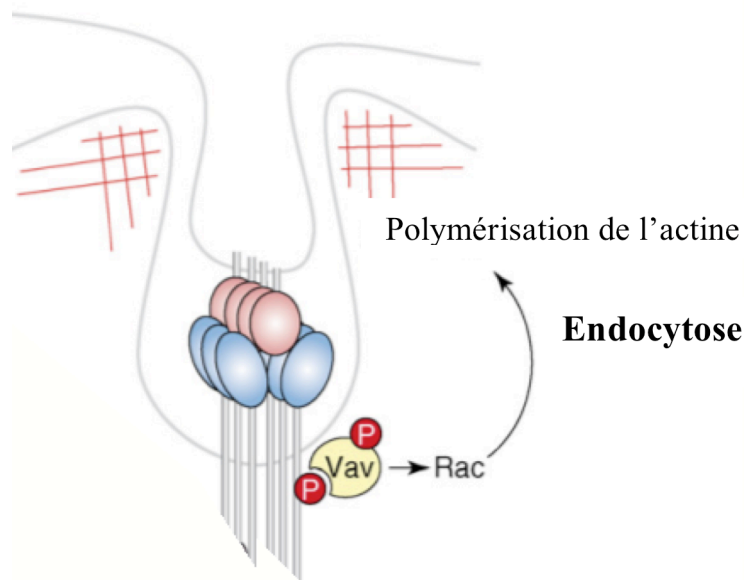


Figure VII – Schéma modélisant l'endocytose du complexe ligand/récepteur. L'activation des protéines Vav induit, via Rac, la polymérisation de l'actine au voisinage des récepteurs, entraînant l'endocytose de ceux-ci. (Modifiée d'après Egea et Klein, 2007)

cytosquelette : en l'absence de liaison éphrine/Eph, l'éphexine1 équilibre la balance de l'activité GTPasique dans le cône de croissance en activant à la fois Cdc42, Rac et RhoA, ce qui entraîne la croissance du cône. Lorsque le récepteur EphA est lié à son ligand, l'éphexine1 nouvellement phosphorylée, n'active plus que RhoA, ce qui conduit à la polymérisation de l'actine et un collapsus du cône (Figure VI, b). Les récepteurs EphB interagissent aussi avec d'autres GEFs, notamment l'intersectine (Irie et Yamaguchi, 2004) et la kalirine (Penzes *et coll.*, 2001) impliqués dans la morphogenèse des épines dendritiques (Figure VI, c). D'autres médiateurs cellulaires peuvent être également activés pour moduler la polymérisation de l'actine. C'est le cas de SHEP1 (SH2 domain-containing Eph receptor-binding protein 1) (Figure VI, d) qui lie R-Ras et Rap1A de la famille des Ras GTPases (Dodelet *et coll.*, 1999) et forme un complexe stable avec la protéine d'échafaudage Cas (Crk-associated substrate) (Dail *et coll.*, 2004). Il a ainsi été montré, par exemple, que l'activation du récepteur EphB2 inhibe l'interaction entre SHEP1 et Cas et module ainsi la migration cellulaire (Dail *et coll.*, 2004). Les récepteurs EphB peuvent aussi s'associer au syndécan-2 (Figure VI, e) également impliqué dans la morphogenèse des épines dendritiques, ou à la p120-RasGAP, inhibant ainsi la voie des Ras-MAPK impliqués dans la croissance axonale et l'adhérence cellulaire (Elowe *et coll.*, 2001). Enfin, via leur domaine PDZ, les récepteurs Eph interagissent avec différentes protéines d'échafaudage comme GRIP (glutamate receptor interacting protein), PICK1 (protein interacting with C-kinase) et AF-6 impliqués dans la formation et la plasticité des synapses (Figure VI, f) (Brückner *et coll.*, 1999 ; Hock *et coll.*, 1998 ; Hoogenraad *et coll.*, 2005 ; Torres *et coll.*, 1998). Parallèlement, Vav2 peut activer Rac et induire une polymérisation de l'actine entraînant la *trans*-endocytose du complexe éphrine/Eph dans l'une et l'autre des cellules exprimant l'éphrine et l'Eph, comme décrit dans la figure VII, entraînant le détachement des deux cellules. De plus, il a été montré que la signalisation directe médiée par les EphA pouvait être inhibée par leur interaction en *cis* avec des éphrines-

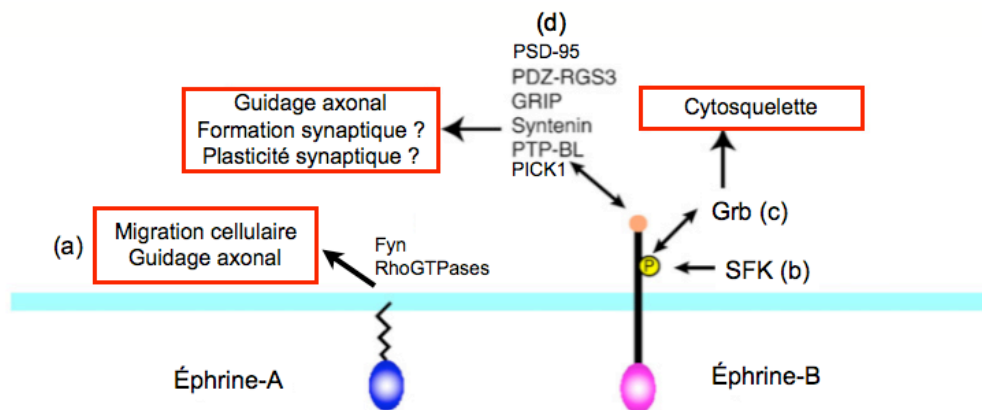


Figure VIII – Schéma récapitulatif des interactions impliquées dans la signalisation inverse. Les lignes fléchées continues indiquent les interactions vérifiées tandis que les lignes fléchées discontinues indiquent les interactions probables. La signalisation inverse médiée par les éphrines-A est impliquée dans la migration cellulaire et dans le guidage axonal, via l'activation de protéines RhoGTPases et de la protéine kinase Fyn (a). La phosphorylation des éphrines-B par les protéines SFKs (b) entraîne le recrutement de Grb (c), une protéine d'échafaudage qui altère le cytosquelette de l'actine, et d'une phosphotyrosine phosphatase (PTP-BL) (d) via le domaine PDZ. Cette molécule serait impliquée dans le guidage axonal. Les protéines GRIP, syntenin, PSD-95, PICK1 et PDZ-RGS-3 se lient au domaine PDZ des éphrines-B de façon indépendante de leur état de phosphorylation et seraient impliquées dans le guidage axonal, la formation des synapses et la plasticité (d). (Modifiée d'après Aoto et Chen, 2007)

A. Cette interaction, décrite précédemment dans le paragraphe II. 2. a. et la figure IV, prévient de nouvelles interactions en *trans* avec d'autres éphrines-A. Ceci régulerait ainsi la sensibilité des récepteurs EphA aux éphrines-A de l'environnement (Yin *et coll.*, 2004). À titre d'exemple, Carvalho *et coll.* (2006) ont montré que la liaison du ligand éphrine-A5 sur le récepteur EphA3, exprimés par le même axone rétinien, abolit l'induction de la phosphorylation des résidus tyrosine du récepteur EphA3 et résulte en sa perte d'affinité en *trans* pour d'autres ligands éphrines-A exprimés sur des cellules adjacentes.

- Voies de signalisation inverse via les ligands éphrines

Les éphrines sont également capables de transduire un signal au sein de la cellule qui les exprime : il s'agit de la signalisation inverse.

Bien que les éphrines-A, protéines ancrées à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol, ne possèdent pas de domaines intra-cytoplasmiques, leur interaction avec les récepteurs Eph induit une signalisation inverse. Celle-ci est notamment impliquée dans la migration cellulaire et dans le guidage axonal, via l'activation de protéines RhoGTPases et de la protéine kinase Fyn (Figure VIII, a) (Davy *et coll.*, 1999).

La signalisation inverse médiée par les éphrines-B est mieux connue. L'activation des éphrines-B, après liaison à un récepteur Eph, conduit à la phosphorylation de leurs résidus tyrosine par Src et Fyn, deux protéines membres de la famille des SFK (Figure VIII, b) (Georgakopoulos *et coll.*, 2006 ; Palmer *et coll.*, 2002). Leur phosphorylation entraîne le recrutement de Grb4 (Figure VIII, c), une protéine d'échafaudage qui altère le cytosquelette de l'actine via le recrutement et l'activation de la protéine kinase d'adhérence focale, FAK (Cowan and Henkemeyer, 2001). Cette phosphorylation par les SFK peut également entraîner le recrutement, via le domaine PDZ, d'une phosphotyrosine phosphatase, PTP-BL, qui serait impliquée dans le guidage axonal (Figure VIII, d) (Palmer *et coll.*, 2002). En plus de PTP-BL,

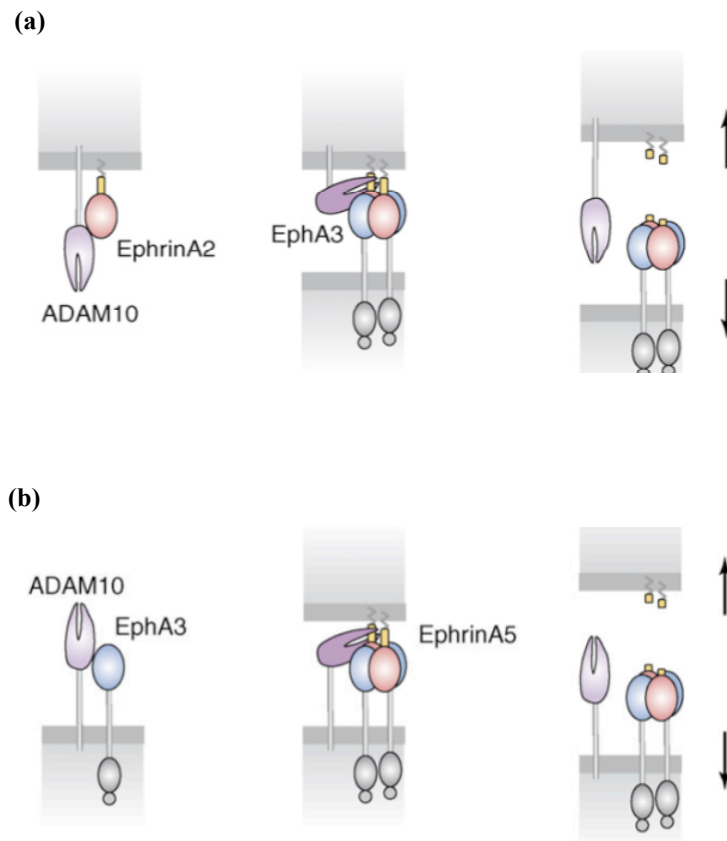


Figure IX – Mécanisme de répulsion par clivage protéolytique lors de l'interaction d'EphA3 avec ses ligands éphrine-A2 ou éphrine-A5. La métalloprotéase ADAM10 exprimée par la cellule exprimant soit le ligand (a) ou le récepteur (b) clive le segment extracellulaire des ligands permettant le détachement des deux cellules. (Modifiée d'après Egea et Klein, 2007)

d'autres protéines peuvent se lier au domaine PDZ des éphrines-B. C'est le cas des protéines GRIP, syntenin, PSD-95, PICK1 et PDZ-RGS-3 (Figure VIII, d). Les éphrines-B interagissent avec ces dernières de manière constitutive et indépendamment de leur état de phosphorylation. (Brückner *et coll.*, 1999 ; Kullander et Klein, 2002 ; Lu *et coll.*, 2001 ; Meyer *et coll.*, 2004 ; Torres *et coll.*, 1998).

c. Mécanismes de répulsion ou d'adhérence

L'interaction éphrine/Eph est une liaison de haute affinité. On s'attendrait donc à ce qu'elle conduise à une forte adhérence entre les deux cellules exprimant respectivement le ligand et le récepteur. Or, généralement, elle conduit à une répulsion. Un mécanisme impliquant un clivage protéolytique des domaines extracellulaires a été décrit lors des interactions de EphA3 avec éphrine-A2 et éphrine-A5 pour expliquer cette répulsion cellulaire (Hattori *et coll.*, 2000 ; Janes *et coll.*, 2005). Ainsi, la A-Disintegrin-And-Metalloprotease (ADAM)10, exprimée à proximité du ligand éphrine-A2, exerce une action protéolytique sur son domaine extracellulaire lors de son interaction avec le récepteur EphA3 (Figure IX, a). Exprimée à proximité du récepteur EphA3, ADAM10 exerce son action protéolytique sur le domaine extracellulaire d'éphrine-A5 lors de l'interaction éphrine-A5/EphA3 (Figure IX, b). Ces protéolyses des domaines extracellulaires du ligand éphrine-A sont suivies par l'internalisation du complexe par endocytose dans la cellule exprimant le récepteur et conduit à une répulsion cellulaire. Un autre mécanisme décrit une internalisation rapide des complexes éphrines/Eph par les deux cellules par *trans*-endocytose, concernant notamment les complexes éphrines-B/EphB (Marston *et coll.*, 2003 ; Zimmer *et coll.*, 2003). L'interaction ligand/récepteur induit la polymérisation de l'actine qui entraîne la formation d'une vésicule d'endocytose autour du complexe dans l'une ou l'autre des cellules exprimant

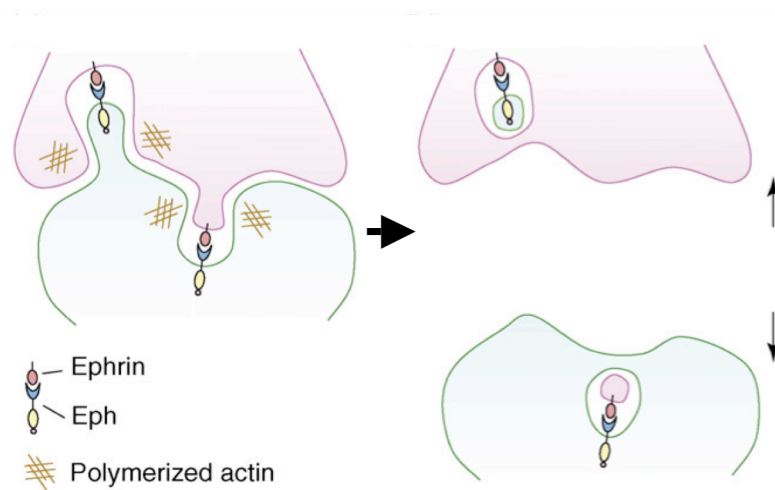


Figure X – Trans-endocytose bidirectionnelle des complexes éphrine/Eph. La polymérisation de l'actine induite par l'interaction ligand/récepteur entraîne la formation d'une vésicule d'endocytose autour du complexe dans l'une ou l'autre des cellules exprimant le récepteur ou le ligand, rompant ainsi l'adhérence entre elles et entraînant une répulsion (D'après Egea et Klein, 2007)

le récepteur ou le ligand, rompant ainsi l'adhérence entre elles et entraînant une répulsion entre les deux cellules (Figure X).

L'interaction éphrines/Eph peut également médier une adhérence entre deux cellules, étant donné qu'elle peut réguler l'activité de molécules d'adhérence comme, par exemple, les cadhérines (Zantek *et coll.*, 1999 ; Orsulic *et coll.*, 2000) et les intégrines. Ainsi l'activation des éphrine-A2 et A5 entraîne une signalisation intracellulaire inverse conduisant au regroupement d'intégrines- $\beta 1$ via un mécanisme dépendant des protéines SRK (Davy et Robbins., 2000 ; Huai et Drescher, 2001). Via la signalisation directe, EphB1 régule également l'adhérence cellulaire en fonction de la densité de ligands éphrines-B1 présents sur la cellule opposée, via l'activation des intégrines $\alpha \nu \beta 1$ et $\alpha 5 \beta 3$ (Huynh-Do *et coll.*, 1999). De même, Woo *et coll.* (2009) ont récemment montré que l'éphrine-A1, exprimé par les neurones rétiniens, inhibe leur croissance en stabilisant leurs adhérences cellulaires via l'activation de la kinase d'adhérence focale, FAK, médiée par des protéines src et des intégrines. Zimmer *et coll.* (2007) ont quant à eux mis en évidence l'implication de l'activation/inhibition des protéines de signalisation SFK via éphrine-A5 dans le basculement des propriétés de motilité des neurones corticaux vers des propriétés d'adhérence (Zimmer *et coll.*, 2007). La nature du variant génétique des récepteurs pourrait également être impliquée dans la nature de la réponse cellulaire induite, Holmberg *et coll.* (2000) ayant montré que l'interaction d'éphrine-A5 avec le variant génétique du récepteur EphA7 tronqué au niveau du domaine kinase induit l'adhérence entre les cellules des crêtes neurales, participant ainsi à la fermeture du tube neural pendant la neurulation.

3. Résumé des rôles des éphrines et de leurs récepteurs Eph durant le développement embryonnaire et postnatal chez le rongeur

Les éphrines et leurs récepteurs Eph sont impliqués dans de nombreux processus développementaux au sein du système nerveux, comme la morphogénèse et plus particulièrement la segmentation du rhombencéphale, la migration cellulaire, la prolifération, l'apoptose et le guidage axonal dont la mise en place des projections topographiques. Les paragraphes suivants détaillent plusieurs exemples de cette diversité fonctionnelle.

a. Morphogénèse et migration cellulaire précoce

La segmentation du rhombencéphale est un mécanisme développemental majeur du système nerveux puisque c'est à partir des sept rhombomères issus de cette segmentation, que sont générés les nerfs crâniens. Chaque rhombomère présente une identité moléculaire et neuroanatomique distincte. Le maintien des limites physiques de chaque rhombomère est déterminé par l'expression complémentaire d'éphrines et de leurs récepteurs Eph. Ainsi, les rhombomères impairs r3 et r5 expriment le récepteur Eph4 tandis que les rhombomères paires r2, r4 et r6 expriment le ligand éphrine-B2. L'interaction bidirectionnelle répulsive EphA4/éphrine-B2 permet de maintenir les frontières entre les rhombomères. (Xu *et coll.*, 1999 ; Cooke *et coll.*, 2001).

La migration cellulaire pendant la morphogénèse est contrôlée par différents facteurs à courte ou longue distance, comme c'est le cas des cellules des crêtes neurales. La migration de ces cellules du tube neural conduit à la formation du système nerveux périphérique produisant les neurones et les cellules gliales des systèmes nerveux sympathique, parasympathique et sensoriel. Plusieurs études ont montré l'implication des éphrines/Eph dans leur migration, notamment les éphrines-B1 et B2 (Davy *et coll.*, 2004, 2006 ; Davy *et*

Soriano, 2007), et les éphrine-A5 et EphA4 (McLennan et Krull, 2002). Ainsi, les cellules des crêtes neurales exprimant EphA4 sont repoussées *in vitro* par les éphrines-A2 et A5. Ces interactions répulsives participeraient à l'organisation segmentaire de ces cellules du tube neural.

b. Régulation de la prolifération et de l'apoptose

La régulation de la prolifération, de la survie et de l'apoptose des progéniteurs neuronaux permet de contrôler le nombre de nouveaux neurones dans le cerveau. Il a été montré que les signalisations éphrines/Eph participent à cette régulation. Ainsi, chez l'adulte, au niveau des ventricules latéraux, la signalisation inverse via éphrine-B2 conduit à une régulation négative de la prolifération des progéniteurs neuronaux : l'inhibition de cette signalisation entraîne une prolifération (Holmberg *et coll.*, 2005). Il a également été montré, chez l'embryon, que la perte de fonction du récepteur EphA7 entraîne une diminution du niveau normal d'apoptose des progéniteurs neuronaux du prosencéphale, résultant en l'augmentation de la taille du cortex. La signalisation directe via EphA7, suite à son interaction avec éphrine-A5, conduirait en effet à l'apoptose des progéniteurs corticaux (Depaepe *et coll.*, 2005). Récemment North *et coll.* (2009) ont également suggéré que l'interaction EphA4/éphrine-B1, toutes deux exprimées par les progéniteurs corticaux, assurerait leur prolifération. L'interaction d'éphrines avec d'autres molécules que celles de la famille des éphrines/Eph pourrait également agir sur la prolifération cellulaire des progéniteurs corticaux : Wu *et coll.* (2009) ont en effet récemment montré que le domaine cytoplasmique d'éphrine-B1 peut être transloqué dans le noyau et interagir avec la protéine à doigts de zinc et à homéodomaine2, ZHX2, pour moduler son activité de répresseur transcriptionnel, conduisant au maintien du nombre de progéniteurs neuronaux.

c. Guidage axonal et ligne médiane

La ligne médiane est un carrefour majeur de la trajectoire des axones. Les cônes de croissance axonaux doivent choisir de traverser ou non cette ligne, puis la route à emprunter pour rejoindre leur cible. C'est le cas au niveau de la ligne médiane ventrale, du chiasma optique et de la commissure antérieure. Plusieurs études ont décrit l'implication des éphrines/Eph, parmi d'autres molécules de guidage comme, par exemple, les nétrines et les sémaphorines (*pour revue*, Plachez et Richards, 2005). **Le tractus corticospinal** connecte le néocortex avec les motoneurons de la moelle spinale. Il croise la ligne médiane au niveau de la jonction encéphale/moelle épinière. Plus loin dans la moelle spinale, l'expression d'éphrine-B3 au niveau de la ligne médiane repousse les neurones de ce tractus exprimant le récepteur EphA4, évitant ainsi que le tractus croise à nouveau (Dottori *et coll.*, 1998, Kullander *et coll.*, 2001a et b ; Kullander et Klein, 2002 ; Palmer et Klein, 2003). **Au niveau du chiasma optique**, une partie des cellules ganglionnaires de la rétine traversent la ligne médiane vers le côté controlatéral, tandis que le reste de la population continue sa trajectoire sur le côté ipsilatéral. Différentes molécules de guidage axonal ont été découvertes au niveau du chiasma. Parmi elles, éphrine-B2, exprimée par des cellules gliales présentes au niveau de la ligne médiane, joue un rôle crucial : son interaction avec le récepteur EphB1 permet de maintenir la trajectoire ipsilatérale des cellules ganglionnaires de la rétine exprimant ce récepteur, en les repoussant (Williams *et coll.*, 2003). **Les commissures interhémisphériques**, le corps calleux et la commissure antérieure, expriment également plusieurs membres de la famille des éphrines/Eph. Plusieurs études ont suggéré que EphB1, B2 et B3 et EphA4 et A5 ainsi que leurs ligands éphrine-B1, B2 et B3 sont impliqués dans la formation du corps calleux. Les altérations de la morphogenèse de ces commissures, de l'hypoplasie légère à l'agénésie, sont moins sévères chez les animaux dont seul un gène a été invalidé en

comparaison de ceux dont deux gènes ont été invalidés, suggérant des compensations entre les éphrines et les Eph (Hu *et coll.*, 2003 ; Mendes *et coll.*, 2006).

d. Établissement des cartes topographiques

Une carte topographique est un ensemble ordonné de connexions pour lesquelles les relations spatiales entre les neurones afférents sont conservées entre les neurones efférents. Comme proposé par la théorie de Roger Sperry en 1963, les gradients d'éphrines/Eph participent à la formation des connexions neuronales et l'établissement de cartes topographiques. C'est l'une des plus importantes familles de molécules de guidage axonal impliquées dans l'établissement des cartes topographiques des systèmes rétino-tectal, olfactif central, olfactif voméronasal et thalamocortical. **Dans le système rétino-tectal**, les axones des cellules ganglionnaires de la rétine projettent vers les centres visuels primaires : le noyau géniculé du thalamus et le colliculus. L'établissement de ces connexions aboutit à la formation d'une carte topographique de la rétine au sein des structures cibles. Le noyau géniculé dorso-latéral est le premier relais thalamique des projections des cellules ganglionnaires de la rétine. Les éphrines-A2, A3 et A5 sont exprimées en gradient dans ce noyau et participent à la formation de la carte topographique (Feldheim *et coll.*, 1998 ; Ellsworth *et coll.*, 2005). Au niveau du cortex visuel également, éphrine-A2, A3 et A5 contrôlent la formation de l'aire visuelle primaire V1. En leur absence, la carte topographique apparaît désorganisée : les axones provenant du noyau géniculé dorso-latéral se projettent de façon erronée sur l'aire visuelle primaire V1 (Cang *et coll.*, 2005). Au plan phénotypique, cette perte de fonction du gène éphrine-A5 entraîne également une désorganisation topographique de la représentation du corps au niveau du cortex somatosensoriel S1 (Vanderhaeghen *et coll.*, 2000). De la même manière que dans le noyau géniculé du thalamus, les récepteurs Eph et leurs ligands, les éphrines, sont respectivement exprimés en gradient dans la rétine et le colliculus. Les

récepteurs EphA4, A5 et A6 sont exprimés dans la rétine selon un gradient décroissant temporo-nasal tandis que les ligands éphrines-A2 et A5 sont exprimés selon un gradient croissant antéro-postérieur dans le colliculus supérieur (Drescher *et coll.*, 1995 ; Cheng *et coll.*, 1995 ; Monschau *et coll.*, 1997). Les axones rétiniens exprimant des niveaux élevés de récepteurs Eph projettent ainsi, par un jeu de répulsions, vers la région du colliculus exprimant les plus faibles niveaux d'éphrines-A2 et A5, tandis que les axones rétiniens exprimant peu de récepteurs établissent des connexions avec les régions du colliculus où les éphrines-A2 et A5 sont le plus fortement exprimées (Lemke et Reber, 2005 ; McLaughlin et O'Leary, 2005). Il a également été montré que la forte expression d'éphrine-A2 et A5 dans le tectum postérieur participe à la mise en place des connexions topographiques rétinoectales, par répulsion des axones des neurones ganglionnaires de la rétine temporale exprimant le récepteur EphA3 (Nakamoto *et coll.*, 1996 ; Connor *et coll.*, 1998 ; Ciossek *et coll.*, 1998). *In vivo*, éphrine-A5 a par ailleurs été identifiée comme indispensable au guidage correct de ces connexions, puisque chez la souris mutante pour éphrine-A5, les projections rétinoectales dépassent leur cible correcte, le colliculus supérieur, et connectent le colliculus inférieur de façon aberrante (Frisen *et coll.*, 1998). Les doubles mutants pour lesquels les gènes codant pour éphrines-A2 et A5 ont été invalidés, présentent de manière plus sévère des anomalies de la cartographie antéro-postérieure et dorso-ventrale (Feldheim *et coll.*, 2000). **Dans le système olfactif central**, les éphrines/Eph ne sont pas exprimés en gradient, mais présentent un patron d'expression complexe. Les neurones sensoriels exprimant un récepteur olfactif donné expriment les récepteurs EphA4 et A5 et les ligands éphrines-A3 et A5. Ils projettent vers un glomérule spécifique du bulbe olfactif, exprimant lui-même les récepteurs EphA5 et A7 et les ligands éphrines-A2 et A4 (St John *et coll.*, 2002). Les neurones sensoriels exprimant plusieurs récepteurs olfactifs présentent quant à eux, différents niveaux d'expression d'éphrines-A. Des altérations dans les niveaux d'expression de ces éphrines conduisent, chez

la souris, à une perturbation de la carte topographique glomérulaire, démontrant ainsi le rôle des éphrines-A dans le guidage axonal des neurones sensoriels olfactifs (Cutforth *et coll.*, 2003). **Dans le système olfactif voméronasal**, éphrine-A5 est exprimée dans l'organe voméronasal en gradient croissant, du basal vers l'apical, tandis que le récepteur EphA6 est présent selon un gradient croissant postéro-antérieur dans le bulbe olfactif accessoire. Les neurones olfactifs provenant de l'organe voméronasal projettent sur le bulbe olfactif accessoire en fonction de la quantité de ligands qu'ils expriment : ceux qui expriment une forte quantité de ligands sont guidés vers les régions du bulbe olfactif accessoire présentant un fort niveau d'expression de récepteur. Le mécanisme de guidage consiste donc ici, non pas en une répulsion, mais en une attraction ligand/récepteur (Knöll *et coll.*, 2001b). **Dans le système thalamocortical**, l'action répulsive des éphrines a également été mise en évidence dans l'établissement des connexions issues du thalamus, principal relais des afférences sensorielles, vers le cortex. Les projections thalamiques présentent une organisation topographique spécifique, comme la carte somatosensorielle, représentation de la surface du corps au sein du cortex. Le thalamus exprime les récepteurs EphA3, A4 et A7 dans sa partie dorsale tandis que le ligand éphrine-A5 est présent dans le télencéphale ventral, cible intermédiaire des projections thalamocorticales, et dans le cortex. Lors de la projection d'axones thalamiques vers le cortex, les axones exprimant une forte quantité de récepteurs EphA4 à leur surface sont repoussés par les territoires corticaux présentant une forte expression d'éphrine-A5 et se connectent aux territoires où le ligand répulsif est exprimé en plus faible quantité. À l'inverse, les axones thalamiques présentant peu de récepteurs EphA4 à leur surface se connectent aux régions corticales où éphrine-A5 est plus abondamment exprimée. L'invalidation des gènes codants pour éphrine-A5 et le récepteur EphA4 chez la souris entraîne une désorganisation de ces projections : les projections thalamocorticales étendent des connexions ectopiques dans le cortex plus médialement qu'elles ne devraient. De

même chez le rongeur éphrine-A5 *-/-*, les tonneaux corticaux, représentations corticales du territoire innervé par une vibrisse individuelle, se superposent anormalement (Vanderhaeghen *et coll.*, 2000 ; Prakash *et coll.*, 2000 ; Dufour *et coll.*, 2003, Miller *et coll.*, 2006). Un défaut d'expression du récepteur EphA7 dans le cortex somatosensoriel perturbe, pour sa part, l'organisation topographique des projections corticothalamiques dans le thalamus bien que les projections thalamocorticales soient normales (Torii et Levitt, 2005). Ceci suggère que la signalisation EphA/éphrine-A contrôle de manière indépendante l'organisation des deux types de projections. Il a été également montré que éphrine-A5 exprimée dans le cortex somatosensoriel repousse les axones issus des territoires limbiques du thalamus exprimant EphA5 (Gao *et coll.*, 1998 ; Uziel *et coll.*, 2002) : les neurones issus du thalamus médian exprimant EphA5 sont repoussés par l'expression d'éphrine-A5 dans le cortex sensorimoteur et se connectent ainsi sur le cortex cingulaire, au contraire des neurones issus du thalamus latéral. Chez la souris mutante pour éphrine-A5, une partie des neurones issus du thalamus médian projettent anormalement vers le cortex sensorimoteur. Ephrine-B3 contribue, pour sa part, à la sortie des projections limbiques néocorticales via son interaction répulsive avec le récepteur EphA4 exprimé par les axones issus du thalamus latéral (Takemoto *et coll.*, 2002). L'interaction éphrine-A5/EphA5 jouerait également un rôle dans le guidage des axones thalamiques au niveau de leur couche corticale cible, la couche IV. (Mann *et coll.*, 2002).

4. Une éphrine de la sous-classe A : éphrine-A5

L'éphrine-A5 est une des molécules de guidage les plus impliquées dans la mise en place de la connectivité du système nerveux central. C'est pourquoi notre étude s'est plus particulièrement focalisée sur cette protéine.

Tableau II – Localisation de l’expression de l’ARNm codant pour éphrine-A5 (en noir) et de la protéine (en bleu) au cours du développement embryonnaire du rongeur. MGE : éminence ganglionnaire médiane ; LGE : éminence ganglionnaire latérale ; CP : plaque corticale ; SVZ : zone sous-ventriculaire ; IZ : zone intermédiaire.

STADE	REGIONS	REFERENCES
E11.5	- Télocéphale - Mésencéphale	<i>Nomura et coll., 2006</i> <i>Cheng et Flanagan, 1994</i>
E12.5	Télocéphale : - nerf voméronasal - organe voméronasal - épithélium olfactif principal - mésenchyme olfactif - striatum - zone ventriculaire de la LGE et de la MGE - cortex	<i>Knöll et coll., 2001</i> <i>Knöll et coll., 2001</i> <i>Knöll et coll., 2001</i> <i>Knöll et coll., 2001</i> <i>Passante et coll., 2008</i> <i>Passante et coll., 2008</i> <i>Donoghue et coll., 1996</i>
E14.5	Télocéphale : - LGE - zone ventriculaire de la LGE et MGE Diencéphale : - noyaux géniculés latéraux dorsal et ventral du thalamus	<i>Dufour et coll., 2003 ; Passante et coll., 2008</i> <i>Zimmer et coll., 2008</i> <i>Feldheim et coll., 1998</i>
E15.5	Télocéphale : - organe voméronasal - mésenchyme olfactif - LGE et MGE Diencéphale : - hypothalamus Mésencéphale : - colliculi inférieur et supérieur - tegmentum	<i>Knöll et coll., 2001</i> <i>Knöll et coll., 2001</i> <i>Passante et coll., 2008</i> <i>Donoghue et coll., 1996</i> <i>Donoghue et coll., 1996</i> <i>Donoghue et coll., 1996</i>
E16.5	Télocéphale : - couches de fibres nerveuses entourant le bulbe olfactif - axones du nerf primaire olfactif - striatum - zone ventriculaire de la LGE et de la MGE - CP et SVZ du cortex sensorimoteur S1 - CP des cortex sensorimoteur S2, moteur M1 et visuel V1 - cortex auditif primaire Diencéphale : - noyau ventro-basal du thalamus Mésencéphale : - noyau prétectal - colliculi inférieur et supérieur - tectum	<i>St John et coll., 2002</i> <i>St John et coll., 2002</i> <i>Passante et coll., 2008</i> <i>Zimmer et coll., 2008</i> <i>Castellani et coll., 1998 ; Gao et coll., 1998</i> <i>Bolz et coll., 2004</i> <i>Vanderhaeghen et coll., 2000</i> <i>Uziel et coll., 2006</i> <i>Feldheim et coll., 1998</i> <i>Donoghue et coll., 1996; Feldheim et coll., 1998</i> <i>Zhang et coll., 1996</i>
E18.5	Télocéphale : - striatum - CP, IZ et couche IV du cortex sensorimoteur - CP des cortex S1, S2, M1 et V1 - cortex auditif primaire Diencéphale : - noyau géniculé dorso-latéral du thalamus - noyau ventro-postérieur du thalamus Mésencéphale : - colliculus inférieur	<i>Cooper et coll., 2008</i> <i>Castellani et coll., 1998, Gao et coll., 1998</i> <i>Bolz et coll., 2004</i> <i>Vanderhaeghen et coll., 2000</i> <i>Feldheim et coll., 1998, Bolz et coll., 2004</i> <i>Bolz et coll., 2004</i> <i>Feldheim et coll., 1998</i>

a. Généralités et aspect structurel

Ephrine-A5 a été isolée à partir d'une lignée cellulaire de carcinome du poumon et est exprimée à la fois dans le système nerveux et dans des tissus non-neuronaux. Protéine de la sous-classe des éphrines-A, elle est constituée uniquement d'un domaine extracellulaire ancré dans la membrane par un glycosylphosphatidylinositol. Dénommée AL-1 et LERK-7 chez l'humain ou RAGS chez le poulet et finalement éphrine-A5 (Lemke, 1997 ; Flanagan et Vanderhaeghen, 1998), c'est une protéine de taille estimée à environ 25kDa (Cheng *et coll.*, 1995) et qui possède des homologies de séquence avec éphrine-A2. Ephrine-A5 lie les récepteurs EphA3 (Carvalho *et coll.*, 2006 ; Otal *et coll.*, 2006), EphA4 (Eberhart *et coll.*, 2000, 2004), EphA5 (Feldheim *et coll.*, 1998), EphA7 (Miller *et coll.*, 2006) et EphB2, avec une plus faible affinité (Himanen *et coll.*, 2004).

b. Patron d'expression d'éphrine-A5 durant le développement du système nerveux central

Le profil d'expression de l'ARNm codant pour éphrine-A5 a été particulièrement bien étudié dans le système nerveux central, au cours du développement embryonnaire (Tableau II) et postnatal (Tableau III). Chez la souris, l'ARNm codant pour éphrine-A5 est fortement exprimé dans le mésencéphale et de manière moins importante dans le rhombencéphale dès l'organogenèse précoce (Cheng et Flanagan, 1994).

L'expression d'éphrine-A5 au cours du développement est assez complexe car elle n'est pas homogène. Elle présente une évolution spatio-temporelle dynamique en fonction des régions et du stade de développement et se présente souvent en gradient. C'est le télencéphale qui présente le marquage le plus étendu. Chez le rat, entre E11 et E17, l'intensité de l'expression de l'ARNm est plus importante dans le télencéphale antérieur et diminue vers les régions postérieures, à la fois dans la partie ventrale du télencéphale (neuroépithélium des

Tableau III – Localisation de l'expression de l'ARNm codant pour éphrine-A5 (en noir) et de la protéine (en bleu) au cours du développement postnatal du rongeur. MGE : éminence ganglionnaire médiane ; LGE : éminence ganglionnaire latérale ; CP : plaque corticale ; SVZ : zone sous-ventriculaire ; IZ : zone intermédiaire.

STADE	REGIONS	REFERENCES
P0	<p>Télocéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - striatum - couches IV et VI du cortex sensorimoteur - cortex visuel - cortex primaire auditif - hippocampe et gyrus denté <p>Diencéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - thalamus médian 	<p><i>Passante et coll., 2008</i> <i>Gao et coll., 1998</i> <i>Vanderhaeghen et coll., 2000</i> <i>Vanderhaeghen et coll., 2000</i> <i>Otal et coll., 2006</i></p> <p><i>Gao et coll., 1998</i></p>
P1	<p>Télocéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - organe voméronasal - cellules mitrales et touffues du bulbe olfactif accessoire - glomérules olfactifs - axones des neurones sensoriels du système olfactif accessoire - faisceaux issus du bulbe olfactif - couche de fibres nerveuses olfactives <p>- striatum</p> <ul style="list-style-type: none"> - CP, couches IV et VI des cortex sensorimoteurs S1 et S2, - CP et couche V des cortex moteur M1 et auditif 	<p><i>Knöll et coll., 2001</i> <i>Knöll et coll., 2001</i> <i>St John et coll., 2002</i> <i>St John et coll., 2002</i></p> <p><i>St John et coll., 2002</i> <i>St John et coll., 2002</i> <i>Passante et coll., 2008</i> <i>Gao et coll., 1998 ; Vanderheaghen et coll., 2000</i> <i>Vanderheaghen et coll., 2000</i></p>
P2	<p>Télocéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - striatum - couches IV et VI du cortex sensorimoteur - cellules pyramidales du CA de l'hippocampe <p>Diencéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - noyau géniculé ventro-latéral du thalamus <p>Mésencéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - colliculus inférieur 	<p><i>Passante et coll., 2008</i> <i>Gao et coll., 1998</i> <i>Stein et coll., 1999</i></p> <p><i>Feldheim et coll., 1998</i></p> <p><i>Feldheim et coll., 1998</i></p>
P3	<p>Télocéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - épithélium olfactif des neurones sensoriels matures et immatures - Striatum - couches IV et VI du cortex sensorimoteur 	<p><i>Cutforth et coll., 2003</i> <i>Passante et coll., 2008</i> <i>Gao et coll., 1998 ; Vanderhaeghen et coll., 2000</i></p>
P4	<p>Télocéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - striatum <p>Diencéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - noyau géniculé dorso-latéral 	<p><i>Passante et coll., 2008</i></p> <p><i>Cang et coll., 2005</i></p>
P5	<p>Télocéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - glomérules olfactifs - axones des neurones sensoriels du système olfactif accessoire - faisceaux issus du bulbe - couche de fibres nerveuses 	<p><i>St John et coll., 2002</i> <i>St John et coll., 2002</i></p> <p><i>St John et coll., 2002</i> <i>St John et coll., 2002</i></p>
P6	<p>Télocéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - couches IV et VI du cortex sensorimoteur - couche V du cortex moteur 	<p><i>Mann et coll., 2002 ; Bolz et coll., 2004</i> <i>Mann et coll., 2002</i></p>
P7	<p>Télocéphale :</p> <ul style="list-style-type: none"> - glomérules olfactifs - axones des neurones sensoriels du système olfactif accessoire - faisceaux issus du bulbe olfactif - couche de fibres nerveuses olfactives - couche IV du cortex sensorimoteur - couches V et VI du cortex sensorimoteur - cortex auditif - cortex visuel primaire - cortex cingulaire 	<p><i>St John et coll., 2002</i> <i>St John et coll., 2002</i> <i>St John et coll., 2002</i> <i>St John et coll., 2002</i> <i>Castellani et coll., 1998</i> <i>Yabuta et coll., 2000</i> <i>Gao et coll., 1998</i> <i>Gao et coll., 1998</i> <i>Gao et coll., 1998</i></p>

ganglions de la base en développement) et dans sa partie dorsale (néocortex en développement) (Mackarehtschian *et coll.*, 1999). Globalement, ce gradient décroissant antéro-postérieur dans le télencéphale est à l'inverse de celui observé dans l'ensemble du mésencéphale (Mackarehtschian *et coll.*, 1999). Plus précisément, au sein même du cortex, du striatum, du thalamus et des colliculi, on observe également une expression graduée de l'ARNm codant pour éphrine-A5. Dans le *cortex*, l'expression de l'ARNm codant pour éphrine-A5 est détectée très tard dans l'embryogenèse. Bien que Donoghue *et coll.* (1996) l'aient décrite à E12,5, c'est à partir de E16,5 que la majorité des études s'accorde à montrer la présence d'une faible intensité d'expression du transcrite d'éphrine-A5 dans le cortex (Castellani *et coll.*, 1998 ; Gao *et coll.*, 1998 ; Bolz *et coll.*, 2004). Le patron d'expression au sein du cortex varie selon les régions et le stade de développement : de E16,5 à P1, l'aire motrice primaire et le cortex somatosensoriel présentent un gradient d'expression décroissant médio-latéral, tandis que l'aire somatosensorielle secondaire et l'aire auditive primaire présentent un gradient opposé, décroissant dans le sens latéro-médian (Vanderhaeghen *et coll.*, 2000 ; Dufour *et coll.*, 2003 ; Bolz *et coll.*, 2004). Dans l'aire visuelle primaire V1, un gradient décroissant médio-latéral est également observé entre E16,5 et E18,5 (Bolz *et coll.*, 2004), tandis qu'à P0, l'expression est très faible et plus aucun gradient n'est détecté (Vanderhaeghen *et coll.*, 2000). Enfin, il a été montré que dans le cortex sensorimoteur, la présence de l'ARNm codant pour éphrine-A5 se concentre, à E18,5, dans la couche IV, puis à partir de P0, dans les couches IV et VI. Dans le cortex moteur, l'ARNm codant pour éphrine-A5 est retrouvé dans la couche V (Castellani *et coll.*, 1998 ; Vanderhaeghen *et coll.*, 2000 ; Mann *et coll.*, 2002 ; Bolz *et coll.*, 2004). À P3, le patron discontinu observé dans le cortex sensorimoteur correspond à celui des tonneaux corticaux innervés par les neurones thalamocorticaux (Vanderhaeghen *et coll.*, 2000). À P7, l'ARNm codant pour éphrine-A5 n'est plus exprimé qu'à très faible intensité dans le cortex sensorimoteur, les aires auditives,

le cortex visuel primaire et le cortex cingulaire (Gao *et coll.*, 1998). Dans le *striatum*, le patron d'expression varie également en fonction du stade de développement étudié. Ainsi, l'ARNm codant pour éphrine-A5 est exprimé dans la zone ventriculaire des éminences ganglionnaires latérale et médiane et de manière diffuse dans le striatum, entre E12,5 et E18,5 (Passante *et coll.*, 2008). Cependant, un gradient transitoire décroissant caudo-rostral a été observé entre E13,5 et E14,5 (Dufour *et coll.*, 2003), tandis qu'à partir de E18,5, l'expression s'oriente de manière décroissante selon l'axe dorso-latéral (Cooper *et coll.*, 2008). Enfin, dès la naissance, le striatum présente une distribution de l'ARNm codant pour éphrine-A5 en patches (Passante *et coll.*, 2008). Dans le *thalamus*, Bolz *et coll.* (2004) décrivent, à E13,5, une faible expression de l'ARNm codant pour éphrine-A5 dans la zone ventriculaire du thalamus dorsal, dans sa partie caudale. À partir de E14,5, les noyaux géniculés dorso et ventro-latéraux expriment l'ARNm selon un gradient décroissant ventro-dorsal, latéro-médian et antéro-postérieur (Feldheim *et coll.*, 1998). Dans les *colliculi*, l'expression de l'ARNm codant pour éphrine-A5 est plus importante dans le colliculus inférieur et se présente selon un gradient décroissant postéro-antérieur dans le colliculus supérieur (Donoghue *et coll.*, 1996 ; Frisen *et coll.*, 1998).

Comme présenté dans les tableaux II et III, seul St John *et coll.* (2002) ont, à notre connaissance, décrit la localisation de la protéine éphrine-A5, et uniquement dans le système olfactif. En *sus* d'études de la localisation des protéines ligands éphrines-A à l'aide de protéines réceptrices Eph recombinantes couplées à l'alkaline phosphatase, Eph-AP, (Cheng et Flanagan, 1994 ; Zhang *et coll.*, 1996 ; Feldheim *et coll.*, 1998 ; Stein *et coll.*, 1999 ; Knöll *et coll.*, 2001b ; Mann *et coll.*, 2002 ; Cutforth *et coll.*, 2003 ; Cang *et coll.*, 2005), la majorité des études a concerné la localisation de l'expression de l'ARNm codant pour éphrine-A5.

c. Implication d'éphrine-A5 dans le développement de l'encéphale

Les fonctions potentielles de la protéine éphrine-A5 pendant le développement ont été principalement déduites de la localisation de son ARNm ainsi que de l'utilisation d'animaux transgéniques chez lesquels l'expression de cette molécule a été abolie. Les premières études ont identifié, en culture, l'implication de l'interaction entre astrocytes exprimant le ligand éphrine-A5 et neurones exprimant le récepteur EphA5, dans la formation des faisceaux axonaux issus de cellules corticales d'embryon de rat au stade E16,5 (Winslow *et coll.*, 1995 ; Caras, 1997). Puis éphrine-A5 fut décrite comme impliquée principalement dans les fonctions de migration cellulaire et d'apoptose, ainsi que dans la mise en place des cartes topographiques.

McLennan et Krull (2002) ont ainsi mis en évidence l'implication d'éphrine-A5 dans la migration des cellules des crêtes neurales participant ainsi à l'organisation segmentaire de ces cellules du tube neural : les cellules des crêtes neurales exprimant EphA4 sont repoussées *in vitro* par éphrine-A5. Depaepe *et coll.* (2005) ont quant à eux montré que la signalisation directe via EphA7, suite à son interaction avec éphrine-A5, conduirait à l'apoptose des progéniteurs corticaux. La mise en place des cartes topographiques constitue le processus développemental dans lequel le rôle d'éphrine-A5 est le plus important. **Dans le système rétinotectal**, éphrine-A5 est exprimée en gradient dans le noyau géniculé dorso-latéral, premier relais thalamique des projections des cellules ganglionnaires de la rétine, et participe ainsi à la formation de la carte topographique de la rétine au sein de ce noyau (Feldheim *et coll.*, 1998 ; Ellsworth *et coll.*, 2005). Au niveau du cortex visuel également, éphrine-A5 contrôle la formation de l'aire visuelle primaire V1. En son absence et celle d'éphrine-A2 et A3, la carte topographique apparaît désorganisée : les axones provenant du noyau géniculé dorso-latéral se projettent de façon erronée sur l'aire visuelle primaire V1 (Cang *et coll.*, 2005). Au plan phénotypique, cette perte de fonction du gène éphrine-A5 entraîne également

une désorganisation topographique de la représentation du corps au niveau du cortex somatosensoriel S1 (Vanderhaeghen *et coll.*, 2000). De la même manière que dans le noyau géniculé du thalamus, éphrine-A5 est également exprimée selon un gradient croissant antéro-postérieur dans le colliculus supérieur (Drescher *et coll.*, 1995 ; Cheng *et coll.*, 1995 ; Monschau *et coll.*, 1997). Les axones rétiniens exprimant des niveaux élevés de récepteurs Eph projettent ainsi, par un jeu de répulsions, vers la région du colliculus exprimant les plus faibles niveaux d'éphrine-A5, tandis que les axones rétiniens exprimant peu de récepteurs établissent des connexions avec les régions du colliculus où les éphrines-A5 sont le plus fortement exprimées (Lemke et Reber, 2005 ; McLaughlin et O'Leary, 2005). Il a également été montré que la forte expression d'éphrine-A5 dans le tectum postérieur participe à la mise en place des connexions topographiques rétino-tectales, par répulsion des axones des neurones ganglionnaires de la rétine temporale exprimant le récepteur EphA3 (Nakamoto *et coll.*, 1996 ; Connor *et coll.*, 1998 ; Ciossek *et coll.*, 1998). *In vivo*, éphrine-A5 a par ailleurs été identifiée comme indispensable au guidage correct de ces connexions, puisque chez la souris mutante pour éphrine-A5, les projections rétino-tectales dépassent leur cible correcte, le colliculus supérieur, et connectent le colliculus inférieur de façon aberrante (Frisen *et coll.*, 1998). Les doubles mutants pour lesquels les gènes codant pour éphrines-A2 et A5 ont été invalidés, présentent de manière plus sévère des anomalies de la cartographie antéro-postérieure et dorso-ventrale (Feldheim *et coll.*, 2000). **Dans le système olfactif central**, les neurones sensoriels exprimant un récepteur olfactif donné présentent les récepteurs EphA4 et A5 et les ligands éphrines-A3 et A5. Ils projettent vers un glomérule spécifique du bulbe olfactif, exprimant lui-même les récepteurs EphA5 et A7 et les ligands éphrines-A2 et A4 (St John *et coll.*, 2002). **Dans le système olfactif voméronasal**, éphrine-A5 est exprimée dans l'organe voméronasal en gradient croissant, du basal vers l'apical, tandis que le récepteur EphA6 est présent selon un gradient croissant postéro-antérieur dans le bulbe olfactif

accessoire. Les neurones olfactifs provenant de l'organe voméronasal projettent sur le bulbe olfactif accessoire en fonction de la quantité de ligands qu'ils expriment : ceux qui expriment une forte quantité de ligands sont guidés vers les régions du bulbe olfactif accessoire présentant un fort niveau d'expression de récepteur (Knöll *et coll.*, 2001b). **Dans le système thalamocortical**, le thalamus exprime le récepteur EphA4 dans sa partie dorsale tandis que le ligand éphrine-A5 est présent dans le télencéphale ventral, cible intermédiaire des projections thalamocorticales, et dans le cortex. Lors de la projection d'axones thalamiques vers le cortex, les axones exprimant une forte quantité de récepteurs EphA4 à leur surface sont repoussés par les territoires corticaux présentant une forte expression d'éphrine-A5 et se connectent aux territoires où le ligand répulsif est exprimé en plus faible quantité. À l'inverse, les axones thalamiques présentant peu de récepteurs EphA4 à leur surface se connectent aux régions corticales où éphrine-A5 est plus abondamment exprimée. L'invalidation des gènes codants pour éphrine-A5 et le récepteur EphA4 chez la souris entraîne une désorganisation de ces projections : les projections thalamocorticales étendent des connexions ectopiques dans le cortex plus médialement qu'elles ne devraient. De même, chez le rongeur éphrine-A5 *-/-*, les tonneaux corticaux, représentations corticales du territoire innervé par une vibrisse individuelle, se superposent anormalement (Vanderhaeghen *et coll.*, 2000 ; Prakash *et coll.*, 2000 ; Dufour *et coll.*, 2003 ; Miller *et coll.*, 2006). Il a été également montré qu'éphrine-A5 exprimée dans le cortex somatosensoriel repousse les axones issus des territoires limbiques du thalamus exprimant EphA5 (Gao *et coll.*, 1998 ; Uziel *et coll.*, 2002) : les neurones issus du thalamus médian exprimant EphA5 sont repoussés par l'expression d'éphrine-A5 dans le cortex sensorimoteur et se connectent ainsi sur le cortex cingulaire, au contraire des neurones issus du thalamus latéral. Chez la souris mutante pour éphrine-A5, une partie des neurones issus du thalamus médian projettent anormalement vers le cortex sensorimoteur. L'interaction

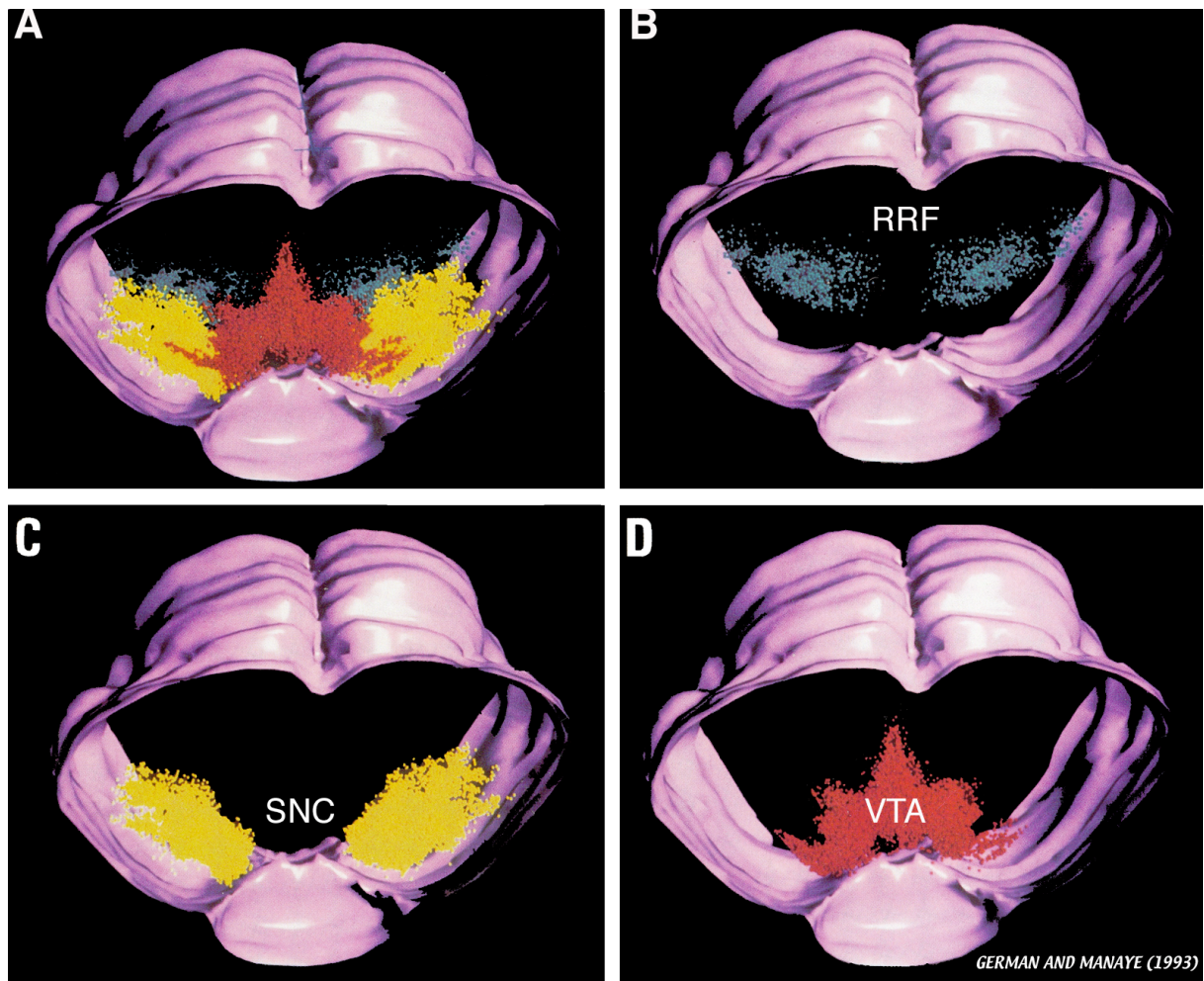


Figure XI – Représentation tridimensionnelle des noyaux dopaminergiques A8 ou aire rétrosubstantia nigra (B), A9 ou substance nigra *pars compacta* (C) et A10 ou aire tegmentale ventrale (D) chez le rat. A : vue d'ensemble des trois structures. RRF : aire rétrosubstantia nigra ; SNC : substance nigra *pars compacta* ; VTA : aire tegmentale ventrale. (D'après German et Manaye, 1993).

éphrine-A5/EphA5 jouerait également un rôle dans le guidage des axones thalamiques au niveau de leur couche corticale cible, la couche IV (Mann *et coll.*, 2002).

III. Le système dopaminergique issu du mésencéphale ventral

Mon travail de thèse a plus particulièrement concerné l'étude de l'implication d'éphrine-A5 dans la mise en place des projections dopaminergiques issues du MV vers le striatum, au cours de l'embryogenèse de la souris. Ce travail devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de réparation du système nigrostrié adulte observés lors de greffes intranigrales dans les modèles animaux de la maladie de Parkinson développés au sein de l'équipe (Gaillard *et coll.*, 2009).

1. Rappel anatomique des voies dopaminergiques issues du mésencéphale ventral chez l'adulte

Trois groupes principaux de neurones dopaminergiques, distincts anatomiquement et fonctionnellement, ont été identifiés dans le MV adulte : le champ rétrosubstantiel A8 et l'aire tegmentale ventrale (ATV) A10 en position médiane et la substance noire *pars compacta* (SNc) A9 en position latérale (Figure XI). Le nombre total de cellules dopaminergiques présentes dans l'ensemble de ces 3 groupes neuronaux bilatéraux du MV est d'environ 25000 chez la souris, 42500 chez le rat et 590000 chez l'homme (Vernier *et coll.*, 2004). Cependant, la dernière estimation stéréologique réalisée chez le rat en dénombre environ 71000 (Nair-Roberts *et coll.*, 2008). La moitié de ces cellules est localisée dans la SNc. Classiquement, les premières études de visualisation des projections dopaminergiques ascendantes suggèrent l'existence de trois grandes voies issues du MV (Fallon et Moore, 1978 ; Lindvall et

Björklund, 1974 ; Swanson, 1982) : la voie **nigrostriée** composée de neurones de la SNc projetant dans le striatum dorsal, la voie **mésolimbique** composée de neurones de l'ATV et du champ rétrosubstantiel qui projettent dans le striatum ventral (ou noyau accumbens), dans l'amygdale et dans les tubercules olfactifs et la voie **mésocorticale** qui prend son origine dans l'ATV et projette dans le cortex préfrontal. Les neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée sont généralement mis en évidence par l'expression du canal potassique à rectification entrante Girk2, à la différence des neurones dopaminergiques des voies mésocorticale et mésolimbique, issus de l'ATV et mis en évidence par l'expression de la calbindine, protéine de liaison au calcium (Thompson *et coll.*, 2005 ; Gaillard *et coll.*, 2009). Cependant, il est aujourd'hui connu que cette dichotomie n'est pas exclusive: des sous-populations neuronales au sein même de la SNc et de l'ATV semblent exister et projeter vers différentes régions du striatum et du cortex (*pour revue*, Björklund et Dunnett, 2007). Ainsi, il a été montré que les cellules dopaminergiques des parties les plus ventrales de la SNc mais également de l'ATV projettent vers la même région sensorimotrice, le striatum ventral. Ces cellules, de forme angulaire, expriment Girk2 et des niveaux élevés du transporteur à la dopamine (DAT). De même, les cellules dopaminergiques issues du noyau A8 et des parties dorsales de l'ATV, mais également de la SNc, innervent non seulement le cortex frontal et les structures limbiques mais aussi le striatum ventral et les compartiments matriciels entre les striosomes, du striatum dorsal. Ces cellules, de forme ronde ou fusiforme, expriment la calbindine et un faible niveau de DAT (*pour revue*, Björklund et Dunnett, 2007). En outre, toutes ces cellules expriment le marqueur des neurones catécholaminergiques, la tyrosine-hydroxylase (TH), enzyme catalysant la transformation de la tyrosine en dihydroxyphénylalanine ou L-DOPA.

La mise en évidence du lien entre transmission dopaminergique défectueuse et désordres psychiatriques et neurodégénératifs a conduit à de nombreuses études du système

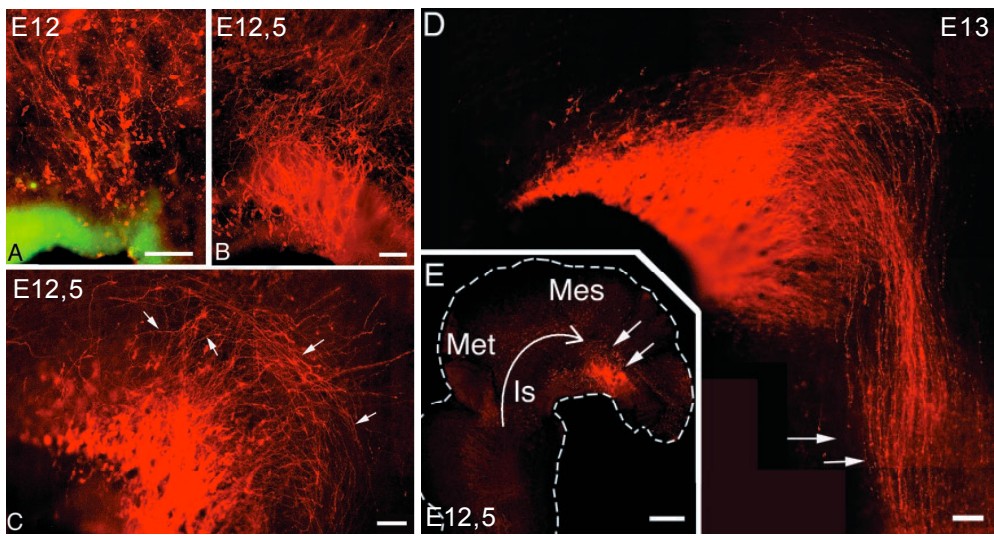


Figure XII – Emergence des projections dopaminergiques du mésencéphale ventral. A : à E12, les neurones exprimant la TH étendent de courts prolongements. B et C : à E12.5, des axones s’orientent dorsalement, d’autres rostralement. D : à E13, les axones atteignent le diencéphale. E : vue d’ensemble à faible grossissement à E12,5. Met : metencéphale ; Mes : mésencéphale ; Is : isthme ; Echelles : A-D : 100µm ; E : 300µm (Modifiée d’après Nakamura *et coll.*, 2000)

dopaminergique chez l'adulte et de ses dysfonctionnements dans les pathologies comme la schizophrénie, l'addiction, la dépression et la maladie de Parkinson. Cependant, l'essentiel des mécanismes responsables de la mise en place des connexions dopaminergiques pendant le développement embryonnaire reste à élucider.

2. Mise en place des voies mésostriatale et mésocorticale au cours de l'embryogenèse

Au cours de l'embryogenèse, les régions anatomiques du MV, SNc et ATV, n'étant pas différenciées, on distingue deux voies nerveuses : la voie mésostriatale constituée des axones des neurones du MV qui innervent le striatum dorsal et ventral et la voie mésocorticale désignant les neurones localisés dans le MV dont les axones se connectent au cortex.

a. Ontogénie chez le rongeur :

Chez le rat, les premières cellules exprimant la TH dans le MV ont été détectées à E11. À E12 chez le rat, et à E11,5 chez la souris, les neurones dopaminergiques étendent de courts prolongements (Figure XII, A) (Nakamura *et coll.*, 2000 ; Kolk *et coll.*, 2009). À E12,5, certains orientent leur croissance dorsalement et d'autres rostralement (Figure XII, B et C). À E13 chez le rat et E13,5 chez la souris, la plupart des axones sont orientés vers la partie rostrale et les premiers atteignent le diencephale, constituant les premières fibres du faisceau reliant le mésencéphale au télencéphale (MFB) (Nakamura *et coll.*, 2000) (Figure XII, D). À partir de E14 chez le rat, deux groupes de neurones dopaminergiques sont identifiables dans le MV, constituant les futures SNc et ATV. Leurs fibres atteignent la partie ventro-latérale des éminences ganglionnaires ainsi que le cortex, formant les futures voies mésostriatale et mésocorticale (Figure XIII, a). À partir de E14,5 chez la souris, les premiers

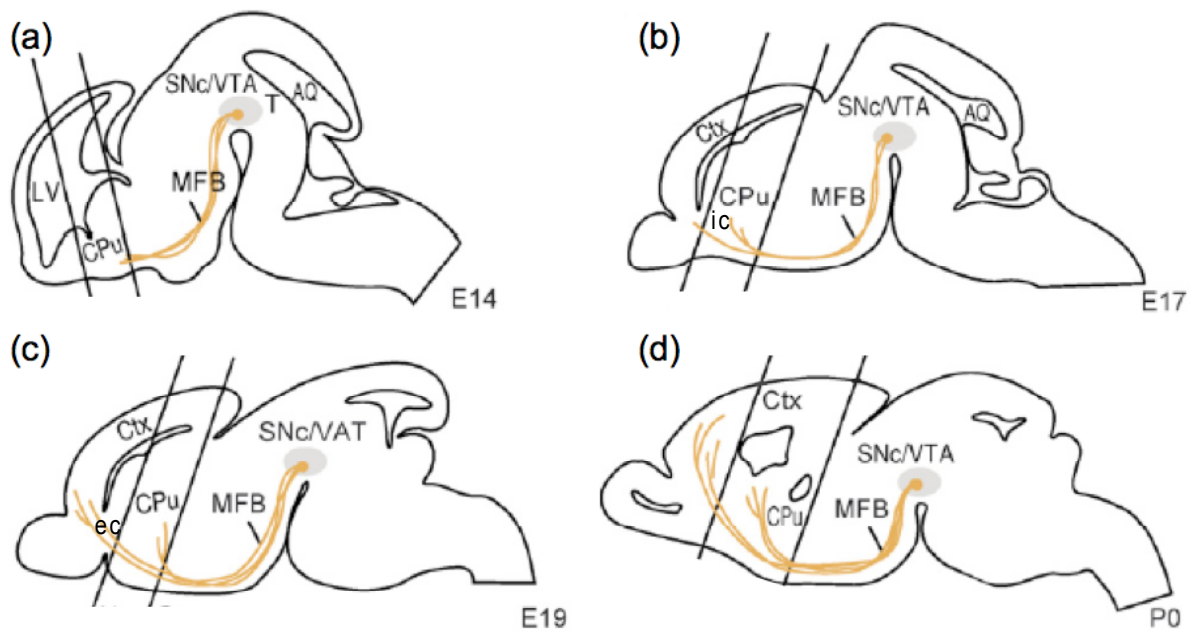


Figure XIII – Mise en place des connexions dopaminergiques issues du mésencéphale ventral et innervant le striatum et le cortex, au cours du développement, chez le rat. (a) À E14, le MFB atteint la partie ventro-latérale du CPU. (b) À E17, les projections dopaminergiques forment deux faisceaux, étroitement associés à ceux de la capsule interne. (c) À E19, la majeure partie des projections dopaminergiques dans le striatum rostral se situe le long de la capsule externe. Certaines la traversent en direction du cortex préfrontal. (d) À P0, les connexions dopaminergiques ont atteint leur cible. (CPU : caudé-putamen (striatum), NAc : noyau accumbens, Ctx : cortex, SNc/VTA : substance noire *pars compacta*/aire tegmentale ventrale, ic : capsule interne, ec : capsule externe, AQ : aqueduc de Sylvius). (Modifiée d'après Van Den Heuvel et Pasterkamp, 2008)

axones se dirigent dorsalement vers le striatum, tandis qu'une partie se dirigent plus rostralement vers le cortex préfrontal. Dès lors, ces cellules et leurs projections croissent rapidement en taille. À E16,5 chez la souris et E17 chez le rat, les projections dopaminergiques forment deux faisceaux, étroitement associés à ceux de la capsule interne formant les voies mésostriatale et mésocorticale (Figure XIII, b). Au niveau du mésencéphale, les parties latérales sont composées de cellules peu agencées. À partir de E17, ces cellules s'agencent en un groupe ventral et un groupe dorsal, qui juste avant la naissance, à E21, seront identifiables comme les ébauches des groupes de cellules de la SNc et *pars reticulata* (SNr), respectivement dopaminergique et gabaergique. À E18 chez le rat, les projections dopaminergiques pénètrent dans la partie rostrale du striatum. À E19, la majeure partie des projections dopaminergiques dans le striatum rostral se situe le long de la capsule externe (Figure XIII, c). Cette structure forme une barrière pour la majeure partie des axones dopaminergiques, cependant certains la traversent en direction du cortex préfrontal. À ce stade, de longues projections sont également visibles à la marge dorso-latérale du striatum. Elles constituent les premières projections dopaminergiques vers le striatum dorsal. À E20 chez le rat, les axones dopaminergiques innervent la partie adjacente aux ventricules latéraux. À P0, les connexions dopaminergiques ont atteint leurs cibles, à savoir le striatum et le cortex (Figure XIII, d). Durant les semaines suivantes, les projections en îlots s'organisent en position médiane dans le striatum. Au cours de la troisième semaine postnatale, la plupart de ces îlots ne sont plus détectables. Seuls les plus dorso-latéraux, apparus les premiers à E19 chez le rat, le sont encore et resteront visibles à l'âge adulte. Après la naissance, les premières varicosités au niveau des fibres dopaminergiques apparaissent. Leur nombre augmente rapidement durant la première et la seconde semaine postnatale et atteint son niveau maximum à P20 (Voorn *et coll.*, 1988 ; *pour revue* Björklund et Dunnett, 2007 ; Kolk *et coll.*,

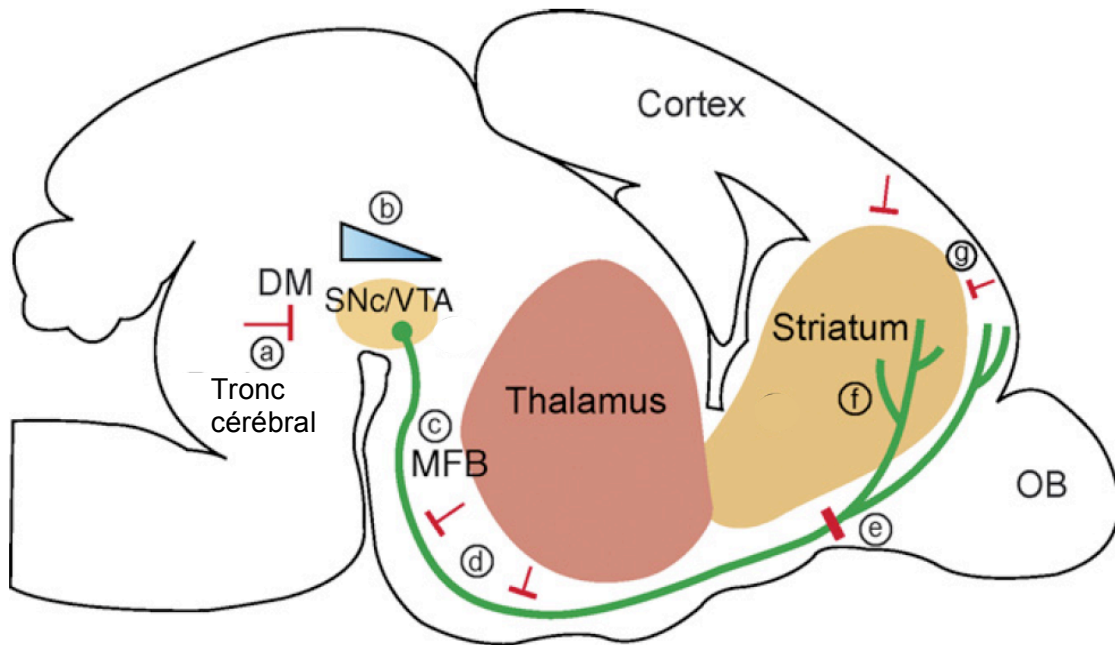


Figure XIV – Schéma représentant l'influence de l'environnement dans la mise en place des connexions dopaminergiques mésostriatales et mésocorticales, chez le rat. (a) Répulsion des fibres par le tronc cérébral. (b) Gradient de molécules de guidage dans le mésencéphale ventral (SNc/VTA). (c) Attraction dans le MFB. (d) Répulsion des fibres par le thalamus. (e) Arrêt des fibres dans le télencéphale ventral. (f) Attraction issue du striatum. (g) Répulsion des fibres par le cortex. SNc : substance noire *pars compacta* ; VTA : aire tegmentale ventrale ; DM : mésencéphale dorsal ; MFB : faisceau axonal reliant le mésencéphale au télencéphale ; OB : bulbe olfactif. (D'après Van Den Heuvel et Pasterkamp, 2008)

2009). Dès la 3^{ème} semaine postnatale, les neurones dopaminergiques présentent leur morphologie définitive et sont fonctionnels (Voorn *et coll.*, 1988).

b. Influence de l'environnement sur le guidage axonal :

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les axones dopaminergiques suivent initialement une direction dorsale dans le MV puis fléchissent vers l'avant en direction du télencéphale. Plusieurs études ont mis en lumière l'influence de l'environnement dans ce processus, notamment des structures à proximité du trajet de la voie mésostriatale. Chez le rat, un modèle a été suggéré (Figure XIV) : entre E12 et E14, les axones s'orienteraient rostralement du fait d'une répulsion issue du tronc cérébral (Figure XIV, a) (Gates *et coll.*, 2004) et d'un gradient caudo-rostral ou rostro-caudal de molécules de guidage dans le MV (Figure XIV, b) (Nakamura *et coll.*, 2000) ; une attraction dans le MFB (Figure XIV, c) initierait la croissance vers le striatum (Gates *et coll.*, 2004) ; une répulsion issue du thalamus et de l'hypothalamus maintiendrait le MFB en position ventrale (Figure XIV, d) ; entre E14 et E17, les terminaisons axonales s'accumuleraient en position ventro-latérale au striatum (Figure XIV, e), du fait d'une répulsion issue du cortex (Figure XIV, g) et de l'absence d'attraction par le striatum (Gates *et coll.*, 2004) ; passée cette période de latence, la mise en place d'une attraction par le striatum tendrait à attirer une partie des projections (Figure XIV, f) (Gates *et coll.*, 2005 ; Holmes *et coll.*, 1995), toujours repoussées par le cortex (Figure XIV, g). Cependant, peu de facteurs chimioattractants et chimiorépulsifs impliqués dans le guidage axonal des voies mésostriatale et mésocorticale ont été caractérisés. Plusieurs molécules pouvant influencer les axones des neurones dopaminergiques ont été décrites, telles que nétrine-1 et slit1, 2 et 3, respectivement permissive et inhibitrices de la croissance des neurones dopaminergiques (Lin et Isacson, 2006). Chez le rat, durant le développement de la voie mésostriatale, les neurones dopaminergiques, mais également le striatum et le cortex,

expriment nétrine-1. Son récepteur, la protéine DCC, est exprimé par les neurones dopaminergiques issus de l'ATV et de la SNc ainsi que dans le striatum et le cortex préfrontal où projettent ces neurones (Livesey et Hunt, 1997 ; Hamasaki *et coll.*, 2001). Cette expression du ligand et de son récepteur dans les mêmes régions suggère un rôle de guidage pour le couple nétrine-1/DCC dans l'établissement des projections mésocorticales et mésostriales, mais également dans celui des afférences corticales vers l'ATV et la SNc. Cette hypothèse est confirmée par l'observation *in vitro* de la promotion par nétrine-1 de la croissance des axones de neurones dopaminergique dissociés. Cette croissance est diminuée par l'ajout d'anticorps contre DCC (Lin *et coll.*, 2005). La co-expression du ligand nétrine-1 et de son récepteur DCC dans le MV et le striatum suggère également leur rôle dans la mise en place des circuits locaux. Chez la souris dont le gène Pax6, connu pour réguler l'expression de nétrine-1 via l'expression ectopique de Sonic hedgehog (Shh), a été invalidé, une augmentation ectopique de l'expression de nétrine-1 est observée au niveau de la zone de transition entre le thalamus dorsal et le prétegmentum. Attirés par la nétrine-1, la plupart des axones dopaminergiques ne prennent pas la direction rostro-ventrale du MFB, mais poursuivent une trajectoire dorso-latérale, suggérant l'implication de nétrine-1 dans le guidage axonal du MFB à la sortie du MV (Vitalis *et coll.*, 2000). Chez le rat, les récepteurs Robo1 et Robo2 sont exprimés à la fois par les neurones dopaminergiques embryonnaires et leurs cibles striatales. Robo1 est exprimé dans l'ATV et dans la SNc tandis que Robo2 l'est plus majoritairement dans l'ATV (Lin *et coll.*, 2005). Tous deux sont également exprimés dans le télencéphale dont le striatum (Marillat *et coll.*, 2002). Leurs ligands Slits sont exprimés par les structures environnantes du MV. Slit1 est ainsi présent dans le mésencéphale dorsal (Marillat *et coll.*, 2002), tandis que Slit3 est exprimé dans le mésencéphale caudal (Gates *et coll.*, 2004 ; Holmes *et coll.*, 1995). Leurs interactions répulsives avec Robo, exprimé par les neurones dopaminergiques embryonnaires, seraient impliquées dans le changement de direction des axones sortant du

mésencéphale et contribueraient donc à la trajectoire rostro-ventrale caractéristique du MFB. Au niveau du télencéphale, Slit2 est exprimé dans les régions adjacentes au striatum. Or *in vitro*, Slit2 repousse les axones dopaminergiques et inhibe leur croissance, ce qui suggère que par l'interaction Slit2/Robo1, les neurones dopaminergiques de la SNc seraient restreints au niveau du striatum (Lin *et coll.*, 2005). *In vivo*, chez les souris déficientes pour des protéines Slit ou Robo, des erreurs de guidage du MFB sont observées. Chez les souris Slit1 *-/-* et Slit2 *-/-*, le faisceau se divise en deux composantes, au niveau du télencéphale basal, et un grand nombre de fibres s'orientent ventralement dans l'hypothalamus vers la ligne médiane (Bagri *et coll.*, 2002). Chez les souris dont le gène codant pour le facteur de transcription Nkx2.1 a été invalidé, on observe une augmentation et une expansion de l'expression de Slit1 et une diminution de celle de Slit2 dans le télencéphale basal. Aussi, les axones dopaminergiques s'orientent de façon aberrante vers le télencéphale ventral et croisent la ligne médiane au niveau de l'hypothalamus pour se projeter sur le striatum controlatéral (Marin *et coll.*, 2002 ; Kawano *et coll.*, 2003). Le couple Slit/Robo serait donc impliqué dans le guidage axonal précoce des axones dopaminergiques et la mise en place plus tardive de leurs connexions avec le striatum. Chez la souris, Hammond *et coll.* (2009) ont récemment montré que les neurones dopaminergiques expriment les protéines Patched et Smoothed (Smo), les récepteurs de la protéine Shh, elle-même exprimée au niveau de la ligne médiane. Chez la souris dont le gène Smo a été invalidé de manière conditionnelle, aucune altération du MFB n'a été mise en évidence jusqu'à E13,5, tandis qu'à partir de ce stade, les fibres en position plus médiane dans le MFB ne progressent plus assez ventralement mais restent à proximité des fibres les plus latérales. Les auteurs suggèrent ainsi que Shh permettrait la ségrégation des fibres les plus médiales des fibres les plus latérales du MFB, en les attirant ventralement, permettant ainsi la constitution des voies mésostriatale et mésocorticale.

Chez le mutant pour Nkx2.1, une réduction de l'expression de Séma3A a été également observée au niveau de la ligne médiane. Séma3A pourrait donc aussi participer par répulsion au maintien de la trajectoire ipsilatérale des axones dopaminergiques (Kawano *et coll.*, 2003). De plus, récemment, Torre *et coll.* (2010) ont mis en évidence, chez le rat, l'expression de Séma3A et Séma3F dans le MV embryonnaire et l'expression par les neurones dopaminergiques des récepteurs Npn1 et Npn2, de leurs co-récepteurs L1CAM et NrCAM, ainsi que des récepteurs Plexines A1 et A3. *In vitro*, l'interaction des neurones dopaminergiques avec Séma3A et 3F induit une répulsion axonale, réponse qui n'est pas observée chez les mutants pour Npn1 ni pour la Npn2 (Torre *et coll.*, 2010). Kolk *et coll.* (2009) ont récemment proposé un modèle du rôle de Séma3F dans la mise en place des projections dopaminergiques : Séma3F induirait, par son interaction répulsive avec la Npn2, la fasciculation du MFB. Indépendamment de la Npn2 et grâce à son expression selon un gradient croissant rostro-caudal à proximité des axones, Séma3F induirait l'orientation rostrale du MFB. La réponse des axones vis-à-vis de Séma3F basculerait, plus tard au cours du développement, vers une attraction et permettrait aux axones exprimant Npn2 de s'orienter vers leur cible corticale. Ainsi, la souris Séma3F *-/-* présente des projections dorsales aberrantes dès la sortie du MV et le MFB apparaît plus large dans l'axe dorso-ventral. La souris Npn2 *-/-* présente quant à elle, des connexions aberrantes intracorticales et dans la capsule externe (Kolk *et coll.*, 2009). Il a également été montré que Séma7A est exprimée dans une sous-population de neurones dopaminergiques de la SNc tandis que le récepteur Plexine C1 est exprimé dans une sous-population de neurones dopaminergiques de l'ATV, suggérant que leur interaction participe à la ségrégation des voies mésostriatale et mésocorticale. De même, le striatum et le cortex préfrontal expriment ces molécules (Pasterkamp *et coll.*, 2007). Aussi, est-il possible de spéculer sur le rôle des sémaphorines dans le guidage axonal et la mise en place des connexions dopaminergiques.

Concernant les éphrines et leurs récepteurs Eph, c'est Yue *et coll.* en 1999 qui les premiers proposèrent leur implication fonctionnelle dans la mise en place de la voie mésostriatale. Cette étude a montré l'expression différentielle du récepteur EphB1 dans le MV : EphB1 est fortement exprimé par les neurones dopaminergiques de la SNc tandis que les neurones dopaminergiques de l'ATV l'expriment faiblement. Le ligand, éphrine-B2, est quant à lui fortement exprimé dans le noyau accumbens et plus faiblement dans le striatum dorsal, et a été identifié comme une molécule régulant négativement la croissance des neurites et la survie des neurones dopaminergiques issus de la SNc (Yue *et coll.*, 1999). Les neurones issus de la SNc, exprimant EphB1, sont repoussés par l'expression d'éphrine-B2 dans le noyau accumbens et connectent ainsi le striatum, au contraire des neurones issus de l'ATV. Le couple éphrine-B2/EphB1 serait ainsi impliqué dans la restriction des projections de la SNc au niveau du striatum (Yue *et coll.*, 1999). Hu *et coll.* (2004) ont suggéré que cette restriction des projections impliquerait une dégénérescence des connexions aberrantes pendant la période postnatale, dont les mécanismes moléculaires restent à identifier. D'autres récepteurs d'éphrine-B2 pourraient aussi être impliqués, étant donné qu'aucune anomalie anatomique de la voie mésostriatale n'a été décelée chez la souris EphB1 *-/-* (Richards *et coll.*, 2007). Au contraire, le bouleversement de la signalisation des récepteurs EphA a montré des anomalies de cette voie. La protéine EphA5, récepteur pour l'ensemble des éphrines-A (Gale *et coll.*, 1996), a été identifiée à la fois dans la SNc et l'ATV, tandis que l'ARNm du ligand éphrine-A5 a été identifié dans le striatum (Deschamps *et coll.*, 2009 ; Cooper *et coll.*, 2009). Une étude fonctionnelle a montré que l'inhibition de la signalisation des éphrines-A/EphA par un récepteur chimère EphA5 couplé à un fragment Fc (EphA5-Fc), pendant le développement entraîne une diminution du nombre de connexions mésostriatales, bien que le niveau de dopamine dans le striatum reste inchangé (Sieber *et coll.*, 2004). Cependant, chez la souris EphA5 *-/-*, une diminution de la concentration en dopamine est observée dans le striatum

(Halladay *et coll.*, 2004). Chez la souris éphrine-A5 $-/-$, l'innervation dopaminergique du striatum est réduite, bien que le nombre de cellules TH positives reste inchangé chez les deux types de mutants (Cooper *et coll.*, 2008). Janis *et coll.* (1999) ont également mis en évidence les expressions différentielles des ARNm codants pour éphrines-A2, A3 et A5 entre compartiments matriciels et striosomes dans le striatum suggérant leur implication dans la mise en place de la topographie des projections. L'ensemble de ces données suggèrent une implication de la signalisation éphrine-A/EphA dans la formation et le maintien des connexions dopaminergiques mésostriatales.

IV. But du travail et stratégie d'étude

Compte tenu de l'importance des éphrines-A/EphA dans le guidage des neurones dopaminergiques au cours du développement, **nous avons étudié au cours de ce travail, le rôle de la protéine éphrine-A5 dans le guidage axonal des neurones dopaminergiques du système mésostriatal au cours du développement, chez la souris.** Ces travaux sont un prélude à l'étude de la fonction de guidage de cette protéine pendant la croissance axonale des cellules dopaminergiques greffées lors de la reconstruction des circuits neuronaux lésés dans un modèle murin de la maladie de Parkinson (Gaillard *et coll.*, 2009).

La stratégie de notre étude a consisté tout d'abord à rechercher par immunohistochimie l'expression spatio-temporelle de la protéine éphrine-A5 dans l'ensemble du cerveau, à différents stades du développement embryonnaire (Chapitre 1 : Deschamps *et coll.*, soumis à BMC Neuroscience). Puis, nous nous sommes concentrés sur le système mésostriatal, pour lequel nous avons réalisé, d'une part, un modèle organotypique de MV embryonnaire en culture sur des lamelles contenant la protéine éphrine-A5 purifiée (technique de « *stripe assay* »). Ceci nous a permis de tester *in vitro* l'influence d'éphrine-A5 dans le guidage axonal des projections dopaminergiques. D'autre part, nous avons exploré *in vivo* et

in vitro le profil d'expression des récepteurs Eph au niveau des neurones dopaminergiques du MV, afin d'identifier un partenaire potentiel d'éphrine-A5 dans ce processus de guidage axonal (Chapitre 2 : Deschamps *et coll.*, 2009). Nous avons examiné la voie mésostriatale, par immunohistochimie anti-TH, chez l'embryon et chez l'adulte dont le gène éphrine-A5 a été invalidé et précisé les effets de la perte de fonction d'éphrine-A5 par des expériences complémentaires de biochimie (western blot) et de cultures de tranches *in vitro* (Chapitre 2 : expériences complémentaires).

CHAPITRE 1 : Distribution spatio-temporelle de la protéine éphrine-A5 dans le cerveau de la souris au cours du développement embryonnaire

I. RESUME	46
II. ARTICLE SOUMIS AU JOURNAL <i>BMC NEUROSCIENCE</i>	51
<i>Abstract</i>	52
Background	52
Results	52
Conclusion	52
<i>Background</i>	53
<i>Results</i>	55
EphrinA5 protein expression at E12.5	55
EphrinA5 protein expression at E14.5	56
EphrinA5 protein expression at E16.5	57
EphrinA5 protein expression at E18.5	59
EphrinA5 protein expression at P0	60
<i>Discussion</i>	62
Central olfactory system	62
Central visual system	65
Cortex and thalamocortical projections	67
Thalamus and corticothalamic projections	67
Mesostriatal system	68
<i>Conclusion</i>	69
<i>Methods</i>	69
Animals	69
Antibodies	70
Immunohistochemistry	70
Immunostaining analysis	71
<i>List of abbreviations</i>	71
<i>Authors' contributions</i>	74
<i>Acknowledgments</i>	74
<i>References</i>	75

I. Résumé

L'objectif de cette première étude a été de mettre en évidence l'expression de la protéine éphrine-A5 dans le cerveau de souris au cours du développement.

L'implication des éphrines et de leurs récepteurs Eph a été décrite dans de nombreux mécanismes développementaux comme l'adhérence, la migration, la segmentation et la spécification neuronales, le guidage axonal et l'établissement de cartes topographiques (Flanagan et Vanderhaeghen, 1998 ; O'Leary et Wilkinson, 1999 ; Wilkinson, 2001 ; Kullander et Klein, 2002 ; Pasquale, 2005). Au total, 9 membres et 2 classes A et B ont été identifiés. Parmi les éphrines-A, éphrine-A5 est la plus étudiée et est impliquée dans de nombreux processus développementaux du cerveau. Ephrine-A5 se lie aux récepteurs EphA3 (Carvalho *et coll.*, 2006 ; Otal *et coll.*, 2006), EphA4 (Eberhart *et coll.*, 2000, 2004), EphA5 (Feldheim *et coll.*, 1998), EphA7 (Miller *et coll.*, 2006) et EphB2 (Himanen *et coll.*, 2004).

Compte tenu du nombre restreint d'anticorps spécifiquement dirigés contre les éphrines/Eph, l'étude de son expression, dans le cerveau du rongeur, a jusqu'alors majoritairement concerné l'expression de l'ARNm. Celui-ci est présent dès l'organogenèse précoce (Cheng et Flanagan, 1994) et a été détecté dans de nombreuses régions du cerveau embryonnaire. En effet, dans le **téleencéphale**, l'expression de l'ARNm codant pour éphrine-A5 a été mise en évidence dans le système olfactif (Knöll *et coll.*, 2001b ; Cutforth *et coll.*, 2003), dans les éminences ganglionnaires (Passante *et coll.*, 2008 ; Cooper *et coll.*, 2008 ; Deschamps *et coll.*, 2009) et dans le cortex (Castellani *et coll.*, 1998 ; Gao *et coll.*, 1998 ; Vanderhaeghen *et coll.*, 2000; Mann *et coll.*, 2002 ; Dufour *et coll.*, 2003 ; Bolz *et coll.*, 2004). Dans le **diencéphale**, l'ARNm a été observé dans l'hypothalamus et le thalamus (Donoghue *et coll.*, 1996 ; Feldheim *et coll.*, 1998 ; Bolz *et coll.*, 2004 ; Uziel *et coll.*, 2006 ; Deschamps *et coll.*, 2009). Dans le **mésencéphale**, l'ARNm codant pour éphrine-A5 a également été détecté dans les colliculi inférieur et supérieur, le noyau prétectal et le noyau

rouge (Donoghue *et coll.*, 1996 ; Frisen *et coll.*, 1998 ; Feldheim *et coll.*, 1998 ; Deschamps *et coll.*, 2009). Enfin, dans les systèmes rétinoectal (Feldheim *et coll.*, 1998 ; Frisen *et coll.*, 1998), rétinohalamique (Ellsworth *et coll.*, 2005), thalamocortical (Gao *et coll.*, 1998 ; Vanderheaghen *et coll.*, 2000 ; Dufour *et coll.*, 2003 ; Uziel *et coll.*, 2006) et olfactif (Knöll *et coll.*, 2001b ; Knöll et Drescher, 2002), les ARNm codants pour éphrine-A5 et ses récepteurs sont exprimés, par les neurones et leur cible, selon des gradients opposés.

Concernant l'expression de la protéine éphrine-A5 dans le système nerveux central, seule une étude approfondie a été réalisée dans le système olfactif, montrant son expression dans les axones du nerf olfactif primaire, les glomérules, les faisceaux issus du bulbe et les axones des neurones sensoriels du système olfactif accessoire (St John *et coll.*, 2002). La localisation de la protéine est essentielle pour donner une indication de son lieu d'adressage et donc de sa fonction. En effet, les protéines éphrines/Eph peuvent exercer leur fonction soit au niveau du corps cellulaire, soit sur l'axone ou encore au niveau du cône de croissance. De plus, l'expression de la protéine n'est pas toujours simultanée à l'expression de l'ARNm. Le stade de production de la protéine, plus proche de celui de sa mise en fonction, permet donc d'extrapoler plus précisément sur le rôle de la molécule. Enfin, l'observation des gradients d'expression protéique des ligands et des récepteurs est souvent importante pour déterminer la nature répulsive ou attractive de leurs interactions.

Dans notre étude, nous avons donc analysé la distribution spatio-temporelle de la protéine éphrine-A5 par immunohistochimie dans l'ensemble du cerveau de souris, au cours du développement embryonnaire et chez le nouveau-né. Nous avons utilisé un anticorps polyclonal dirigé contre la partie C-terminale de la protéine éphrine-A5 humaine, sur des coupes coronales et sagittales de souris aux stades E12,5, E14,5, E16,5, E18,5 et P0. Nous avons observé une forte expression de la protéine éphrine-A5 entre E12,5 et E16,5, puis une diminution de l'intensité du marquage à partir de E18,5 jusqu'à la disparition presque totale

du signal à P0. Nous avons détecté la présence de la protéine éphrine-A5 dans le bulbe olfactif, le colliculus supérieur, le cortex, le thalamus, et le striatum. L'expression de la protéine éphrine-A5 au cours du développement semble ainsi corrélée avec l'établissement des projections topographiques des systèmes olfactif, rétinoectal, thalamocortical, corticothalamique et mésostriatal. Ceci nous a permis de suggérer de nouvelles fonctions de la protéine éphrine-A5 au cours du développement, dans ces différents systèmes.

Ainsi dans le *système olfactif*, nous avons montré qu'éphrine-A5 est exprimée dès E12,5 dans le nerf olfactif, suggérant son implication dans le guidage axonal ou la fasciculation des neurones olfactifs primaires le constituant, via son interaction avec les récepteurs EphA4 et/ou EphA5, également exprimés dans le nerf olfactif (St John *et coll.*, 2002). L'expression uniforme d'éphrine-A5 que nous avons observée dans la couche cellulaire des cellules mitrales, à E16,5, semble également être en faveur de son implication dans le positionnement de ces cellules au sein du bulbe olfactif, via son interaction avec un ou plusieurs récepteurs Eph (EphA3, EphA4, EphA5, EphA7 et/ou EphB2) également exprimés par ces cellules (Kudo *et coll.*, 2005 ; St John et Key, 2001 ; St John *et coll.*, 2002 ; St John *et coll.*, 2000 ; Cooper *et coll.*, 2009). La présence dans cette même couche du ligand et de ses récepteurs suggère que leurs interactions pourraient être attractives. Nous avons également mis en évidence une forte expression d'éphrine-A5, à E16,5, dans le tractus olfactif latéral et dans le tubercule olfactif, qui décroît à partir de E18,5, laissant suggérer qu'éphrine-A5 joue aussi un rôle dans le guidage axonal ou la fasciculation des neurones olfactifs secondaires. Dans le *système visuel*, nous avons observé l'expression de la protéine éphrine-A5 dans les trois cibles des axones rétiniens lors de l'établissement de leurs projections entre E14,5 et E16,5 : dans le noyau latéral géniculé du thalamus exprimant également EphA4 (Greferath *et coll.*, 2002) et dans le préectum et le colliculus supérieur exprimant, tous deux, EphA4 et EphA5 (Greferath *et coll.*, 2002 ; Cooper *et coll.*, 2009). Étant donné qu'il a été montré que

ligands et récepteurs peuvent interagir en *cis* et qu'une telle interaction empêche une interaction en *trans* (Arvanitis et Davy, 2008), nous avons suggéré que la présence d'éphrine-A5 et de ses récepteurs EphA4 et EphA5 dans les structures cibles des axones rétiniens permettrait de limiter l'interaction en *trans* des récepteurs EphA4 et EphA5 avec les éphrines exprimées par ces neurones et ainsi de bloquer leurs effets. De plus, nous avons observé l'expression de la protéine éphrine-A5 dans le colliculus supérieur à partir de E14,5, tandis que l'ARNm a été détecté dès E12,5 (Donoghue *et coll.*, 1996 ; Frisen *et coll.*, 1998). Ce résultat suggère qu'éphrine-A5 puisse être impliquée dans la mise en place de la topographie rétinoectale seulement à partir de E14,5, stade coïncidant avec l'arrivée des cônes de croissance rétiniens au niveau du colliculus supérieur. Dans le **systeme thalamocortical**, nous avons détecté la présence de la protéine éphrine-A5 dans le cortex entre E12,5 et E18,5, selon un patron dont la complexité augmente avec le développement des couches corticales. Nous avons notamment observé une forte expression d'éphrine-A5 dans les cortex pariétal, frontal et insulaire à E16,5, suggérant qu'éphrine-A5 pourrait être impliquée dans le positionnement fin des projections thalamiques vers ces régions corticales, via 3 récepteurs potentiels exprimés par ces régions, EphA3, EphA4 et EphA5 (Kudo *et coll.*, 2005 ; Greferath *et coll.*, 2002 ; Cooper *et coll.*, 2009). Dans le **systeme corticothalamique**, nous avons montré la présence d'un gradient d'expression de la protéine éphrine-A5 dans le thalamus. Ce gradient est observé de façon décroissante selon les axes ventro-dorsal et rostro-caudal entre E12,5 et E16,5 puis s'inverse à partir de E16,5, lorsque les axones corticaux établissent leurs projections dans le thalamus. De cette manière, éphrine-A5 pourrait être impliquée dans la mise en place des connexions corticothalamiques, via le récepteur EphA4 exprimé dans le thalamus (Greferath *et coll.*, 2002). Enfin, dans le **systeme mésostriatal**, nous avons observé la forte expression de la protéine éphrine-A5 dans le striatum, structure cible des axones issus du MV. Nous avons mis en évidence un gradient d'expression décroissant ventro-dorsal et

rostro-caudal d'éphrine-A5, qui n'apparaît pas pour l'ARNm (Janis *et coll.*, 1999 ; Passante *et coll.*, 2008), résultant sans doute de l'adressage de la protéine à ses sites fonctionnels. Ce gradient d'expression pourrait être impliqué dans la mise en place de la topographie des projections dopaminergiques dans les régions dorsale et ventrale du striatum, via son interaction avec le récepteur EphA5 exprimé par les neurones dopaminergiques et également présent dans le striatum (Cooper *et coll.*, 2009, Deschamps *et coll.*, 2009). Par ailleurs, nous avons constaté que le noyau rouge exprime l'ARNm codant pour éphrine-A5 mais pas la protéine. Ceci suggère que l'expression d'éphrine-A5 dans ce noyau ne joue pas de rôle dans la répulsion des axones dopaminergiques issus du MV comme aurait pu le laisser suggérer l'expression de l'ARNm. En revanche, la protéine exerce certainement sa fonction loin du soma, très probablement au niveau des projections rubrospinales où elle a été détectée pendant le développement (Washburn *et coll.*, 2007).

Cette étude présente donc pour la première fois un patron général de l'expression de la protéine éphrine-A5 dans le cerveau de la souris au cours du développement. Nos résultats, présentés plus en détail dans l'article ci-après soumis à *BMC Neuroscience*, suggèrent de nouveaux rôles de la protéine éphrine-A5 et devraient ainsi permettre d'approfondir la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement des systèmes neuronaux au cours du développement.

II. Article soumis au journal *BMC Neuroscience*

EphrinA5 protein distribution in the developing mouse brain

C. Deschamps, M. Jaber, A. Gaillard, L. Prestoz

Abstract

Background

EphrinA5 is one of the best-studied members of the Eph-ephrin family of guidance molecules, known to be involved in brain developmental processes. Using in situ hybridization, ephrinA5 mRNA expression has been detected in the retinotectal, the thalamocortical, and the olfactory systems; however, no study focused on the distribution of the protein. Considering that this membrane-anchored molecule may act far from the neuron soma expressing the transcript, it is of a crucial interest to localize ephrinA5 protein to better understand its function.

Results

Using immunohistochemistry, we found that ephrinA5 protein is highly expressed in the developing mouse brain from E12.5 to E16.5. The olfactory bulb, the cortex, the striatum, the thalamus, and the colliculi showed high intensity of labelling, suggesting its implication in topographic mapping of olfactory, retinotectal, thalamocortical, corticothalamic and mesostriatal systems. In the olfactory nerve, we found an early ephrinA5 protein expression at E12.5 suggesting its implication in the guidance of primary olfactory neurons into the olfactory bulb. In the thalamus, we detected a dynamic graduated protein expression, suggesting its role in the corticothalamic patterning, whereas ephrinA5 protein expression in the target region of mesencephalic dopaminergic neurones indicated its involvement in the mesostriatal topographic mapping. Following E16.5, the signal faded gradually and was barely detectable at P0.

Conclusion

Our work shows that ephrinA5 protein is expressed in restrictive regions of the developing mouse brain. This expression pattern points out the potential sites of action of this molecule in the olfactory, retinotectal, thalamocortical, corticothalamic and mesostriatal systems, during development. This study is essential to better understand the role of ephrinA5 during developmental topographic mapping of connections and to further characterise the mechanisms involved in pathway restoration following cell transplantation in the damaged brain.

Background

Ephrins are ligands for transmembrane Eph-receptors, the largest group of receptor tyrosine kinases, that have been shown to be implicated in various developmental mechanisms such as cell adhesion, cell migration, boundary formation, axonal pathfinding, axon guidance, layer-specific arborisations, target area, topographic mapping and apoptosis [1,2,3,4,5]. A total of 9 members have been identified to date and are divided into two sub-families consisting of 6 ephrinA (A1-A6) and 3 ephrinB (B1-B3) ligand types [5]. EphrinA and B differ in their membrane-anchorage and on their receptor affinity: ephrinA are glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked proteins and bind generally to the EphA-receptors, whereas ephrinB have a transmembrane domain and a cytoplasmic region, and interact preferentially with EphB-receptors. Exceptions in the binding discrimination between classes are that ephrinA5, at high concentration, can bind to EphB2 [6], and ephrinB-ligands to EphA4 [7]. Ephrins and their receptors are highly expressed in the developing nervous system and often in complementary gradients inside delimited regions of the central nervous system [8,9]. This feature is particularly well described in the retinotectal system, where graded Eph and ephrin expressions establish the topographically ordered retinocollicular projection: temporal retinal axons, which express high levels of EphA-receptors, terminate in a low ephrin expression region of the tectum (the anterior part), whereas, nasal axons, which exhibit a low Eph-receptor expression, connect to the posterior tectum, which is a high ephrinA expression region [10].

Within the ephrinA group, ephrinA5 has been extensively studied and was shown to be a ligand for EphA3 [11,12], EphA4 [13,14], EphA5 [10], EphA7 [15] and EphB2 [6] receptors. The study of its expression, mainly explored at the mRNA level in the rodent developing brain, has shown that ephrinA5 is present from early organogenesis [16] to postnatal stages throughout the central nervous system. In the telencephalon, ephrinA5 mRNA is expressed in

the olfactory system [17,18], in the lateral and medial ganglionic eminences and their ventricular zones [19-21] and in the cortex [22-27]. EphrinA5 transcript expression has been also detected in the diencephalon (hypothalamus and thalamus) [10,21,27-29] and in the inferior and superior colliculi as well as in the pretectal nuclei and the red nucleus of the mesencephalon [28,30,10,21].

In several systems such as the retinotectal [10,30], the retinothalamic [31] and the thalamocortical [23,24,26,29] ones, ephrinA5 and its receptors have been found to be expressed in opposite gradients on the projections and their target respectively, leading to a repulsive ligand-receptor interaction. An exception to these observations was described in the olfactory system, where high ephrinA5 expressing region is connected by axons containing an important concentration of ephrinA5 receptors. This suggests that ephrinA5 interaction with its receptors could also mediate an attractive signal in some systems [17,32].

Although ephrinA5 mRNA expression has been extensively described during development as mentioned above, distribution of the protein in the developing central nervous system is still lacking. Thereby, putative functions of this molecule during development have been mainly deduced from its mRNA expression pattern and from studies using ephrinA5 knock-out mice. However, the use of these genetic tools may present some limitations, given that, partial redundancy that exists between ephrinA-ligands [33,34].

Given the importance of this guidance membrane-anchored protein location in its actions, sometimes far from the neurone soma expressing the mRNA, we used here immunohistochemistry to analyse the spatiotemporal ephrinA5 protein expression in the mouse brain during embryogenesis and in newborns. We compared the distribution of ephrinA5 protein to the transcript location, and to previous functional studies, providing new insights to the involvement of ephrinA5 in the development of the brain.

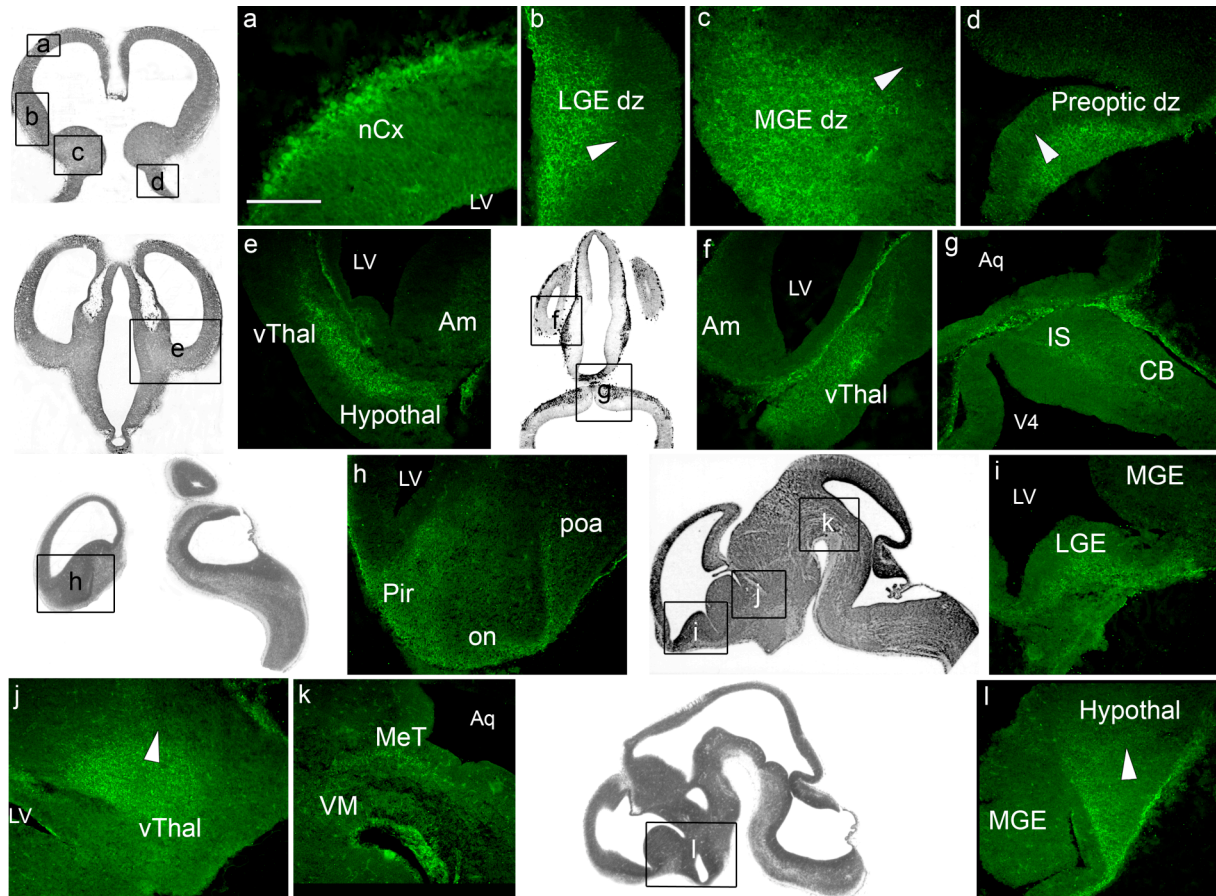


Figure 1 – EphrinA5 protein expression in E12.5 embryonic mouse brain. EphrinA5 protein distribution is represented on coronal sections in a rostro-caudal sequence (panels a to g), and on sagittal sections in a latero-medial sequence (panels h to l). EphrinA5 protein was strongly expressed in the telencephalon (panels a, b, c, h, i) diencephalon (panels d, e, f, h, j, l) mesencephalon (panel k) and moderately in the metencephalon (panel g). Arrowheads in panels b, c and d indicate a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient in the lateral and medial ganglionic eminence, and preoptic differentiating zones respectively. In panels j and l, arrowheads show a ventral and rostral (high) to a dorsal and caudal (low) gradient of ephrinA5 protein in the ventral thalamus and hypothalamus respectively. Scale bar: panels a, c: 75 μ m; panel b: 250 μ m; panel d: 150 μ m; panels e, f, g, h, i, l: 300 μ m; panel j: 350 μ m; panel k: 200 μ m. Abbreviations: see list.

Results

To determine the ephrinA5 protein expression, we used an affinity purified polyclonal antibody directed against a part of the C-terminal region of the human ephrinA5 protein, described in our previous work [21]. We identified the presence of ephrinA5 protein in the mouse brain at four stages during embryonic development: E12.5, E14.5, E16.5, E18.5, and in newborns. Both sagittal and coronal sections showed dynamic spatiotemporal ephrinA5 immunoreactivity in the telencephalic, diencephalic, mesencephalic and metencephalic brain structures. Following P0, the ephrinA5 signal was barely detectable.

Details of ephrinA5 expression distribution are presented below for each developmental stage, and summarized in table 1.

EphrinA5 protein expression at E12.5

The earliest stage we examined was embryonic day E12.5 (Fig. 1a-l). Within the *telencephalon*, the olfactory nerve (Fig. 1h) presented robust ephrinA5 immunoreactivity. Well-stained cell profiles were also observed in the neocortex (Fig. 1a) and in the piriform cortex (Fig. 1h). Lateral ganglionic eminence (Fig. 1i) and lateral (Fig. 1b) and medial (Fig. 1c) ganglionic eminence differentiating zones exhibited strong ephrinA5 immunoreactivity. In these latter structures, we detected a spatial disparity of ephrinA5 expression in a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient (arrowheads in figure 1, panels b and c respectively).

Among the *diencephalic structures*, the preoptic differentiating zone (Fig. 1d), the preoptic area (Fig. 1h), as well as the hypothalamus and the ventral thalamus, visualized on coronal (Fig. 1e, f) and sagittal sections (Fig. 1j, l), also exhibited strongly labelled ephrinA5 immunoreactive cells. We noticed spatial variations of ephrinA5 expression within the preoptic differentiating zone, the thalamus and the hypothalamus: in the preoptic

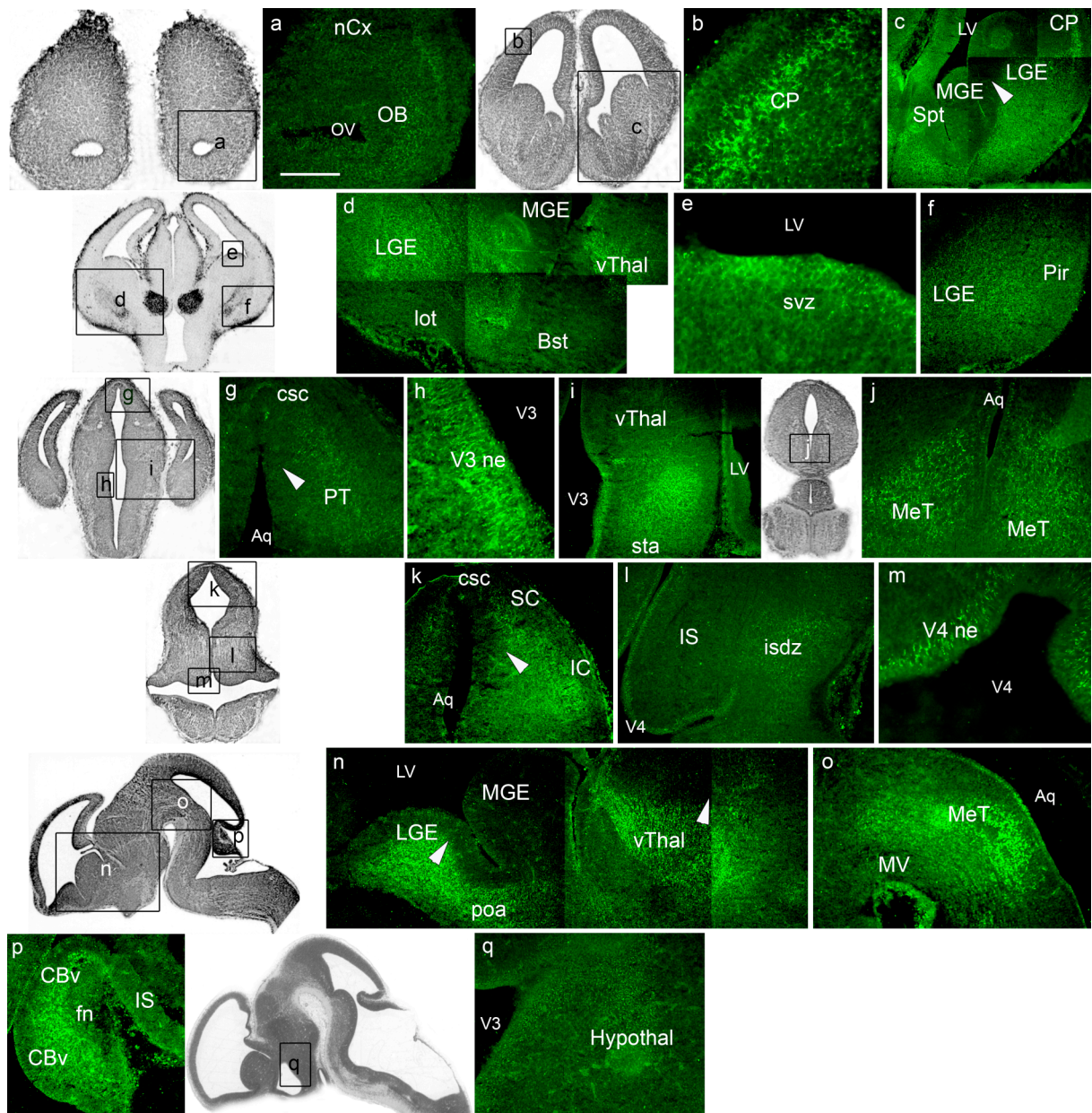


Figure 2 – EphrinA5 protein expression in E14.5 embryonic mouse brain. EphrinA5 protein distribution is represented on coronal sections in a rostro-caudal sequence (panels a to m) and on sagittal sections in a latero-medial sequence (panels n to q). EphrinA5 protein was differentially expressed within brain regions. EphrinA5 was strongly expressed in the telencephalon (panels b, c, d, f, n) in the diencephalon (panels d, i, n) in the mesencephalon (panels g, j, k, o) and in the metencephalon (panels l and p) excepted in the olfactory bulb (panel a) the subventricular zone (panel e) the hypothalamus (panel q) and the isthmus differentiating zone (panel l) where expression was moderate. Arrowheads in panels c and g indicate ephrinA5 expression gradients respectively in the lateral ganglionic eminence and in the pretectum, in a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) direction. The inferior colliculus exhibited a lateral (high) to medial (low) gradient (arrowhead in panel k). Arrowheads in panel n show ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradients in the lateral ganglionic eminence and the ventral thalamus. Dotted lines in panels g and k indicate the superior colliculus commissure. Scale bar: panels a, b, i, j, k, q: 150 μ m; panel c: 300 μ m; panel d: 400 μ m; panels e, h, m: 75 μ m; panels f, g, l, p: 200 μ m; panel n: 350 μ m; panel o: 250 μ m. Abbreviations: see list.

differentiating zone, ephrinA5 was expressed in a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient as shown by arrowhead in figure 1, panel d and in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient in the ventral thalamus and in the hypothalamus (arrowheads in figure 1, panels j and l respectively).

In the *mesencephalon*, only the mesencephalic tegmentum exhibited a strong level of ephrinA5 immunoreactivity (Fig. 1k). The ventral mesencephalon was unstained (Fig. 1k).

The *metencephalon* was moderately stained: ephrinA5 protein was present in the isthmus and in the cerebellum, as visualized in figure 1, panel g.

Overall, at E12.5, ephrinA5 protein was strongly expressed in the telencephalon, diencephalon, mesencephalon, whereas its expression was moderate in the metencephalon (Table 1).

EphrinA5 protein expression at E14.5

At E14.5, ephrinA5 expression was strongly expressed in the four major regions of the developing brain (Fig. 2 a-q). In the *telencephalon*, high level of ephrinA5 immunoreactivity was detected, except in the olfactory bulb (Fig. 2a) and in the subventricular zone (Fig. 2e) where ephrinA5 protein expression was moderate. Strongly immunoreactive cells were observed in the neocortex, especially in the cortical plate of the primitive somatosensory cortex (Fig. 2b) and in the piriform cortex (Fig. 2f). EphrinA5 immunoreactivity was also robust in the lateral ganglionic eminence, visualized on coronal (Fig. 2c, d, f) and sagittal sections (Fig. 2n), in a lateral and ventral (high) to medial and caudal (low) gradient (arrowhead in figure 2, panel c) and in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient (arrowhead in figure 2, panel n).

In the *diencephalon*, ephrinA5 was strongly expressed in the preoptic area (Fig. 2n) and in the ventral thalamus, visualized on coronal (Fig. 2d) and on sagittal sections in a ventral and

rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient (Fig. 2n). We also observed a high ephrinA5 staining in the subthalamic area (Fig. 2i) and moderate immunoreactivity in the hypothalamus (Fig. 2q).

In the *mesencephalon*, coronal (Fig. 2j) and sagittal (Fig. 2o) sections in the mesencephalic tegmentum exhibited robust ephrinA5 immunoreactivity. Furthermore, ephrinA5 was strongly expressed in the inferior and superior colliculi (Fig. 2k) and in the pretectum (Fig. 2g). We observed a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient in the pretectum (arrowhead in figure 2, panel g) and a lateral (high) to medial (low) gradient in the inferior colliculus (arrowhead in figure 2, panel k). The superior colliculus commissure (Fig. 2g, k) also presented robust ephrinA5 immunoreactivity. In return, the ventral mesencephalon was unstained (Fig. 2o).

In the *metencephalon*, cells from the isthmus differentiating zone were weakly stained (Fig. 2l), whereas the cerebellar vermis exhibited a strong ephrinA5 expression (Fig. 2p).

Finally, we noticed that cells from the neuroepithelia of the third (Fig. 2h, i) and fourth (Fig. 2m) ventricles and of the aqueduct (Fig. 2o) exhibited strong ephrinA5 immunoreactivity.

Overall, ephrinA5 protein was strongly expressed in the same brain regions than earlier in the development. The olfactory bulb, the subventricular zone, the hypothalamus and the isthmus differentiating zone were however moderately stained (Table 1).

EphrinA5 protein expression at E16.5

At E16.5, the intensity of ephrinA5 immunostaining was high in most of the developing brain structures (Fig. 3 a-u). The *telencephalon* exhibited strong ephrinA5 expression in olfactory structures such as the granule (Fig. 3a) and the mitral (Fig. 3b) cell layers of the olfactory bulb, the olfactory tubercle (Fig. 3e) and the lateral olfactory tract (Fig. 3h). We also detected a high level of ephrinA5 immunoreactivity in the septum (Fig. 3s) and in the lateral

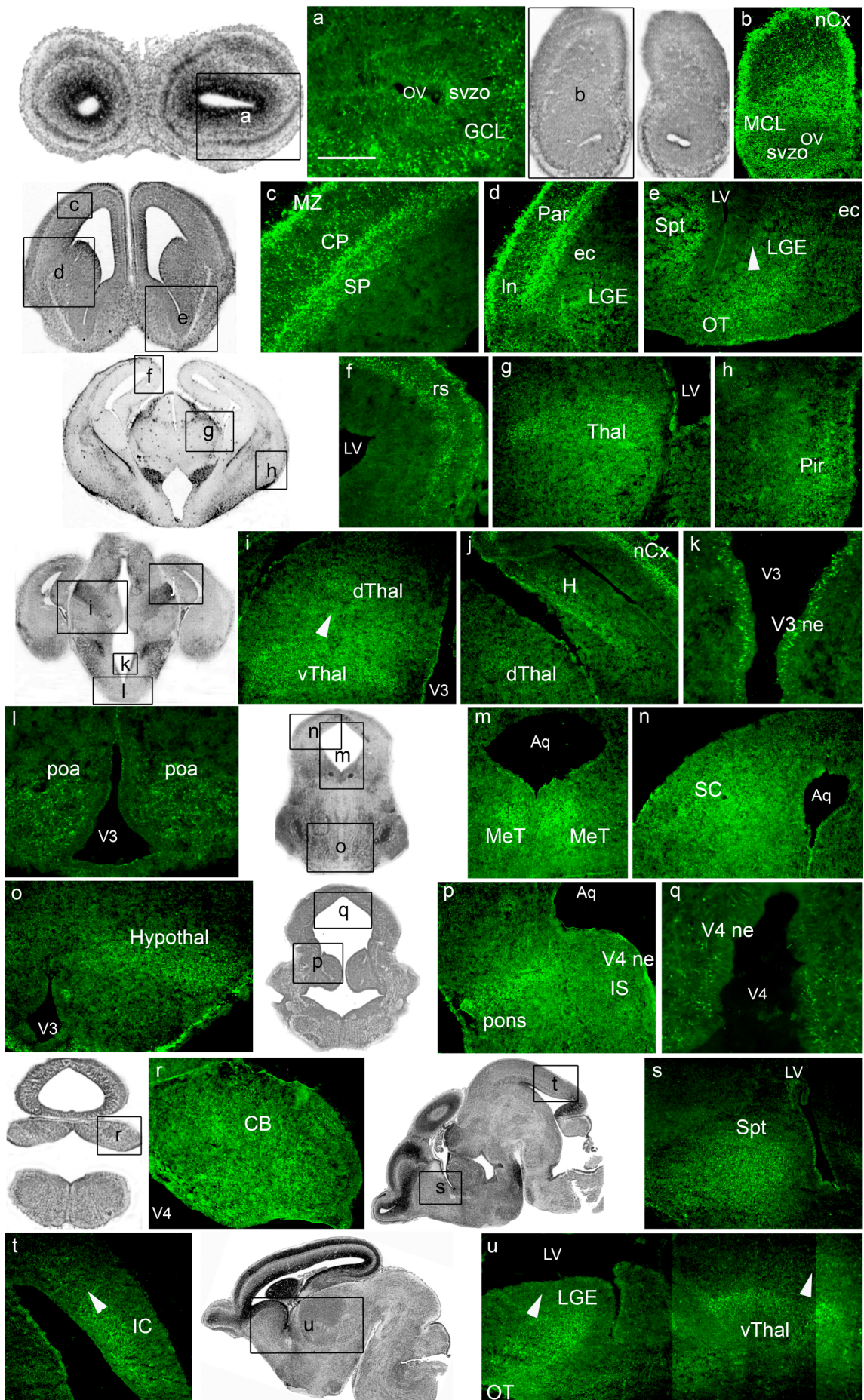


Figure 3 – EphrinA5 protein expression in E16.5 embryonic mouse brain. EphrinA5 protein distribution is represented on coronal sections in a rostro-caudal sequence (panels a to r) and on sagittal sections in a medio-lateral sequence (panels s to u). At 16.5, ephrinA5 protein was strongly expressed in the telencephalon (panels a, b, c, d, e, j, s, u) diencephalon (panels g, i, j, l, o, u) mesencephalon (panels m, n, t) and metencephalon (panels r, p) excepted in the retrosplenial (panel f) and piriform (panel h) cortices, in the hippocampus (panel j) in the preoptic area (panel l) and in the isthmus (panel p) where the expression was moderate. In the lateral ganglionic eminence, ephrinA5 protein was expressed in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient (arrowheads in panels e and u). In panels i and u, arrowheads represent a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient in the thalamus and in panel t, a caudal (high) to rostral (low) gradient in the inferior colliculus. Scale bar: panels a, k, q: 75µm; panels b, d, n: 350µm; panels c, e, o, r: 200µm; panels f, l, t: 150µm; panels g, h, i, j, p: 300µm; panels m, u: 400µm. Abbreviations: see list.

ganglionic eminence, as visualized on coronal (Fig. 3d, e) and sagittal sections (Fig. 3u).

Within the lateral ganglionic eminence, ephrinA5 was expressed in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient (arrowheads in figure 3, panels e and u). Moreover, the frontal (Fig. 3b) and parietal (Fig. 3d) parts of the neocortex exhibited a strong ephrinA5 protein expression in the marginal zone, the cortical plate and the subplate as observed in the primitive somatosensory cortex (Fig. 3c). Insular (Fig. 3d), retrosplenial (Fig. 3f) and piriform (Fig. 3h) cortices also exhibited ephrinA5 immunoreactive cells, although these two latter structures showed less intense immunostaining. EphrinA5 protein expression was moderate in the hippocampus (Fig. 3j).

In the *diencephalon*, ephrinA5 staining in the preoptic area (Fig. 3l) was moderate compared to previous stages, whereas the thalamus, visualized on coronal (Fig. 3g, i, j) and sagittal sections (Fig. 3u), still exhibited strong ephrinA5 expression. In this structure, ephrinA5 staining was higher in the ventral and rostral part than in the dorsal and caudal part (arrowheads in figure 3, panels i and u). An intense staining was also detected in the hypothalamus (Fig. 3o).

In the *mesencephalon*, the mesencephalic tegmentum (Fig. 3m) and the superior colliculus (Fig. 3n) exhibited strongly immunostained cells. EphrinA5 labeling was also detected in the ventricular zone of the inferior colliculus in a caudal (high) to rostral (low) gradient (arrowhead in figure 3, panel t). The ventral mesencephalon was unstained (Fig. 3m).

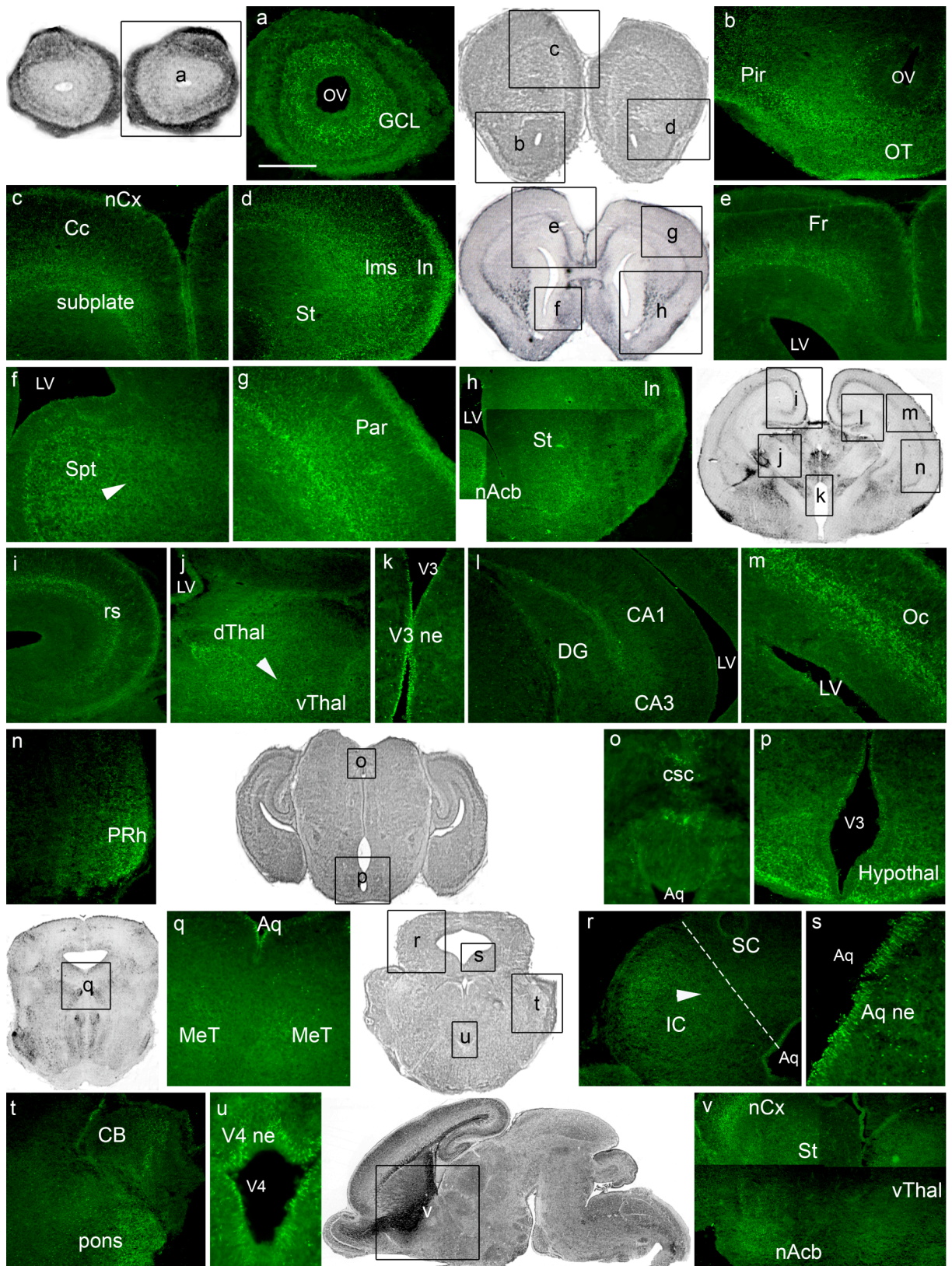


Figure 4 – EphrinA5 protein expression in E18.5 embryonic mouse brain. EphrinA5 protein distribution is represented on coronal sections in a rostro-caudal sequence (panels a to u) and on a sagittal section (panel v). At E18.5, ephrinA5 is mostly expressed in the telencephalon especially in olfactory structures (panels a, b) in the septum (panel f) in the lateral migratory stream (panel d) and in the cortex (panels g, m, n, v) at a moderate level. The thalamus (panel j) and inferior colliculus (panel r) showed also a moderate expression, whereas other brain structures exhibited weak ephrinA5 immunoreactivity. Arrowheads in panels f, j and r represent respectively a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient in the septum, a lateral and dorsal (high) to medial and ventral (low) gradient in the thalamus and a lateral (high) to medial (low) gradient in the inferior colliculus. Dotted lines in panel o and r indicate respectively the superior colliculus commissure and the limit between the superior and the inferior colliculi. Scale bar: panels a, b: 250µm; panels c, e, n: 400µm; panels d, j, r, t: 300µm; panels f, g, l: 200µm; panel h: 450µm; panels i, m: 250µm; panel k: 100µm; panel o: 110µm; panel p: 175µm; panel q: 150µm; panel s: 100µm, panel v: 550µm. Abbreviations: see list.

In the *metencephalon*, the isthmus was moderately stained (Fig. 3p) whereas high immunoreactivity in the cerebellum (Fig. 3r) and in the pons (Fig. 3p) was detected.

Neuroepithelia of the third (Fig. 3k) and fourth (Fig. 3p, q) ventricles and neuroepithelium of the aqueduct (Fig. 3m, n) exhibited ephrinA5 immunostaining as well.

Overall, E16.5 embryonic stage showed high levels of ephrinA5 immunoreactivity in the same regions than those previously described earlier in the development, with the exception of the preoptic area that was moderately stained compared to E12.5 and E14.5 stages (Table 1).

EphrinA5 protein expression at E18.5

At E18.5, ephrinA5 protein expression was generally less intense than earlier in the development (Fig. 4 a-v). In the *telencephalon*, the granule cell layer of the olfactory bulb (Fig. 4a), the olfactory tubercle and the lateral olfactory tract (Fig. 4b) exhibited a moderate immunoreactive intensity. Moreover, ephrinA5 expression was weak in the striatum as shown on coronal (Fig. 4d, h) and sagittal sections (Fig. 4v), and almost non-existent in the nucleus accumbens (Fig. 4v). A moderate ephrinA5 expression was detected in the septum in a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient (arrowhead in figure 4, panel f) and in the lateral migratory stream (Fig. 4d). The piriform (Fig. 4b), insular (Fig. 4d, h), cingulate (Fig. 4c), including the retrosplenial cortex (Fig. 4i), and the frontal cortex (Fig. 4e) exhibited

weak staining intensity. Moderate intensity of ephrinA5 expression was observed in the perirhinal cortex (Fig. 4n), in layers I and V in the occipital cortex (Fig. 4m) and in the primary somatosensory region of the parietal cortex (Fig. 4g). In the hippocampus, weak immunostaining was localized in the CA1 and CA3 regions, and in the dentate gyrus (Fig. 4l). In *diencephalic* structures, ephrinA5 expression was moderate in the thalamus, with the strongest immunoreactivity in the dorsal part, contrary to the previous stages, thus leading to a lateral and dorsal (high) to medial and ventral (low) gradient (arrowhead in figure 4, panel j). Weakly stained cells were detected in the hypothalamus (Fig. 4p).

In the *mesencephalon*, the commissure of the superior colliculus (dotted line in figure 4, panel o), the mesencephalic tegmentum (Fig. 4q) and the superior and inferior colliculi (Fig. 4r) exhibited ephrinA5 immunoreactive cells. EphrinA5 expression was however stronger in the inferior part of the colliculus than in the superior region, exhibiting a lateral (high) to medial (low) gradient (arrowhead in figure 4, panel r). The ventral mesencephalon was unstained (Fig. 4q).

In the *metencephalon*, the cerebellum and the pons were weakly stained (Fig. 4t).

Finally, cells from the neuroepithelia of the third (Fig. 4k, p) and fourth (Fig. 4u) ventricles, and the neuroepithelium of the aqueduct (Fig. 4q, r, s) exhibited high immunoreactivity.

EphrinA5 protein expression at P0

In newborn mice, ephrinA5 expression intensity was dramatically decreased in all regions of the brain, compared to the previous stage E18.5 (Fig. 5 a-q). In the *telencephalon*, we were however able to detect weakly stained cells in the olfactory structures: the granule cell layer (Fig. 5a), the olfactory subventricular zone (Fig. 5b), the olfactory tubercle (Fig. 5f), and the lateral olfactory tract (Fig. 5f). Moreover, ephrinA5 immunoreactive cells were observed in the subventricular zone (Fig. 5d), in the striatum (Fig. 5e, l), and in the nucleus accumbens

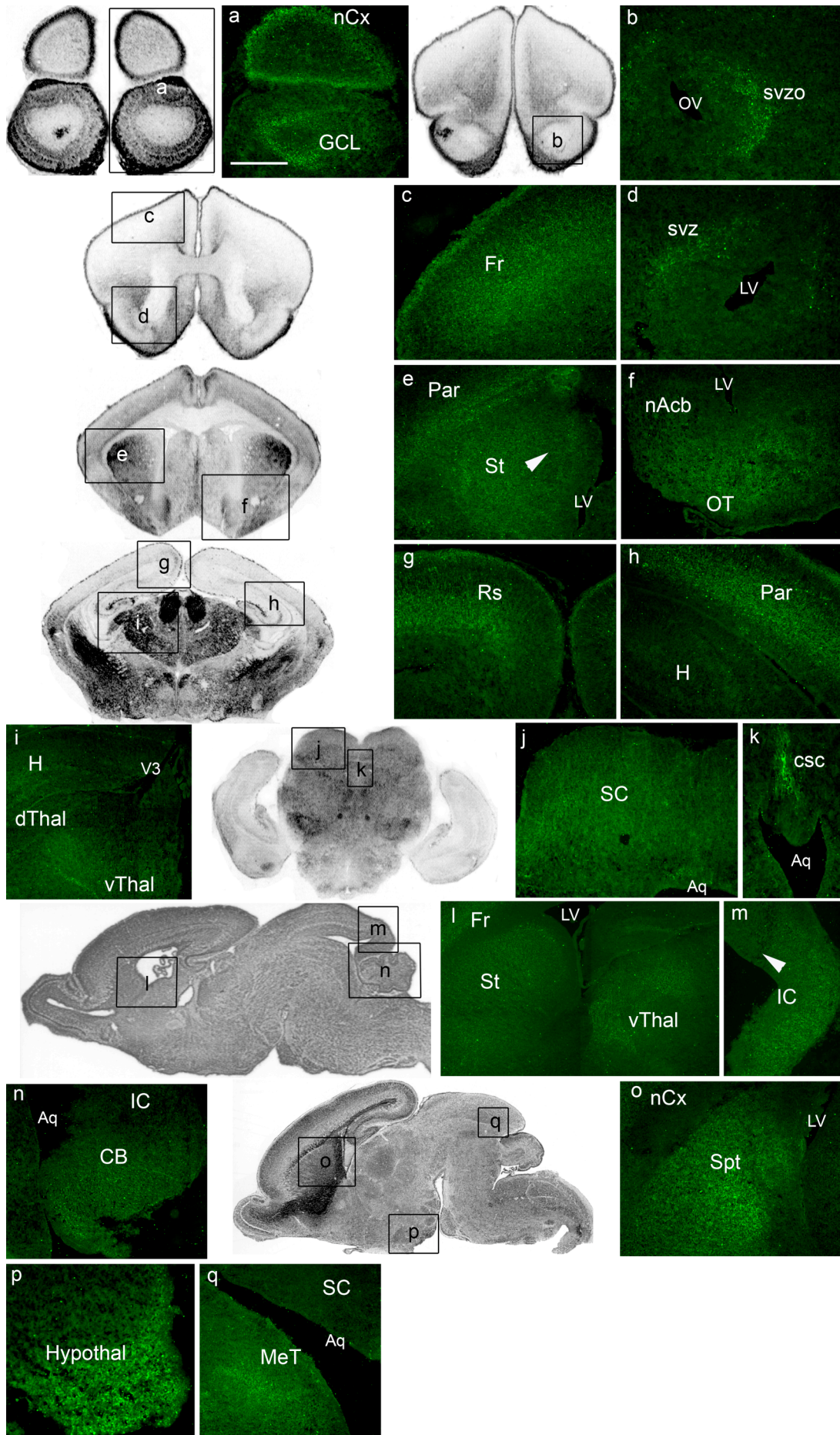


Figure 5 – EphrinA5 protein expression in newborn mouse brain. EphrinA5 protein distribution is represented on coronal sections in a rostro-caudal sequence (panels a to k) and on sagittal sections in a medio-lateral sequence (panels l to q). EphrinA5 protein expression dramatically decreased in all brain regions compared to previous stages. The strongest expression was observed in the septum (panel o) the hypothalamus (panel p) and in the superior colliculus commissure (dotted line in panel k). Arrowheads in panels e and m indicate respectively a discrete lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient in the striatum and a caudal (high) to rostral (low) gradient in the inferior colliculus. Scale bar: panel a: 250µm; panels b, m, p, q: 200µm; panels c, e, f, g, h, n: 300µm; panels d, k: 150µm; panels i, l: 500µm; panel j: 400µm; panel o: 350µm. Abbreviations: see list.

(Fig. 5f). In the striatum, we detected a discrete ephrinA5 expression gradient from the lateral and ventral (high) to the medial and dorsal (low) parts (arrowhead in figure 5, panel e). Moderate ephrinA5 staining was observed in the septum (Fig. 5o) whereas the parietal (Fig. 5e, h), the frontal (Fig. 5c) and the retrosplenial (Fig. 5g) cortices exhibited weak ephrinA5 protein expression. The hippocampus (Fig. 5h), the piriform, the occipital and the perirhinal cortices were unstained (data not shown).

Within the *diencephalic* structures, a very weak ephrinA5 signal was present in the dorsal and in the ventral part of the thalamus (Fig. 5i, l). The hypothalamus expressed moderate ephrinA5 protein expression level (Fig. 5p).

In the *mesencephalon*, the mesencephalic tegmentum (Fig. 5q) exhibited weakly immunostained cells as well as the superior (Fig. 5j) and inferior (Fig. 5m) colliculi. In the inferior colliculus, we however detected a caudal (high) to rostral (low) gradient (arrowhead in figure 5, panel m). The superior colliculus commissure exhibited moderate ephrinA5 immunoreactivity (dotted line in figure 5, panel k).

Within the *metencephalon*, weak ephrinA5 immunoreactivity was detected in the cerebellum (Fig. 5n).

Ventricles and Sylvius aqueduct's neuroepithelia were unstained (data not shown).

Overall, at P0, ephrinA5 protein expression decreased in all brain regions compared to previous stages. The strongest ephrinA5 protein expression was found in the septum, in the

	TELENCEPHALON	DIENCEPHALON	MESENCEPHALON	METENCEPHALON
E12.5	• Olfactory nerve	• Preoptic dz <i>l. v. ► m. d.</i>	• Mesencephalic tegmentum	• Isthmus
	• Neocortex	• Preoptic area		
	• Piriform cortex	• Ventral thalamus <i>v. r. ► d. c.</i>		• Cerebellum
	• LGE	• Hypothalamus <i>v. r. ► d. c.</i>		
	• LGE dz <i>l. v. ► m. d.</i>			
	• MGE dz <i>l. v. ► m. d.</i>			
E14.5	• Olfactory bulb	• Preoptic area	• Mesencephalic tegmentum	• Isthmus dz
	• Neocortex S1 (CP)	• Ventral thalamus <i>v. r. ► d. c.</i>	• Superior colliculus	
	• Piriform cortex	• Subthalamic area	• Inferior colliculus <i>l. ► m.</i>	• Cerebellar vermis
	• LGE <i>l. v. r. ► m. d. c.</i>	• Hypothalamus	• Pretectum <i>l. v. ► m. d.</i>	
	• Subventricular zone		• Superior colliculus commissure	
E16.5	• Olfactory structures – GCL – MCL – Olfactory tubercle – Lateral olfactory tract	• Preoptic area	• Mesencephalic tegmentum	• Isthmus
	• Septum	• Thalamus <i>v. r. ► d. c.</i>	• Superior colliculus	• Cerebellum
	• LGE <i>v. r. ► d. c.</i>			
	• Neocortex (MZ, CP, SP) • Frontal cortex • Parietal cortex (S1) • Insular cortex		• Hypothalamus	• Inferior colliculus <i>c. ► r.</i>
	• Retrosplenial cortex • Piriform cortex			
	• Hippocampus			
E18.5	• Olfactory structures – GCL – Olfactory tubercle – Lateral olfactory tract	• Thalamus <i>l. d. ► m. v.</i>	• Mesencephalic tegmentum	• Cerebellum
	• Striatum		• Superior colliculus	
	• Nucleus accumbens			
	• Septum <i>l. v. ► m. d.</i>			
	• Lateral migratory stream	• Hypothalamus	• Inferior colliculus <i>l. ► m.</i>	• Pons
	• Piriform cortex • Insular cortex • Cingulate cortex • Retrosplenial cortex • Frontal cortex		• Superior colliculus commissure	
	• Perirhinal cortex • Neocortex • Parietal cortex (S1) • Occipital cortex (layers I & V)			
	• Hippocampus (CA1, CA3, DG)			
PO	• Olfactory structures – GCL – Subventricular zone – Olfactory tubercle – Lateral olfactory tract	• Thalamus	• Mesencephalic tegmentum	• Cerebellum
	• Subventricular zone	• Hypothalamus	• Superior colliculus	
	• Striatum <i>l. v. ► m. d.</i>		• Inferior colliculus <i>c. ► r.</i>	
	• Nucleus accumbens		• Superior colliculus commissure	
	• Septum			
	• Parietal cortex • Frontal cortex • Retrosplenial cortex			

Table 1 – EphrinA5 protein distribution in the developing mouse brain. EphrinA5 was expressed in the same brain regions of the telencephalon, diencephalon, mesencephalon and metencephalon from E12.5, throughout the embryonic development until P0. The intensity of staining was high from E12.5 to E16.5 and then decreased until P0 to become non-existent in P7 animals (data not shown). Brain structures highlighted in dark grey, light grey and white exhibited respectively strong, moderate and weak or non-existent ephrinA5 protein expression. Black arrowheads indicate ephrinA5 protein expression gradients. Abbreviations: see list.

hypothalamus and in the superior colliculus commissure, although these protein expression levels were still moderate compared to the earliest developmental stages (Table 1).

Following P0, ephrinA5 expression was barely detectable.

Discussion

The present work describes for the first time, the distribution of ephrinA5 protein in the embryonic developing mouse brain. EphrinA5 protein expression appeared to be dynamic and complex, and particularly high from E12.5 to E16.5 in the olfactory bulb, the cortex, the LGE/striatum, the thalamus, and the colliculus. Its expression generally decreased from E18.5 to become very weak at P0. This transient expression during embryonic development is in line with published ephrinA5 transcript expression and with axon guidance and topographic mapping in the olfactory, the retinotectal, the thalamocortical, the corticothalamic and the mesostriatal systems. This indicates multiple functions of this molecule in the establishment of these systems, as discussed in the following sections.

Central olfactory system

To the best of our knowledge, the olfactory system is the only brain system, in which ephrinA5 expression has been studied at the protein level, using immunohistochemistry [35].

Our study is complementary to this one as it brings new data especially concerning the expression of the protein in the secondary olfactory neuron population.

Olfaction initiates in the nasal neuroepithelium where primary olfactory neurons reside, each one encoding a single odour receptor type [36,37]. These neurons send axons, forming the

olfactory nerve and project to the olfactory bulb in the rostro-ventral telencephalon, where they sort out and target specific glomeruli. Glomeruli are designed as contact zone between growth cones of the primary olfactory neurons and dendrites of secondary olfactory neurons, known as mitral and tufted cells located in the olfactory bulb [35]. Primary olfactory neurons, mitral and tufted cells are neurons supporting early synaptic relays of the mouse olfactory system and so arise in a relatively parallel fashion between E9.5 and E10.5 [38]. In our study, we showed for the first time that the olfactory nerve expressed ephrinA5 in early embryogenesis (E12.5), suggesting either an involvement of this molecule in the guidance of primary olfactory neurons into the olfactory bulb or, an implication of ephrinA5 in the fasciculation of primary olfactory axons inside the olfactory nerve, possibly through an interaction with EphA4- and/or EphA5-receptors, shown to be expressed during embryogenesis in the olfactory nerve [35].

Interestingly, we found that ephrinA5 was expressed in the mitral cell layer of the olfactory bulb, transiently during embryogenesis, at E16.5. The function of this molecule at this precise stage is still unclear but it may be implicated in the positioning of the mitral cell layer in the olfactory bulb. Indeed, ephrins are known to be involved in cell migration and boundary formation in other nervous systems [2,3], and at this stage the cell body of developing mitral cells appears to transform from tangential to radial orientation with rearrangement of its microtubules structure [39]. Moreover, the presence of potential ephrinA5 receptors such as EphA3 [40], EphB2 [41], EphA5 [35,42,43], EphA7 and EphA4 [35] has been also described in the mitral cells during embryogenesis. This suggests that ephrinA5 and its receptors are not expressed in complementary gradient as it has been described for other systems such as the retinotectal one [8,44]. Instead, we showed that ephrinA5 is uniformly expressed in this structure as for its receptors [40-42,35,20]. This ligand-receptor interaction may result in an attraction of the cells, thus regulating the connections of mitral cells. Indeed, this mechanism

has already been demonstrated in the accessory olfactory system, where axons expressing high levels of ephrinA5 project to regions of the accessory olfactory bulb that express high levels of EphA6, suggesting that EphA6-ephrinA5 interaction promotes adhesion or attraction between first and second order accessory neurones [17].

Later during embryogenesis, the mitral cells leave the olfactory bulb in the lateral olfactory tract, which synapses on five major regions of the mature telencephalon including the olfactory tubercle and the piriform cortex that project to the thalamus. We detected the expression of ephrinA5 protein from E16.5 on in the lateral olfactory tract and the olfactory tubercle. This expression was strong at E16.5, slightly diminished at E18.5 and became very weak at P0, suggesting that this molecule may be involved in the secondary olfactory neuron guidance, since its presence is concomitant to the development of this telencephalic pathway [45]. EphrinA5 expression in the lateral olfactory tract and olfactory tubercle may also have a role in the fasciculation of axons inside these structures, since fasciculation can be regulated by manipulating chemorepulsive interactions mediated by Eph receptors [46]. As axon pathfinding in olfactory map formation has been mainly investigated when primary olfactory axons enter the olfactory bulb glomeruli [47], our data give new insights concerning the guidance of the secondary mitral cell axons onto the thalamus.

Finally, we detected the presence of ephrinA5 protein in the piriform cortex at E12.5, earlier than the expression of this protein in the mitral cells and in the lateral olfactory tract that appeared at E16.5. This ephrinA5 expression in the piriform cortex dramatically decreased from E18.5, when the secondary olfactory axons connect this target [45]. This suggests that ephrinA5 protein expression in the piriform cortex during early embryogenesis may not be related to the connection of the axons of the lateral olfactory tract, but rather may play a role in the formation of the piriform cortex architecture.

Central visual system

Expression of ephrinA5 transcript has been extensively studied in this system and especially in the retinocollicular topographic mapping [10,48-50]. The results of our analysis were generally consistent with the findings of the past surveys describing the mRNA distribution of ephrinA5 in the 3 main targets of retinal ganglion cell axons: the thalamus, the pretectum, and the superior colliculus. Indeed, we showed that ephrinA5 protein is strongly expressed in these structures especially from E14.5 to E16.5 (Table 1), when the axons of the optic tracts reach their final destinations in the superior colliculus at E14 [30], and in the thalamic dorsal lateral geniculate nuclei at E16 [10]. This is in accordance with an implication of ephrinA5 in the topographic mapping of the visual connections especially in the superior colliculus [48-50]. It has to be noticed however, that ephrinA5 mRNA expression was described as soon as E12.5 in the developing superior colliculus [28,30], whereas we did not detect ephrinA5 protein in this structure earlier than E14.5. This suggests that ephrinA5 may be implicated in this topographic mapping only from E14.5, when the retinal connections reach the superior colliculus. On the contrary, in the thalamus and in the mesencephalic tegmentum, ephrinA5 protein level was elevated from E12.5 onwards. This expression seems to be too precocious to involve ephrinA5 in visual connection mapping and more probably may be implicated in the formation of other systems involving the thalamus, such as the thalamocortical system as discussed below, and the mesencephalic tegmentum, such as the rubrospinal system. EphrinA5 RNA is known to be expressed in a caudal (high) to rostral (low) gradient in the mouse superior colliculus [44,50,51]. This gradient is thought to be at the basis of the chemorepellent action of ephrinA5 on retinal ganglion cell's axons arising from the nasal part of the retina [50]. However, at the protein level, ephrinA5 expression was homogenous in the superior colliculus without any detectable expression gradient. As suggested by Greferath et al. [52] concerning EphA4 receptor expression in the striatum, this may be due to the fact that

the antibody localizes ephrinA5 protein in both cell bodies and axons bundles, whereas RNAs are concentrated in the cell somas. Moreover, studies describing the EphA5 protein expression in the developing mouse [43] did not detect any protein gradient expression.

Among studies exploring the expression of EphA-receptors at the protein level in the developing mouse brain, some showed that the potential ephrinA5 receptors EphA4 and EphA5, are expressed in the central visual system: EphA4 protein is present in the thalamus and superior colliculus from E11 to P6; and in the pretectal nucleus from E15 to P6 [52]. EphA5 protein is expressed in the geniculate nucleus of the thalamus from E17 as well as in the pretectum and the superior colliculus from E9 to E17 [43]. Together with our present work, these findings suggest a concomitant expression of ephrinA5 with (1) EphA4 and EphA5 in the superior colliculus, (2) EphA4 in the thalamus and (3) EphA5 in the pretectum. Moreover, a detailed analysis of protein gradients inside these regions may help to understand their interactions and their chemorepulsive or chemoattractive actions. However, it is unlikely that the co-expression of ligand and receptor in the same region of the visual system is responsible of an attractive mechanism, since it has been extensively shown, using in vitro studies and double ephrinA2/ephrinA5 knock-out mice [30,48-50], that the topographic map of the visual system is established by a chemorepellent activity of ephrinAs [50]. Nevertheless, it may be that ligands and receptors are present on the same cells, as it has been shown in the chick retinal ganglion cells, where ephrinA2, ephrinA5 and EphA5 mRNA are co-expressed [53]. In this case, the presence of ephrinA-ligand on the retinal ganglion cells could control the EphA-receptor function through a modulation of its intracellular signalling pathway [53].

Cortex and thalamocortical projections

We detected ephrinA5 protein in the developing cortex from E12.5 to E18.5 with an expression pattern becoming more complex as cortical layers were forming. We found a particularly strong signal at E16.5 in the primitive primary somatosensory cortex (S1), when thalamic axons reach the subplate zone. This is consistent with the presence of ephrinA5 mRNA in the subplate and cortical plate of S1 at this stage [22-24,27]. Indeed, ephrinA5 is thought to interact with and repulse ventrobasal thalamic terminal arbors expressing EphA4, and to be responsible for the precise topographic mapping of thalamic afferents into S1 [24]. Moreover, we showed a strong ephrinA5 protein expression in other regions of the developing cortex, especially in the parietal, frontal and insular cortices at E16.5, suggesting that ephrinA5 may be involved in the refinement of other thalamocortical projections and probably through an interaction with 3 potential receptors: EphA3, EphA4 and/or EphA5 that have been detected in these regions during mouse embryogenesis. Indeed, EphA3 protein is expressed in the cortical plate and cortical intermediate zone from E12 to P0, especially in thalamocortical axons [40]. EphA4 protein is expressed from E11 to P6 in the developing cortex [52], and EphA5 protein is present in the intermediate zone and cortical plate [43] whereas its transcript is expressed in the dorsal and medial thalamus that connect to the developing cortex [54], suggesting an expression of EphA5 protein in the thalamocortical projections.

Thalamus and corticothalamic projections

Previous studies showed different patterns of ephrinA5 mRNA expression, depending of the thalamic nuclei and the stage observed: at E13.5, Bolz *et al.* [27] described a weak mRNA expression in the ventricular zone of the dorsal thalamus at the caudal level with no detectable expression in the mid- or rostral levels of the dorsal thalamus. Feldheim *et al.* [10] described

ephrinA5 mRNA expression from E14.5, in the dorsal and ventral lateral geniculate nuclei in a ventral, lateral and anterior (high) to dorsal, medial and posterior (low) gradient. Between E16.5 and E18.5, nuclei of the lateral part of the dorsal thalamus [27] and ventral nuclei [29] both exhibit ephrinA5 mRNA. Our results partially match with these previous studies, as we showed here that ephrinA5 protein was strongly expressed in the thalamus in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient especially from E12.5 to E16.5. Interestingly, we observed that this gradient inverted from E16.5, when cortical axons connect the thalamus [55]. This is consistent with an implication of ephrinA5 in the corticothalamic projection establishment as proposed by Torii and Levitt [56] who hypothesized that the corticothalamic projections are directed by ephrinA-EphA signalling and more precisely that axons from sensory cortex find a precise target in the thalamus by responding to local levels of ephrinA5. In this region, ephrinA5 may interact with EphA4 protein, described in the thalamus from E13.5 to postnatal stages [52] to ensure the formation of terminal corticothalamic arbors.

Mesostriatal system

EphrinA5 protein was strongly expressed in the main target structure of the ventral mesencephalic axons: the lateral ganglionic eminence and later in development, the striatum. As described for mRNA levels [19,21], this expression was high from E12.5 to E16.5 and then diminished later in development. We observed a graduated ephrinA5 protein expression in a ventral and rostral (high) to a dorsal and caudal (low) gradient, that was not spatially concordant with the ephrinA5 RNA expression, described as not graded in developing striatum [57,19,21]. As we discussed in a previous work, it is likely that the presence of this ephrinA5 protein expression gradient helps mesencephalic neuron subpopulations to differentially connect the dorsal and ventral parts of the striatum during development [21].

No ephrinA5 protein was detected in the ventral mesencephalon from E12.5 to P0, suggesting that this protein was present exclusively at the target site of the mesostriatal projections, when the mesencephalic axons reach the LGE [58]. This strongly suggests that ephrinA5 may be involved in the refinement of mesencephalic arbors in the striatum especially by interacting with EphA5, expressed in the LGE between E13 and E17 [43] and in the ventral mesencephalon in the dopaminergic mesencephalic cells projecting to the LGE [21]. Finally, the implication of ephrinA5 in the mesencephalic projections onto the striatum is in accordance with previous work showing that disruption of EphA/ephrinA interactions resulted in the mistargeting of a fraction of mesencephalic dopaminergic projections [59].

Conclusion

In the present study we provide the first detailed description of ephrinA5 protein distribution in the embryonic developing mouse brain. We found that ephrinA5 is strongly expressed from E12.5 to E16.5, in the olfactory bulb, the cortex, the striatum, the thalamus, and the colliculi, suggesting its implication in topographic mapping of olfactory, retinotectal, thalamocortical, corticothalamic and mesostriatal systems. These new data may help to characterise the molecular basis of pathfinding of these systems, during development. Moreover, given the importance of developmental processes in brain repair, these results may open new tracks in the improvement of pathway restoration following cell transplantation in the damaged brain.

Methods

Animals

Housing of the animals and all animal experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry (decree

87849) and the European Communities Council Directive (86/609/EEC). All efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering.

Embryonic and postnatal C57Bl/6 mice of developmental stages E12.5, E14.5, E16.5, E18.5 and P0, were used in this study. E0.5 was defined as the plug date, and P0 as the date of birth. Pregnant mice were cervically dislocated prior embryo taking. Embryonic and newborn brains were dissected out, fixed in 4% PFA overnight and cryoprotected with 30% sucrose in 0.1M phosphate buffered saline (PBS) for 48h at 4°C. Two brains of each developmental stage were then frozen in cold isopentane and cut on a cryostat into sagittal and coronal 20µm-thick sections. Sections were stored at -80°C until immunohistochemistry processing.

Antibodies

Primary antibody directed against the C-terminal domain of ephrinA5 has been reported before [21]. This is a polyclonal goat anti-ephrinA5 antibody (sc-6075, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) that recognizes a 19 amino acid epitope that falls in the last 50 amino acids of the human ephrinA5 protein. This antibody was used at a dilution of 1:100. Secondary biotinylated rabbit anti-goat antibody was purchased from Vector (Burlingame, CA) and used at a dilution of 1:200.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as previously described in Deschamps et al, [21]. Briefly, the sections were rehydrated in 0.1M potassium phosphate buffered saline (KPBS) (0.9% NaCl, 0.08M K₂HPO₄, 0.02M KH₂PO₄), and then post-fixed with 4% PFA for 2h at room temperature (RT). After several washes with 0.1M KPBS, sections were incubated with a blocking solution (5% rabbit serum, 0.25% Triton-X100 in 0.1M KPBS) for 3h at RT to saturate non-specific sites. The anti-ephrinA5 antibody was then applied on sections overnight

at 4°C. After several washes with 0.1M KPBS, the sections were incubated with the secondary biotinylated antibody for 1h30 at RT. After extensive washing with 0.1M KPBS, ephrinA5 expression was visualized with neutravidinTM fluorescein conjugate (Molecular Probes, Eugene, USA), diluted at 1/200 in blocking solution, for 45min at RT. Following several washes with 0.1M KPBS, slides were covered with mowiol anti-fade mounting medium [60,61].

Immunostaining analysis

Sections were observed and photographed with a microscope (Olympus BX60F5) and camera setting (SPOT32, Diagnostic instruments, inc). Image brightness and contrast were adjusted with Adobe Photoshop in the same conditions for all pictures. Brain structures were identified using brain mouse atlases [62,63].

List of abbreviations

Am: amygdala

Aq: Sylvius aqueduct

Aq ne : Sylvius aqueduct neuroepithelium

Bst: bed nucleus of stria terminalis

c: caudal

CA1, 3: hippocampal area CA1, 3 (Ammon's Horn)

CB: cerebellum

CBv: cerebellar vermis

Cc: cingulate cortex

CP: cortical plate

d: dorsal

DG: dentate gyrus

dThal: dorsal thalamus

ec: external capsule

fn: fastigial nucleus

Fr: frontal cortex

GCL: granule cell layer

H: hippocampus

Hypothal: hypothalamus

IC: inferior colliculus

In: insular cortex

IS: isthmus

isdz: isthmus differentiating zone

KPBS: potassium phosphate buffered saline

l: lateral

LGE: lateral ganglionic eminence

LGE dz: lateral ganglionic eminence differentiating zone

lms: lateral migratory stream

lot: lateral olfactory tract

LV: lateral ventricle

m: medial

MCL: mitral cell layer

MeT: mesencephalic tegmentum

MGE: medial ganglionic eminence

MGE dz: medial ganglionic differentiating zone

MZ: marginal zone

nAcb: nucleus accumbens

nCx: neocortex

OB: olfactory bulb

Oc: occipital cortex

on: olfactory nerve

OT: olfactory tubercle

OV: olfactory ventricle

Par: parietal cortex

PB: phosphate buffer

PBS: phosphate buffered saline

PFA: paraformaldehyde

Pir: piriform cortex

poa: preoptic area

Preoptic dz: preoptic differentiating zone

PRh: perirhinal cortex

PT: pretectum

r: rostral

Rs: retrosplenial cortex

RT: room temperature

SC: superior colliculus

scc: superior colliculus commissure

SP: subplate

Spt: septum

St: striatum

sta: subthalamic area

svz: subventricular zone

svzo: olfactory subventricular zone

S1: primary somatosensory cortex

Thal: thalamus

v: ventral

VM: ventral mesencephalon

vThal: ventral thalamus

V3: third ventricle

V3 ne: neuroepithelium of the third ventricle

V4: fourth ventricle

V4 ne: neuroepithelium of the fourth ventricle

Authors' contributions

CD carried out the immunoassays and the image captures, participated to the analyses and interpretations of data, and wrote the manuscript.

MJ and AG contributed to the conception and design of the data, and revised critically the manuscript.

LP designed and coordinated the study, wrote the manuscript, and participated to the analyses and interpretations of data.

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by the French Ministry of Research, the CNRS, the University of Poitiers, Région Poitou-Charentes, Fondation pour la Recherche sur le Cerveau and Fondation de France. Authors certify to have no conflict of interest.

References

1. Flanagan JG, Vanderhaeghen P: The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 1998, 21:309-345.
2. O'Leary DD, Wilkinson DG: Eph receptors and ephrins in neural development. *Current Opinion in Neurobiology* 1999, 9:65-73.
3. Wilkinson DG: Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *Int Rev Cytol* 2000, 196:177-244.
4. Kullander K, Klein RS: Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3:475-86.
5. Pasquale EB: Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6:462-475.
6. Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M, Nikolov DB: Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci* 2004, 7:501-509.
7. Pasquale EB: Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. *Nat Neurosci* 2004, 7: 417-418.
8. Cheng HJ, Nakamoto M, Bergemann AD, Flanagan JG: Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 1995, 82:371-381.
9. Zhang JH, Cerretti DP, Yu T, Flanagan JG, Zhou R: Detection of ligands in regions anatomically connected to neurons expressing the Eph receptor Bsk: potential roles in neuron-target interaction. *J Neurosci* 1996, 16:7182-7192.
10. Feldheim DA, Kim YI, Bergemann AD, Frisen J, Barbacid M, Flanagan JG: Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron* 1998, 21:1303-1313.
11. Carvalho RF, Beutler M, Marler KJ, Knöll B, Becker-Barroso E, Heintzmann R, Ng T, Drescher U: Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nat Neurosci* 2006, 9:322-330.
12. Otal R, Burgaya F, Frisen J, Soriano E, Martinez A: Ephrin-A5 modulates the topographic mapping and connectivity of commissural axons in murine hippocampus. *Neuroscience* 2006, 141:109-121.
13. Eberhart J, Swartz ME, Koblar SA, Pasquale EB, Tanaka H, Krull CE: Expression of EphA4, ephrin-A2 and ephrin-A5 during axon outgrowth to the hindlimb indicates potential roles in pathfinding. *Dev Neurosci* 2000, 22:237-250.

14. Eberhart J, Barr J, O'Connell S, Flagg A, Swartz ME, Cramer KS, Tosney KW, Pasquale EB, Krull CE: Ephrin-A5 exerts positive or inhibitory effects on distinct subsets of EphA4-positive motor neurons. *J Neurosci* 2004, 24:1070-1078.
15. Miller K, Kolk SM, Donoghue MJ: EphA7-ephrin-A5 signaling in mouse somatosensory cortex: developmental restriction of molecular domains and postnatal maintenance of functional compartments. *J Comp Neurol* 2006, 496:627-642.
16. Cheng HJ, Flanagan JG: Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell* 1994, 79:157-168.
17. Knöll B, Isenmann S, Kilic E, Walkenhorst J, Engel S, Wehinger J, Bähr M, Drescher U: A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development* 2001, 128:895-906.
18. Cutforth T, Moring L, Mendelsohn M, Nemes A, Shah NM, Kim MM, Frisen J, Axel R: Axonal ephrin-As and odorant receptors: coordinate determination of the olfactory sensory map. *Cell* 2003, 114:311-322.
19. Passante L, Gaspard N, Degraeve M, Frisen J, Kullander K, De Maertelaer V, Vanderhaeghen P: Temporal regulation of ephrin/Eph signalling is required for the spatial patterning of the mammalian striatum. *Development* 2008, 135:3281-3290.
20. Cooper MA, Kobayashi K, Zhou R: Ephrin-A5 regulates the formation of the ascending midbrain dopaminergic pathways. *Dev Neurobiol* 2009, 69:36-46.
21. Deschamps C, Faideau M, Jaber M, Gaillard A, Prestoz L: Expression of ephrinA5 during development and potential involvement in the guidance of the mesostriatal pathway. *Exp Neurol* 2009, 219:466-80.
22. Castellani V, Yue Y, Gao PP, Bolz J: Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits. *J Neurosci* 1998, 18:4663-4672.
23. Gao PP, Yue Y, Zhang JH, Cerretti DP, Levitt P, Zhou R: Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrin-A5: implications in the development of thalamocortical projections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:5329-5334.
24. Vanderhaeghen P, Lu Q, Prakash N, Frisen J, Walsh CA, Frostig RD, Flanagan JG: A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex. *Nat Neurosci* 2000, 3:358-365.
25. Mann F, Peuckert C, Dehner F, Zhou R, Bolz J: Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development* 2002, 129:3945-3955.

26. Dufour A, Seibt J, Passante L, Depaepe V, Ciossek T, Frisen J, Kullander K, Flanagan JG, Polleux F, Vanderhaeghen P: Area specificity and topography of thalamocortical projections are controlled by ephrin/Eph genes. *Neuron* 2003, 39:453-465.
27. Bolz J, Uziel D, Mühlfriedel S, Güllmar A, Peuckert C, Zarbalis K, Wurst W, Torii M, Levitt P: Multiple roles of ephrins during the formation of thalamocortical projections: maps and more. *J Neurobiol* 2004, 59:82-94.
28. Donoghue LJ, Lewis RM, Merlie JP, Sanes JR: The Eph kinase ligand AL-1 is expressed by rostral muscles and inhibits outgrowth from caudal neurons. *Mol Cell Neurosci* 1996, 8:185-198.
29. Uziel D, Garcez P, Lent R, Peuckert C, Niehage R, Weth F, Bolz J: Connecting thalamus and cortex: The role of ephrins. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006, 288:135-142.
30. Frisen J, Yates PA, Mclaughlin T, Friedman GC, O'Leary DD, Barbacid M: Ephrin-A5(AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 1998, 20:235-243.
31. Ellsworth CA, Lyckman AW, Feldheim DA, Flanagan JG, Sur M: Ephrin-A2 and -A5 influence patterning of normal and novel retinal projections to the thalamus: conserved mapping mechanisms in visual and auditory thalamic targets. *J Comp Neurol* 2005, 488:140-151.
32. Knöll B, Drescher U: Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* 2002, 25:145-149.
33. Pfeiffenberger C, Tamada J, Feldheim DA: Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. *J Neurosci* 2006, 26:12873-12884.
34. Peuckert C, Wacker E, Rapus J, Levitt P, Bolz J: Adaptive changes in gene expression patterns in the somatosensory cortex after deletion of ephrinA5. *Mol Cell Neurosci* 2008, 39:21-31.
35. St John JA, Pasquale EB, Key B: EphA receptors and ephrin-A ligands exhibit highly regulated spatial and temporal expression patterns in the developing olfactory system. *Brain Res Dev Brain Res* 2002, 138:1-14.
36. Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Monbaerts P: Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J Neurosci* 2002, 22:3033-3043.
37. Hoffpauir BK, Marrs GS, Mathers PH, Spirou GA: Does the brain connect before the periphery can direct? A comparison of three sensory systems in mice. *Brain Res* 2009, 1277:115-29.
38. Blanchart A, De Carlos J.A, Lopez-Mascaraque L: Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb. *J Comp Neurol* 2006, 496:529-543.

39. Hinds JW, Ruffett TL: Mitral cell development in the mouse olfactory bulb: reorientation of the perikaryon and maturation of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 1973, 151:281-306.
40. Kudo C, Ajioka I, Hirata Y, Nakajima K: Expression profiles of EphA3 at both the RNA and protein level in the developing mammalian forebrain. *J Comp Neurol* 2005, 487:255-269.
41. St John JA, Key B: EphB2 and two of its ligands have dynamic protein expression patterns in the developing olfactory system. *Brain Res Dev Brain Res* 2001, 126:43-56.
42. St John JA, Tisay KT, Caras IW, Key B: Expression of EphA5 during development of the olfactory nerve pathway in rat. *J Comp Neurol* 2000, 416:540-550.
43. Cooper MA, Crockett DP, Nowakowski RS, Gale NW, Zhou R: Distribution of EphA5 receptor protein in the developing and adult mouse nervous system. *J Comp Neurol* 2009, 514:310-328.
44. Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Löschinger J, Noda M, Bonhoeffer F: In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 1995, 82:359-370.
45. Schwob JP, Price JL: The development of axonal connections in the central olfactory system of rats. *J Comp Neurol* 1984, 223:177-202.
46. Caras IW: A link between axon guidance and axon fasciculation suggested by studies of the tyrosine kinase receptor EphA5/REK7 and its ligand ephrin-A5/AL-1. *Cell Tissue Res* 1997, 290:261-264.
47. Mombaerts P: Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, 22:713-737.
48. O'Leary DD, Mclaughlin T: Mechanisms of retinotopic map development: Ephs, ephrins, and spontaneous correlated retinal activity. *Prog Brain Res* 2005, 147:43-65.
49. Mclaughlin T, O'Leary DD: Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annu Rev Neurosci* 2005, 28:327-355.
50. Lemke G, Reber M: Retinotectal mapping: new insights from molecular genetics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, 21:551-580.
51. Monschau B, Kremoser C, Ohta K, Tanaka H, Kaneko T, Yamada T, Handwerker C, Hornberger MR, Löschinger J, Pasquale EB, Siever DA, Verderame MF, Müller BK, Bonhoeffer F, Drescher U: Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO J* 1997, 16:1258-1267.
52. Greferath U, Canty AJ, Messenger J, Murphy M: Developmental expression of EphA4-tyrosine kinase receptor in the mouse brain and spinal cord. *Gene Expr Patterns* 2002, 2:267-274.

53. Hornberger MR, Dütting D, Ciossek T, Yamada T, Handwerker C, Lang S, Weth F, Huf J, Wessel R, Logan C, Tanaka H, Drescher U: Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron* 1999, 22:731-742.
54. Mackarehtschian K, Lau CK, Caras I, MacConnell SK: Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by ephrin-A5 expression. *Cereb Cortex* 1999, 9:601-610.
55. Auladell C, Pérez-Sust P, Supèr H, Soriano E: The early development of thalamocortical and corticothalamic projections in the mouse. *Anat Embryol* 2000, 201:169-179.
56. Torii M, Levitt P: Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism. *Neuron* 2005, 48:563-575.
57. Janis LS, Cassidy RM, Kromer LF: Ephrin-A binding and EphA receptor expression delineate the matrix compartment of the striatum. *J Neurosci* 1999, 19: 4962-4971.
58. Gates M, Coupe V, Torres E, Fricker-Gates R, Dunnett S: Spatially and temporally restricted chemoattractive and chemorepulsive cues direct the formation of the nigro-striatal circuit. *Eur J Neurosci* 2004, 19:831-844.
59. Sieber B, Kuzmin A, Canals J, Danielsson A, Paratcha G, Arenas E, Alberch J, Ogren S, Ibanez C: Disruption of EphA/ephrin-A signaling in the nigrostriatal system reduces dopaminergic innervation and dissociates behavioral responses to amphetamine and cocaine. *Mol Cell Neurosci* 2004, 26:418-428.
60. Osborn M, Weber K: Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structures. *Methods Cell Biol* 1982, 24:97-132.
61. Baschong W, Suetterlin R, Laeng RH: Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J Histochem. Cytochem* 2001, 49:1565-1572.
62. Jacobowitz DM, Abbott LC: Chemoarchitectonic atlas of the developing mouse brain. CRC Press Inc; 1998.
63. Schambra UB: Atlas of the prenatal mouse brain. Heidelberg: Springer Press; 2008.

CHAPITRE 2 : Implication de la protéine éphrine-A5 dans le développement des neurones dopaminergiques du système mésostriatal embryonnaire

I. RESUME	83
II. ARTICLE PUBLIE DANS LE JOURNAL <i>EXPERIMENTAL NEUROLOGY</i>	87
III. EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES	104
1. <i>Introduction</i>	104
2. <i>Approches techniques</i>	105
a. Animaux	105
b. Géotypage des souris éphrine-A5 -/-	105
c. Étude quantitative par western blot de la TH chez la souris éphrine-A5 +/+ et éphrine-A5 -/-	106
d. Étude de la progression de la voie mésostriatale après blocage de l'interaction éphrines/Eph, sur tranches sagittales de cerveau ex vivo	108
e. Immunohistochimie	109
3. <i>Résultats</i>	109
a. La quantité de TH est réduite dans le mésencéphale ventral d'embryon de souris éphrine-A5 -/-	109
b. Cartographie de la voie mésostriatale après blocage de l'interaction éphrines/Eph	110
4. <i>Discussion</i>	111
a. Diminution de la TH dans le système mésostriatal embryonnaire chez la souris éphrine-A5 -/-	111
b. Mise en évidence ex vivo d'une compensation fonctionnelle d'éphrine-A5 dans le guidage des fibres issues du mésencéphale ventral et exprimant la TH	114

Index des figures et tableau

- Figure XV – Tracé *ex vivo* de la voie mésostriatale marquée par un anticorps anti-TH, après blocage de l'interaction des récepteurs Eph avec les éphrines. _____ 109
- Figure XVI – Quantification de la TH dans le mésencéphale ventral/substance noire et dans le striatum de la souris éphrine-A5 +/+ et éphrine-A5 -/- , au stade embryonnaire E16,5 et chez l'adulte _____ 110
- Tableau IV – Nombre d'échantillons de tissu issu du striatum, de la substance noire ou du mésencéphale ventral utilisés pour chaque expérience de western blot anti-TH chez la souris adulte et l'embryon E16,5, éphrine-A5 +/+ et éphrine-A5 -/-. _____ 106

I. Résumé

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons testé l'implication de la protéine éphrine-A5 dans le développement des neurones dopaminergiques du système mésostriatal embryonnaire. En effet, les mécanismes moléculaires de guidage de ce système restent peu connus, contrairement à ceux impliqués notamment dans l'établissement des connexions neuronales des systèmes rétino-tectal et thalamocortical (Knöll et Drescher, 2002 ; Haupt et Huber, 2008 ; Maroof et Anderson, 2006). Dans le système mésostriatal, des neurones dopaminergiques issus du MV, constituant la SNc et l'ATV chez l'adulte, projettent dans le télencéphale sur le striatum après avoir traversé le diencephale, sous la forme d'un faisceau dénommé « MFB » (Gates *et coll.*, 2004). Ces connexions sont mises en place entre E12,5 et E18,5 chez la souris. Nakamura *et coll.* (2000) et Gates *et coll.* (2004) ont montré que des molécules chimioattractantes et chimiorépulsives devaient guider le MFB vers le striatum. Ainsi, les neurones dopaminergiques issus du MV seraient repoussés par le tronc cérébral et le cortex préfrontal, tandis que le MFB et le striatum les attireraient. La présence de plusieurs éphrines a été décrite dans le système mésostriatal en développement : éphrine-B2 est exprimée dans le striatum ventral, tandis que son récepteur EphB1 est exprimé dans le striatum et dans la SNc (Richards *et coll.*, 2007 ; Yue *et coll.*, 1999). Les éphrines-A1, A2, A3, A4 et A5 et les récepteurs EphA4 et A7 sont également exprimés dans le striatum (Janis *et coll.*, 1999), tandis que EphA5 est présent dans le MV (Yue *et coll.*, 1999). La signalisation éphrine-A/EphA jouerait un rôle indispensable dans le bon établissement des connexions mésostriatales, étant donné qu'une diminution de l'innervation du striatum a été mise en évidence lors du blocage de l'interaction des éphrines avec les Eph (Sieber *et coll.*, 2004). Ainsi, EphA5 et éphrine-A5, exprimés dans le MV et dans le striatum (Yue *et coll.*, 1999 ; Janis *et coll.*, 1999 ; Passante *et coll.*, 2008 ; Cooper *et coll.*, 2008 ; Cooper *et coll.*, 2009), pourraient participer au guidage axonal de la voie mésostriatale.

Dans cette étude, nous avons plus particulièrement mis en évidence l'expression de l'ARNm et de la protéine éphrine-A5 le long de la voie mésostriatale au cours du développement de E12,5 à P0, par hybridation *in situ* et immunohistochimie. Nous avons observé la présence de l'ARNm codant pour éphrine-A5 dans le noyau rouge, le thalamus, le striatum et le cortex, tandis que la protéine éphrine-A5 a été observée dans le thalamus, le cortex et le striatum selon un gradient ventro-dorsal et rostro-caudal décroissant. L'utilisation de la protéine chimérique EphA5 couplée au fragment Fc (EphA5-Fc) nous a également permis de mettre en évidence la présence d'autres éphrines-A dans le MV et dans le striatum. *In vitro*, en utilisant la technique de *stripe assay*, nous avons identifié l'influence répulsive de la protéine purifiée éphrine-A5 sur le guidage d'une partie des axones dopaminergiques issus d'explants de MV et prélevés chez l'embryon au stade E12,5. Nous avons montré, par immunohistochimie *in vitro* et *in vivo*, que les neurones dopaminergiques du MV expriment EphA5, tandis que la protéine EphA3 est exclusivement présente dans le cortex, comme précédemment décrit par Kudo *et coll.* (2005). Associé au fait que EphA4 n'ait pas été détecté dans le MV de la souris au cours du développement (Greferath *et coll.*, 2002) et que EphA7 ne soit que faiblement exprimé dans le MV entre E12,5 et E14,5 (Rogers *et coll.*, 1999), nos résultats suggèrent que EphA5 serait un bon candidat pour interagir avec la protéine éphrine-A5 présente dans l'environnement des axones dopaminergiques. Ces résultats nous ont ainsi permis de proposer un nouveau modèle de l'implication du couple éphrine-A5/EphA5 lors de l'établissement des projections mésostriatales. Via son interaction répulsive avec le récepteur EphA5 exprimé par les neurones dopaminergiques, la protéine éphrine-A5 exprimée dans le thalamus participerait au maintien des axones dopaminergiques dans le MFB, tandis que son gradient d'expression ventro-dorsal dans le striatum serait impliqué dans la mise en place des connexions topographiques. Trois sous-populations de neurones dopaminergiques seraient mises en jeu : une première sous-population de neurones dopaminergiques exprimant

fortement le récepteur EphA5 se connecterait sur la partie dorsale du striatum, tandis qu'une deuxième sous-population de neurones exprimant de plus faibles taux de récepteur EphA5 se connecterait sur le striatum ventral. Enfin, une troisième sous-population de neurones dopaminergiques n'exprimant pas le récepteur continuerait sa progression en direction du cortex préfrontal, n'étant pas influencée par la présence d'éphrine-A5 dans cette région.

Au cours du développement, nous avons observé une diminution de l'intensité du marquage de la TH, marqueur des neurones dopaminergiques, dans le MV et dans le striatum des souris éphrine-A5 *-/-*, confirmée par une étude quantitative en western blot. Le récepteur d'éphrine-A5, EphB2, étant exprimé dans le MV durant la prolifération des neurones dopaminergiques et ayant été impliqué dans ce processus développemental dans d'autres systèmes, il est probable que cette diminution de l'expression de la TH soit le résultat d'une diminution de la prolifération des neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral chez la souris éphrine-A5 *-/-*. En d'autres termes, éphrine-A5 aurait un effet mitogène sur les neurones dopaminergiques du MV, via le récepteur EphB2. En revanche, aucune altération majeure de la progression de la voie mésostriatale n'a été mise en évidence par immunohistochimie anti-TH, chez la souris éphrine-A5 *-/-*. Ceci suggère que d'autres éphrines, dont les éphrines-A détectées par utilisation de la protéine recombinante EphA5-Fc, pourraient aussi être impliquées dans ce processus et compenser la perte de fonction d'éphrine-A5. Ce même résultat a été obtenu lors du blocage des interactions des récepteurs Eph exprimés par les neurones dopaminergiques avec les éphrines présentes dans l'environnement sur des tranches de cerveaux de souris sauvages cultivées *ex vivo*. La signalisation directe via les récepteurs Eph ainsi abolie ne semble pas être, à elle seule, indispensable à la bonne progression de la voie mésostriatale au cours du développement.

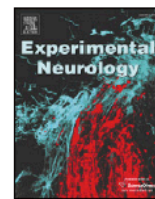
En conclusion, cette étude, présentée plus en détail dans l'article original publié dans

Experimental Neurology (2009) et les expériences complémentaires développées ci-après, propose une participation du couple éphrine-A5/EphA5 dans le développement des neurones dopaminergiques et l'établissement de la voie mésostriatale.

II. Article publié dans le journal *Experimental Neurology*

Expression of ephrinA5 during development and potential involvement in the guidance of mesostriatal pathway

C. Deschamps, M. Faideau, M. Jaber, A. Gaillard, L. Prestoz



Expression of ephrinA5 during development and potential involvement in the guidance of the mesostriatal pathway

C. Deschamps, M. Faideau, M. Jaber, A. Gaillard, L. Prestoz*

Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, CNRS, 40 avenue du Recteur Pineau, F-86022, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2008

Revised 18 June 2009

Accepted 24 June 2009

Available online 2 July 2009

Keywords:

Ephrin
Midbrain
Axon guidance
Dopamine
Tyrosine hydroxylase

ABSTRACT

Identifying guidance cues that direct axon growth to their final connections during development is of crucial interest if we aim to repair circuits damaged in adulthood following neurodegenerative disorders or common traumatic injuries. In this work, we set out to determine the ephrinA5 guidance molecule involvement in the establishment of the mouse mesostriatal pathway during development. We showed, *in vitro* and *in vivo*, that a proportion of mesencephalic dopaminergic cells express the ephrinA5 receptor, EphA5. Moreover, we observed, using stripe assays, that ephrinA5 purified protein has a repulsive effect on most of the mesencephalic dopaminergic projections. *In vivo*, we detected rostro-caudal and ventro-dorsal ephrinA5 protein expression gradients in the vicinity of the dopaminergic axons in the ventral telencephalon and in the striatum, during the embryonic and early postnatal development. In addition, other EphA5 ligands were also detected in the mesostriatal pathway. Together, these expression patterns suggest that, ephrinAs and more specifically ephrinA5, may be actors in the guidance of dopaminergic projections. Further studies will focus on identifying the molecular specificity of these guidance cues, taking into account the mesencephalic dopaminergic heterogeneous neuronal population. This may help increase the integration of neuronal transplants in the mature lesioned brain or provide tools to re-establish mesostriatal circuits *in vivo*.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Axonal growth and guidance resulting in the establishment of neuron connections in the mammalian nervous system mainly occur during embryogenesis when outgrowing axons have to travel long distances to reach their target neurons. Along their pathway, they are directed by attractive, repulsive, and adhesive guidance cues present in their local environment. Some of these are part of the extracellular matrix, others are secreted in the environment leading to a long-distance guidance or are cell membrane-anchored (Plachez and Richards, 2005; Dickson 2002; Chilton, 2006; Yamamoto et al., 2003). The identity and functions of these molecules have been well documented particularly for the retinotectal and the thalamocortical systems (Knöll and Drescher, 2002; Haupt and Huber, 2008; Maroof and Anderson, 2006).

However, in the mesostriatal dopaminergic system, the identity of chemoattractive and chemorepulsive signals guiding the dopaminergic axons to the striatum is still unclear. This system establishes itself during early embryogenesis: dopaminergic neuron somas located in two mesencephalic adjacent regions, the substantia nigra (SN) and the ventral tegmental area (VTA), send out projections forming the medial forebrain bundle (MFB) that connect to the dorsal and the ventral

striatum (Gates et al., 2004). During their travel to the striatum these dopaminergic projections cross diencephalic and telencephalic regions that are thought to produce local cues that guide them to their final target (Nakamura et al., 2000). Gates et al. (2004) have localized chemoattractive and chemorepulsive regions that may direct the nigro-striatal pathway through intermediate targets before its connection to the striatum. They showed that the MFB and the striatum have an attractive influence on mesencephalic axons expressing tyrosine hydroxylase (TH+ axons), while brain stem and cortical regions have an inhibitory effect. In return, the thalamus did not seem to have any influence on the guidance of these projections. Several conserved families of guidance molecules are thought to be responsible for these attractive, repulsive or inhibitory effects. Proteoglycans have a permissive or inhibitory effect on TH+ embryonic mesencephalic projections *in vitro* (Macé et al., 2002). Netrin and slit have an attractive and repulsive influence respectively, on mesencephalic dopaminergic projections *in vitro* (Lin and Isacson, 2006). *In vivo*, several studies have detected the expression of chemokines in the nigro-striatal system (Banisadr et al., 2003). A more recent study showed attractive and repulsive roles for semaphorin3C and semaphorin3F respectively expressed in the pretectum, whereas semaphorin3A expressed in the striatum was shown to enhance axon growth (Hernandez-Montiel et al., 2008).

In addition, several ephrin guidance molecules have been found to be expressed and involved in the mesostriatal pathway formation. Ephrins (As and Bs) constitute a large family of membrane-anchored

* Corresponding author. Fax: +33 5 49 45 40 14.

E-mail address: Laetitia.Prestoz@univ-poitiers.fr (L. Prestoz).

guidance molecules that participate in the refinement of the neuronal connections by cell-to-cell contact. Their action involves an Eph–ephrin (receptor–ligand) interaction inducing attraction or repulsion, adhesion or de-adhesion, and migration (Egea and Klein, 2007). Nine ligands (ephrinA1–A6 and ephrinB1–B3) and sixteen receptors (EphA1–A10, EphB1–B6) have been identified to date. EphrinB2 is expressed in the ventral striatum, and EphB1 is expressed in both striatum and the substantia nigra compacta (SNc) (Richards et al., 2007; Yue et al., 1999). SNc dopaminergic projections expressing EphB1 receptor are thought to interact with ephrinB2 ligand expressed in the ventral striatum, which might prevent these dopaminergic projections to connect to this structure.

Several EphAs–ephrinAs have also been detected in this system. EphrinsA1, A2, A3, A4, A5 and EphA4, A7 are expressed in the striatum (Janis et al., 1999) whereas EphA5 was mainly found in the ventral mesencephalon (Yue et al., 1999). EphrinAs–EphAs may play an important role in the establishment of the mesostriatal connections since disruption of EphA–ephrinA signaling in the nigro-striatal system reduces dopaminergic innervation to the striatum without changing the number of dopaminergic cells in the SN (Sieber et al., 2004). This suggests that less dopaminergic projections are able to reach the striatum in mice lacking EphA–ephrinA signaling. Overall, these studies are in favor of an involvement of ephrinAs in the mesostriatal pathway establishment. More specifically, EphA5 and ephrinA5, expressed in the ventral mesencephalon and in the striatum (Yue et al., 1999; Janis et al., 1999; Passante et al., 2008; Cooper et al., 2009a), may participate in the guidance of the mesostriatal axons.

In this study, we set out to identify the influence of ephrinA5 on dopaminergic mesencephalic axons *in vitro*, and to examine the expression of ephrinA5 protein along the mesostriatal pathway during development. For this, we used functional *in vitro* stripe assays, and *in vivo* ephrinA5 immunodetection on embryonic and newborn mouse brains. We showed that dopaminergic mesencephalic cells express the ephrinA5 receptor, EphA5, and are repulsed by ephrinA5-purified protein. Moreover, immunodetection of dopaminergic pathway along with the expression patterns of ephrinA5 in the developing mouse embryonic brain, suggested that ephrinA5 may play a role in the guidance of mesencephalic dopaminergic striatal projections. Finally, detection of other putative EphA5 ligands in the vicinity of the mesostriatal pathway and the absence of any alteration of this pathway in ephrinA5 knock-out mice, suggest that other ephrinAs, in addition to ephrinA5, may be involved in the establishment of this pathway.

Materials and methods

Animals

Housing of the animals and all animal experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry (decree 87849) and the European Communities Council Directive (86/609/EEC). All efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering.

Embryonic and postnatal C57Bl/6 wild type mice of different developmental stages (E12.5, E14.5, E16.5, E18.5, P0, P7) as well as 4 month old adults were used in this study. E0.5 was defined as the plug date, and P0 as the date of birth. Moreover, E16.5 embryonic and adult ephrinA5 knock-out (eA5KO) mice were used. These mice were kindly provided by Dr. P. Vanderhaeghen (Belgium).

Primary mesencephalic TH+ cell culture

Time-mated mice at 12.5 days of gestation were cervically dissected, embryos were taken and ventral mesencephalons were dissected out in HBSS (Gibco) 20% glucose on ice. To perform dissociated culture, 6 ventral mesencephalons from the same litter were pooled, 5 mg/ml trypsin was added and the total was incubated

at 37 °C for 15 min. Cells were then mechanically dissociated and the suspension was applied to coverslips containing 25 µg/ml poly-D-lysine (Sigma). Culture was carried out as described by Peng et al. (2005), for 4 days in 2% B27 supplement, 100 U/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine in a neurobasal medium.

Stripe assay

Stripe assays were as described (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2001; Prestoz et al., 2004; Knöll et al., 2007; Zimmer et al., 2007), with modifications. Briefly, acid-washed coverslips were incubated overnight in 0.2 mg/ml poly-D-Lysine (Sigma) in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) at 37 °C. Coverslips were rinsed several times with water, air-dried, and inverted onto a silicon matrix obtained from Dr. J. Jung (Max Planck Institute, Tübingen, Germany). Laminin (40 µg/ml, Sigma) and purified ephrinA5 extracellular domain fused to a Fc fragment (10 µg/ml; R and D Systems) or purified Fc fragment (10 µg/ml; Jackson Immunoresearch) were mixed in PBS, then injected into the matrix channels and incubated for 2 h at 37 °C. In the first set of experiments, the fusion protein ephrinA5-Fc or the Fc fragment alone was pre-clustered for 1 h at room temperature with a rabbit antibody to the Fc fragment of the human IgG (8 µg/ml; Jackson Immunoresearch, England). In the second experimental group, no pre-clusterisation was carried out. These two experimental conditions were tested to mimic the oligomerization and clustering occurring *in vivo*, when the Eph receptor interacts with its ligand (Himanen and Nikolov, 2003).

A blocking solution of fluorescent Alexa 488-conjugated bovine serum albumin (BSA) (2% in PBS, Molecular Probes) was then injected into the channels. After 2 h of incubation at 37 °C, the channels were rinsed four times by PBS injection. The coverslips were then removed, rinsed in PBS and coated with 10 µg/ml laminin (2 h incubation) to provide a general growth-promoting environment (Knöll et al., 2007). E12.5 mesencephalon 0.5 mm wide explants were placed on the stripes and cultured for 4 days in the medium described above. Dopaminergic axons growing out of these explants were visualized using TH immunolabeling after fixation with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS.

In situ hybridization of ephrinA5 mRNA

In situ hybridization was as described (Vanderhaeghen et al., 2000; Feldheim et al., 1998), with modifications. Adult mice were given a lethal dose of avertin before transcardial perfusion with 4% PFA in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.3). E12.5, E14.5, E16.5, E18.5, P0, P7 and adult brains were dissected out, fixed in 4% PFA overnight and cryoprotected with 30% sucrose in 0.1 M PBS for 48 h at 4 °C. Brains were then frozen in cold isopentane and cut into 16 µm sagittal and coronal sections on a cryostat. Sections were stored at –80 °C until use.

Specific digoxigenin-labeled cRNA probe was transcribed from a pBSK plasmid kindly provided by Dr. P. Vanderhaeghen (Belgium) and containing the specific DNA sequence of ephrinA5. Message complementary (antisense) and noncomplementary (sense) RNA probes were produced using T7 and T3 RNA polymerases respectively (Riboprobes® System-T7, Promega Corporation, Madison, USA). These probes were diluted in hybridization buffer (50% formamide, 1× Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 1 mg/ml yeast tRNA solution) at a final concentration of 500 ng/ml and hybridized overnight at 65 °C in a humidified chamber on sections of embryonic, postnatal and adult brains. The following day, sections were washed in 1× sodium saline citrate (SSC), 50% formamide, 0.1% Tween 20 at 65 °C, and in MABT buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M Maleic acid, 0.2 M NaOH, 0.1% Tween 20, pH 7.5) at room temperature (RT). After blocking in 10% B10 reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 10% sheep serum, sections were incubated overnight at RT with an alkaline phosphatase-labeled anti-digoxigenin antibody (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) diluted 1:2000 in blocking

buffer. Sections were finally washed with NTMT buffer (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH 9.5, 0.05 M MgCl₂, 0.1 M Tween 20, pH 9.5) before being incubated in detection buffer containing 0.045% nitroblue tetrazolium, 0.35% 5-bromo-4-chloro-3-idolyl phosphate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 0.1% levamisole (Sigma) in NTMT buffer. Slides were then dehydrated through graded concentrations of ethanol, cleared in toluene, and then mounted with Depex (BDH Laboratories, Poole, England). All results with antisense probes were compared with control probes and were confirmed by testing two to four animals for each stage. Sections were observed and photographed with a stereomicroscope and camera setting (Nikon, SMZ1500). Image brightness and contrast were retouched with Adobe Photoshop software.

Immunocytochemistry on mesencephalic explants and dissociated cells

After fixation, mesencephalic explants and dissociated cells were washed in PBS, then blocked in PBS containing 3% BSA and 0.3% Triton-X100. Anti-TH immunocytochemistry was performed on mesencephalic explants and double anti-TH and anti-EphA5 immunoreactions were performed on dissociated cells. Monoclonal mouse anti-TH antibody (Immunostar, Hudson, USA) and polyclonal rabbit anti-EphA5 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) were diluted at 1:5000 and 1:50 respectively in blocking buffer and incubated at 4 °C overnight. The following day, after several washes in PBS, TH+ and EphA5 cells were respectively visualized using an Alexa fluor[®] 568 goat anti-mouse secondary antibody (Invitrogen) and an Alexa fluor[®] 488 goat anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen) diluted in 1:200 in PBS and incubated for 1 h. Explants and cell cultures were finally washed in PBS and mounted on slides with Mowiol mounting medium (Osborn and Weber, 1982; Baschong et al., 2001). Immunocytochemistry was observed and photographed with a confocal laser scanning microscope setting (FV1000; Olympus). TH+ axons growing on the stripes out of the explants were counted as described in *Statistical analysis*.

Immunohistochemistry on developing brain sections

Following in situ hybridization, brain sections were post-fixed with 4% PFA for 1 h and TH immunological detection was performed as described above with minor modifications. Briefly, following the incubation with anti-TH antibody, the sections were incubated with biotinylated rat anti-mouse antibody (1/200) (Vector Burlingame, CA) at RT for 1 h 30 min. The sections were then washed, incubated with 0.3% hydrogen peroxide (Sigma, Seelze, Germany) to quench endogenous peroxidases and reacted with avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain[®] ABC Kit, Vector, Burlingame, CA) at RT for 1 h. The sections were subsequently incubated in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH7.3) containing 0.5 mg/ml 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St Louis, USA) and 0.003% hydrogen peroxide. Slides were dehydrated through graded concentrations of ethanol, cleared in toluene, and then mounted with Depex (BDH, Poole, England).

EphrinA5 detection was carried out by fixing 20 µm brain E12.5, E14.5, E16.5, E18.5, P0, P7 and adult sagittal and coronal sections with 4% PFA for 2 h. After several washes with 0.1 M KPBS (0.9% NaCl, 0.08 M K₂HPO₄, 0.02 M KH₂PO₄), sections were incubated with a blocking solution (5% rabbit serum, 0.25% Triton-X100 in 0.1 M KPBS) for 3 h at RT, then incubated with polyclonal goat anti-ephrinA5 antibody (1/100) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) overnight at 4 °C. After washes, the sections were incubated with biotinylated rabbit anti-goat secondary antibody (1/200) (Vector, Burlingame, CA) at RT for 1 h 30 min. The sections were then washed and ephrinA5 expression was visualized with neutravidin[™] fluorescein conjugate (1/200) (Molecular Probes, Eugene, USA) at RT for 45 min. After several washes, slides were covered with Mowiol mounting solution (Osborn and Weber, 1982; Baschong et al., 2001).

Double labeling of ephrinA5 and dopamine transporter (DAT) was carried out by fixing E16.5 and E18.5 brain sagittal sections with 4% PFA for 2 h. After several washes in 0.1 M KPBS sections were blocked in 0.1 M KPBS containing 3% bovine albumin serum, 2.5% horse serum and 0.3% Triton-X100 for 3 h at RT. Polyclonal goat anti-ephrinA5 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) and polyclonal rabbit anti-DAT antibody kindly provided by Dr. B. Bloch (Bordeaux, France) were diluted at 1:100 and 1:5000 respectively in blocking buffer and incubated at 4 °C overnight. The following day, after several washes in 0.1 M KPBS, ephrinA5 and DAT labeling was visualized by incubating sections with secondary antibodies: an Alexa fluor[®] 488 donkey anti-goat (Invitrogen) for 45 min at RT, and an Alexa fluor[®] 568 donkey anti-rabbit (Invitrogen) for 10 min at RT, respectively diluted at 1:200 and 1:400 in blocking buffer. After several washes, slides were covered with Mowiol (Osborn and Weber, 1982; Baschong et al., 2001).

EphA5, EphA3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) and TH immunodetection were performed on E16.5 embryonic brains. Moreover, to compare TH immunostaining of the mesostriatal pathway in wild type (WT) mice and in ephrinA5 knock-out (eA5KO) mice, TH immunodetection was carried out on E16.5 eA5KO embryonic brains. Embryonic brains were embedded in 4% low-melting agarose (Sigma), cut into 300 µm sagittal sections using a vibratome (Leica) and were fixed with PFA 4%, for 15 min for EphA5 and EphA3 immunostaining, and for 3 h for TH immunolabeling.

Anti-TH immunostaining was carried out as described above for explants and dissociated cells, with modifications. After 4 h saturation in blocking solution (3% milk, 0.3% triton X100 in Tris-buffered saline (TBS) 0.1 M), monoclonal anti-TH antibody was diluted at 1:5000 in blocking solution and incubated for 3 days at 4 °C on floating sections. After several washes in TBS, TH was visualized using an Alexa fluor[®] 488 goat anti-mouse secondary antibody (Invitrogen) diluted in 1:400 in blocking solution and incubated for 30 min.

Anti-EphA5 or anti-EphA3 immunostaining was carried out by incubating anti-EphA5 or anti-EphA3 polyclonal antibody at 1:100 in blocking solution (3% BSA, 0.3% triton X100 in PBS 0.1 M), after 2 h of saturation in the same solution. After 3 days at 4 °C, anti-rabbit biotinylated antibody was incubated at 1:200 in PBS for 1 h 30 min at RT. The presence of EphA5 or EphA3 was visualized using avidin-488 diluted at 1:200 in PBS and incubated for 1 h on floating sections.

Double labeling EphA5 and TH was performed as for single immunostaining except that TH was visualized using an Alexa fluor[®] 568 goat anti-mouse secondary antibody (Invitrogen) diluted in 1:600 in blocking solution and incubated for 30 min.

After immunostaining, free-floating sections were extensively washed in PBS and mounted on slides with Mowiol mounting medium (Osborn and Weber, 1982; Baschong et al., 2001). Sections were observed and photographed with a confocal laser scanning microscope setting (FV1000; Olympus) equipped with XY motorized stage (Proscan II, Prior). Multiposition images for large field were acquired with FV10-ASW v1.6 software (Olympus) and further assembled with Adobe Photoshop. Image brightness and contrast were retouched with Adobe Photoshop and brain structures were identified using brain mouse atlases (Kaufman, 1992; Jacobowitz and Abbott, 1998).

Immunohistochemistry on adult brain sections

The integrity of the adult mesostriatal pathway between WT and eA5KO mice was compared using TH immunodetection on sagittal adult brain sections. For this, adult mice were given a lethal dose of avertin before transcardial perfusion with 4% PFA in 0.1 M PB. Brains were dissected out, fixed in 4% PFA overnight and cryoprotected with 30% sucrose in 0.1 M PBS for 48 h at 4 °C. Brains were then frozen and cut into 40 µm sagittal sections on a microtome (Microm). Briefly, following the incubation with anti-TH antibody, the floating sections were incubated with biotinylated rat anti-mouse antibody (1/200) (Vector Burlingame, CA) at RT for 1 h 30 min. The sections were then

washed, treated with 0.3% hydrogen peroxide (Sigma, Seelze, Germany) to quench endogenous peroxidases and reacted with avidin–biotin peroxidase complex (Vectastain[®] ABC Kit, Vector, Burlingame, CA) at RT for 1 h. The sections were subsequently incubated in 0.1 M PB containing 0.33 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St Louis, USA) and 0.0006% hydrogen peroxide. The sections were mounted on slides, cleared in toluene, and then covered with Depex (BDH, Poole, England).

EphrinA5Fc ligand and EphA5Fc receptor binding

Ligand and receptor affinity probe in situ staining (LAPIS and RAPIS) were used to identify respectively the location of the membrane bound Eph receptors that bind ephrinA5 ligand and the location of the membrane ephrin ligands that bind EphA5 receptor. EphrinA5 and EphA5 affinity probe staining were performed as previously described (Willson et al., 2006; Washburn et al., 2007), with modifications. Briefly, E14.5 14 μ m brain sections were blocked in HBTSA (0.05% sodium azide, 0.5 mg/ml BSA, 20 mM Tris pH 7.4, 3% sheep serum, 0.1% Triton X100 in Hank's medium) for 2 h at RT. Then, ephrinA5Fc or EphA5Fc (R&D systems) was applied to the sections overnight in a humidified chamber at 4 °C at a concentration of 10 μ g/ml in blocking solution. After extensive washes in PBS, sections were fixed with 4% PFA for 15 min at 4 °C. Before application of blocking solution for 1 h at RT, sections were incubated for 15 min in TBS at 67 °C to reduce endogenous alkaline phosphatase activity. Then, sections were incubated with alkaline phosphatase conjugated anti-human IgG-Fc specific antibody (Jackson Immunoresearch, England) at 1:250 in HBTSA:PBS (1:1) for 1 h at RT. Sections were finally washed, developed in NBT/BCIP solution and mounted as described for in situ hybridization. A direct hybridization of alkaline phosphatase conjugated anti-human IgG-Fc specific antibody without ephrinA5Fc or EphA5Fc protein, served as negative controls.

Statistical analysis

To test the significance of ephrinA5 repulsive effect on mesencephalic TH+ axons, we proceeded as described elsewhere (Mann et al., 1998; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2001; Prestoz et al., 2004). We quantified the number of axons growing from mesencephalic explants OUT and ON ephrinA5Fc-containing stripes and Fc fragment-containing stripes. We counted TH+ axons growing out of 9 and 7 explants on respectively pre-

clustered eA5Fc and Fc stripes and axons of 20 and 13 explants on respectively non pre-clustered eA5Fc and Fc stripes. The mean ratio OUT/ON was calculated in each condition and the difference was analyzed using the non-parametric Mann–Whitney test ($p < 0.05$; *).

Moreover, to investigate the outgrowth of TH+ axons in these stripe assays, we counted the maximum length of 10 TH+ axon bundles growing on ephrinA5Fc stripes, from the edge of the explant, and compared it with the maximum length of 17 TH+ axon bundles growing on Fc stripes. Axons that grew exclusively or partly on laminin control stripes were excluded from the quantification. We included in the quantification, axons that exclusively grew on ephrinA5Fc or on Fc stripes. The significance of length difference between TH+ axon bundle grown on ephrinA5Fc stripes and TH+ axon bundle grown on control Fc stripes, was tested using the non-parametric Mann–Whitney test ($p < 0.05$; *).

Results

Mesencephalic TH+ axons are repulsed by ephrinA5 in vitro

As stripe assay is described as a suitable method to assess guidance activity of established molecules such as ephrins (Knöll et al., 2007), we used this assay to determine whether mesencephalic TH+ axon guidance could be influenced by ephrinA5 purified protein. E12.5 embryonic mesencephalons were dissociated and cultivated for 4 days on stripes containing ephrinA5-Fc (eA5Fc) or Fc fragment (Fc) that were pre-clustered or not. In both pre-clustered and non pre-clustered conditions, TH+ axons were repulsed from the eA5Fc stripes. This repulsion was complete in pre-clustered conditions in 5 out of 9 mesencephalic explants as illustrated in Fig. 1 panel a. However, the presence of Fc stripes, used as a control, did not affect the guidance of TH+ projections (Fig. 1 panel b). To confirm these observations, we counted the number of projections growing outside the eA5Fc-coated stripes (OUTeA5Fc) and the number of projections growing on eA5Fc coated stripes (ONeA5Fc). As described in Materials and methods and performed elsewhere (Mann et al., 1998; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2001; Prestoz et al., 2004), we calculated the mean ratio OUTeA5Fc/ONeA5Fc. This ratio was significantly different with Fc fragment alone (7.5 ± 3.3) compared to the ratio with eA5Fc protein (104.7 ± 41.9) in pre-clustered conditions ($p < 0.05$) (Fig. 1 panel c). In non pre-clustered conditions, the two ratios were still significantly different for the OUTFc/ONFc mean ratio (5.5 ± 3.2) and the

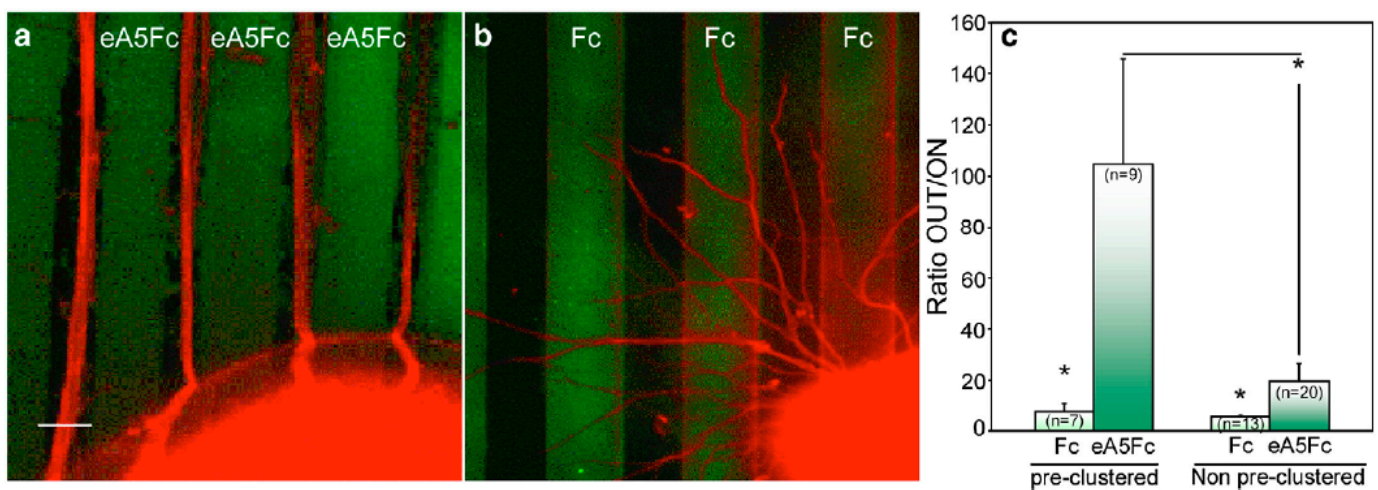


Fig. 1. EphrinA5Fc coated stripes repel mesencephalic TH+ axons. Ventral mesencephalon explants were grown in vitro either on ephrinA5Fc containing stripes (panel a in green) or on control Fc containing stripes (panel b in green); here is an example in pre-clustered conditions (cf. Materials and methods). Dopaminergic axons were visualized using anti-TH mAb (red) and counted. The ratios: number of TH+ axons growing out of the ephrinA5Fc (or Fc)/number of TH+ axons growing on the ephrinA5Fc (or Fc) stripes are presented in panel c for pre-clustered and non-clustered protein conditions. In both conditions, ephrinA5Fc significantly repulsed TH+ axons in comparison to control Fc ($p < 0.05$). Scale bar: a, b: 35 μ m.

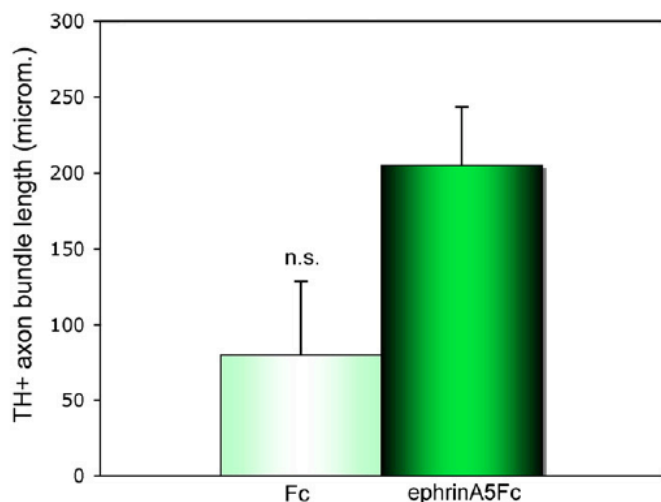


Fig. 2. EphrinA5Fc increases not significantly the length of TH+ axon bundles in the stripe assay. The TH+ axon bundle length is represented for axons growing exclusively on control Fc stripes ($n=17$) and on ephrinA5Fc stripes ($n=10$). The difference was not significant (n.s.).

OUTeA5Fc/ONeA5Fc mean ratio (19.5 ± 6.9) ($p < 0.05$) (Fig. 1 panel c). Note that the mean ratio OUTeA5Fc/ONeA5Fc was significantly higher in pre-clustered conditions compared to non pre-clustered conditions ($p < 0.05$) suggesting that the repulsive effect of eA5Fc was stronger when mimicking the oligomerization and clustering occurring in vivo following an Eph–ephrin interaction (Himanen and Nikolov, 2003). Furthermore, as ephrinA5 interaction with its receptor in vivo has been shown to involve large assemblies of receptor ligands, it would possibly lead to stronger guidance behavior than the one witnessed in vitro.

To test the effect of ephrinA5 on TH+ axon outgrowth in our stripe assays, we counted the maximum length of TH+ axon bundles

growing exclusively on ephrinA5Fc stripes, and compared it with the maximum length of TH+ axon bundles growing exclusively on Fc stripes. As shown in Fig. 2, TH+ axons grew $80 \mu\text{m}$ ($+48$) from the edge of the explant, on Fc stripes, whereas TH+ axons grew at $205 \mu\text{m}$ ($+38$) on eA5Fc stripes. Thus, the presence of ephrinA5, compared to control Fc, tends to increase 2.5 times TH+ neurite outgrowth, although this result was not significant ($p = 0.1320$).

As mesencephalic TH+ projections were guided by ephrinA5-purified protein, we tested the presence of EphA5 receptor on these dopaminergic cells. After E12.5 embryonic mesencephalon dissociation and 4 days in culture, 26% of TH+ neurons were found to express EphA5 receptor (Fig. 3 panels a to c). In vivo, in E16.5 embryonic ventral mesencephalon, 60.5% of the TH+ cells were found to express EphA5 receptor (Fig. 3 panels d to f).

Dopaminergic mesostriatal projections establishment from E12.5 to P7 in the mouse

Mesencephalic dopaminergic cells were visualized by immunohistochemical reaction against TH enzyme on sagittal sections of embryonic brains from E12.5 to adult stage (shown in brown in Figs. 4 and 5). At E12.5, TH+ neuron somas were located in the ventral mesencephalon (Fig. 4 panel a). Axons grew in the diencephalon forming the MFB ventrally to the thalamus to reach the caudal region of the lateral ganglionic eminence (LGE or striatum primordium) (Fig. 4 panels b and c). At this stage TH+ projections were detected neither ventrally of the LGE nor inside this structure. Between E12.5 and E14.5, TH+ projections grew in a rostral direction to connect to the LGE (Fig. 4 panel f). At E14.5 and E16.5, TH+ axons invaded the striatum (Fig. 4 panels f and i) and from E18.5 we observed a distinct ventro-dorsal distribution of the TH+ projections mainly concentrated in the ventral part of the striatum (Fig. 4 panel l). From this stage to P7, the TH+ axons were clearly distributed towards the dorsal part of the striatum (Fig. 5 panel c). At P7 and in the adult, TH+ axons were connected to the entire striatum (Fig. 5 panels f and i).

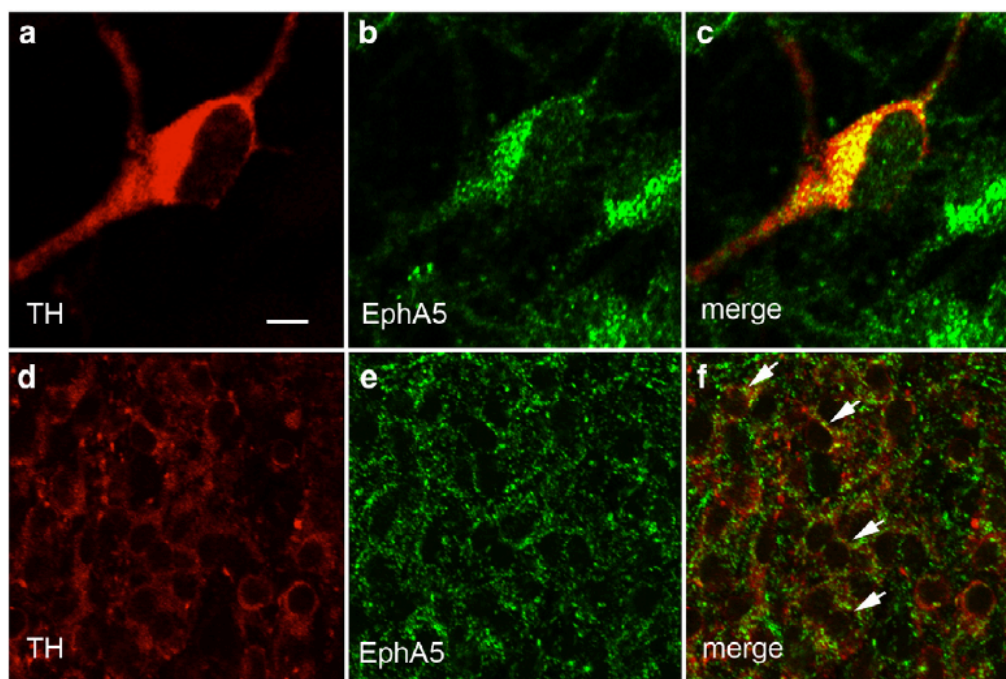


Fig. 3. Mesencephalic TH+ axons express EphA5 receptor. Panels a to c: In vitro double immunocytochemistry performed on dissociated embryonic ventral mesencephalon cells showed that TH+ cells (panel a in red) express EphA5 receptor (panel b in green). A merged picture is shown on panel c. Panels d to f: In vivo double immunohistochemistry performed on E16.5 embryonic brain sagittal section showed that, in the ventral mesencephalon, TH+ cells (panel d in red) express EphA5 receptor (panel e in green). A merged picture is shown on panel f, arrows indicate double stained cells. Scale bar: a–c: $6 \mu\text{m}$; d–f: $15 \mu\text{m}$.

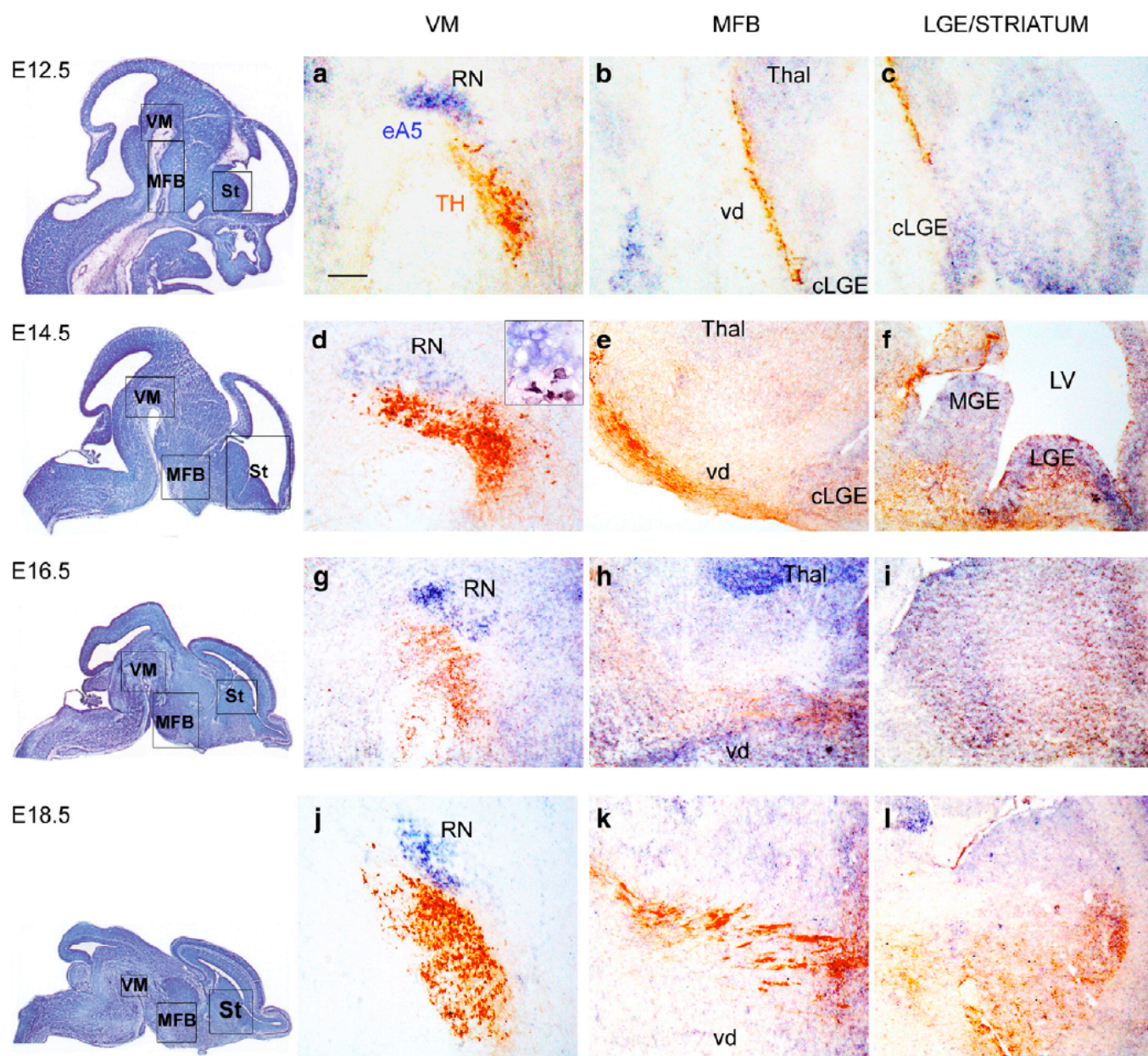


Fig. 4. EphrinA5 mRNA is expressed during embryogenesis in the mesostriatal pathway. In situ hybridization was performed to detect ephrinA5 mRNA expression (blue) on E12.5, E14.5, E16.5 and E18.5 brain sagittal sections. On the same sections, the mesostriatal pathway was visualized using anti-TH mAb (brown). Results are presented for three main regions: the ventral mesencephalon (VM), the medial forebrain bundle (MFB) and the lateral ganglionic eminence (LGE) or striatum. At E12.5, TH+ neuron somas were located in the ventral mesencephalon (panel a). Axons grew in the diencephalon ventrally to the thalamus to reach the caudal region of the LGE before E14.5. From E14.5, the TH+ axons invade the striatum (panel f). EphrinA5 mRNA was found to be mainly expressed in the ventral mesencephalon dorsally to the TH+ somas (panels a, d, g, j), in the thalamus (panels b, h), and in the striatum (panels c, f, i, l). Scale bar: panels a, b, c: 90 μ m; d, e, f: 110 μ m; g, h, i: 200 μ m; j, k: 190 μ m; l: 240 μ m; Abbreviations: see Glossary.

EphrinA5 mRNA are expressed in the vicinity of the mesostriatal dopaminergic pathway

We performed ephrinA5 mRNA detection using in situ hybridization approach on the same TH immunostained sections. We detected ephrinA5 mRNA along the mesostriatal pathway in the vicinity of the TH+ signal in three main regions: the ventral mesencephalon, the MFB and the striatum, as shown in blue in Figs. 4 and 5.

In the ventral mesencephalon, ephrinA5 mRNA was expressed dorsally to the TH+ neurons. The expression appeared restricted and intense from E12.5 to P0 and was localized in the red nucleus (Jacobowitz and Abbott, 1998) (Figs. 4 panels a, d, g, j and 5 panel a). The insert, in Fig. 4 panel d, shows ephrinA5 mRNA expression at higher magnification lining dorsally the TH expression. This expres-

sion was diminished at P7 (Fig. 5 panel d) and was not detected in the adult (Fig. 5 panel g).

EphrinA5 mRNA was expressed in the thalamus dorsally to the MFB from E12.5 to P0 (see Figs. 4 panel h and 5 panel b for ephrinA5 mRNA expression at respectively E16.5 and P0). This expression became weaker at P7 (Fig. 5 panel e) and was not detected in the adult (Fig. 5 panel h).

In the LGE or striatum, ephrinA5 mRNA was expressed from E12.5 to P0 with a variable pattern of expression depending on the stage observed (Figs. 4 and 5). Indeed, ephrinA5 mRNA showed a ventro-dorsal expression gradient at E12.5 (Fig. 4 panel c) whereas this gradient was in a dorso-ventral direction at E14.5 (Fig. 4 panel f). At E16.5, ephrinA5 mRNA was more concentrated in the caudal part of the striatum (Fig. 4 panel i), and in its dorsal part at E18.5 (Fig. 4

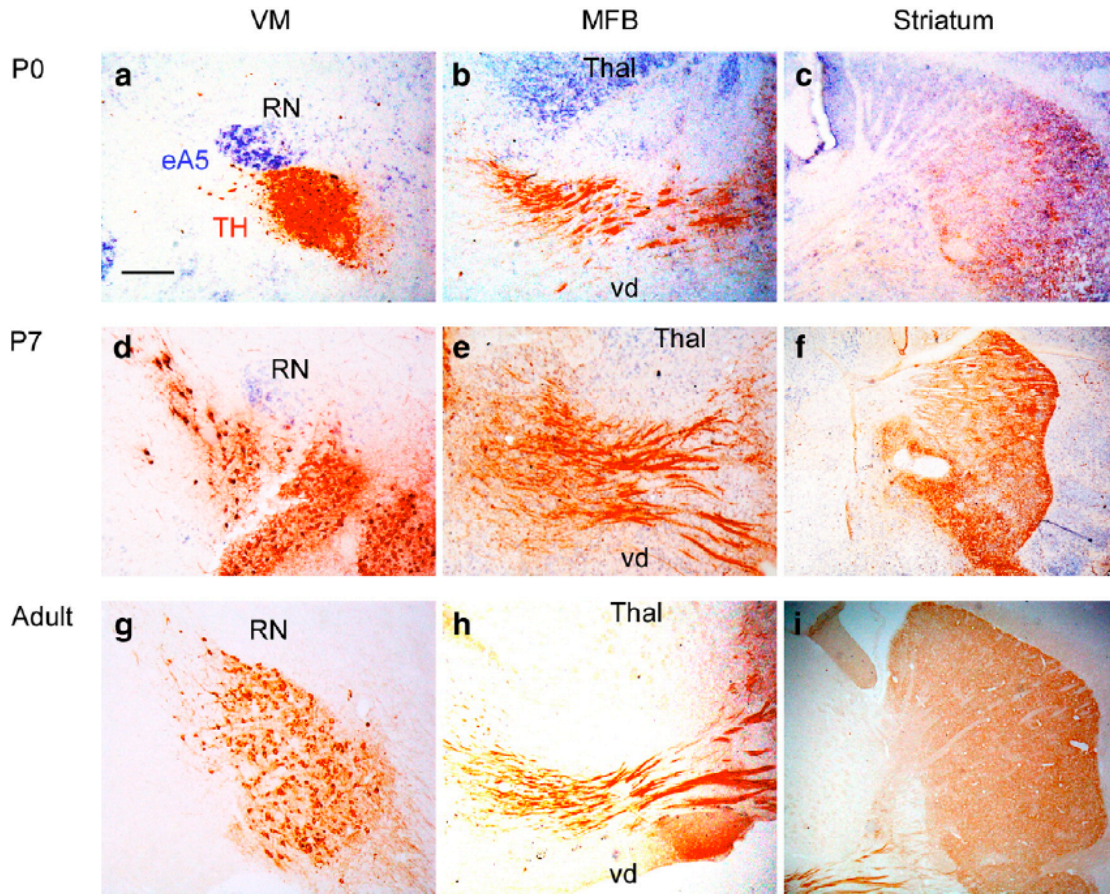


Fig. 5. EphrinA5 mRNA expression decreases during postnatal development. In situ hybridization was performed to detect ephrinA5 mRNA expression (blue) on P0, P7 and adult brain sagittal sections. On the same sections the mesostriatal pathway was visualized using anti-TH mAb (brown). Results are presented for three main regions: the ventral mesencephalon (VM), the medial forebrain bundle (MFB) and the striatum. Between P0 and P7, TH+ axons connected to the entire striatum (panels c and f). EphrinA5 mRNA was expressed at P0 in the ventral mesencephalon (panel a) and striatum (panel c) and then decreased at P7 (panels d–f) to extinction in the adult (panels g–i). Scale bar: panels a, b, d, e: 480 μ m; c, f, g: 1 mm; i, h: 900 μ m; Abbreviations: see Glossary.

panel l). Thus, the ephrinA5 mRNA expression pattern did not follow any conserved graded localization during developmental stages. This observation is in accordance with the work of Janis et al. (1999) and Passante et al. (2008), showing a concomitant ephrinA5 mRNA expression with the patch/matrix cell development (see further details in Discussion). This expression became weaker at P7 (Fig. 5 panel f) and was extinguished in the adult (Fig. 5 panel i).

EphrinA5 protein is expressed in the vicinity of the mesostriatal dopaminergic pathway

Anti-ephrinA5 immunohistochemistry was performed on E12.5, E14.5, E16.5, E18.5, P0, P7 and adult sagittal and coronal brain sections.

As shown in both sagittal and coronal sections, ephrinA5 protein was strongly expressed in the telencephalon and in the thalamus from E12.5 to P0 as well as in the hypothalamus from E12.5 to E14.5. We did not detect any ephrinA5 expression in the ventral mesencephalon from E12.5 to P0.

More precisely, in the telencephalon, ephrinA5 was expressed in the neocortex, the olfactory bulb and the ventral telencephalon including the olfactory area, the olfactory tract and the ventral part of the LGE/striatum. Observation of coronal sections showed a latero-medial gradient of ephrinA5 in the LGE clearly distinguishable at E12.5 (Fig. 6 panels d, e and f for higher magnification), at E14.5 (Fig. 6 panels j, k and l for higher magnification) and at E16.5 (Fig. 6 panels p, q and r for higher magnification). On sagittal sections ephrinA5 was distributed in a rostro-caudal and a ventro-dorsal gradient in the telencephalon as illustrated by an arrowhead in Fig. 6 panels g and m,

for respectively E14.5 and E16.5 stages. This gradient was widespread in the rostral and ventral part of the LGE/striatum. At E18.5 and P0, the ephrinA5 expression was still present in the cortex and in the striatum (Fig. 7 panels a, b, d–g, i, j), in the thalamus and in the olfactory bulb (Fig. 7 panels b and g), and in the ventral telencephalon (Fig. 7 panels a, b, e, f, g, j). At P7, ephrinA5 expression was dramatically decreased to extinction in the adult brain (data not shown).

To compare the localization of ephrinA5 protein to the presence of mesencephalic dopaminergic axons growing ventrally to the thalamus and connecting to the striatum, we performed double ephrinA5 and DAT immunohistochemistry on E16.5 and E18.5 sagittal sections. Confocal microscope analysis did not detect any cellular co-localization of ephrinA5 and DAT. However, axons expressing DAT were localized ventrally and in close vicinity of thalamic ephrinA5 expression as delimited by the dotted line in Fig. 8 panels a to c. In the telencephalon, rostro-caudal and ventro-dorsal ephrinA5 expression gradients were clearly distinguishable as illustrated by arrowheads in Fig. 8 panel d. Moreover, DAT+ axons grew towards the dorsal part of the striatum where low ephrinA5 expression was detected, whereas no DAT+ axons crossed the most ventral and rostral part of the striatum expressing high ephrinA5 levels (Fig. 8 panels e and f).

EphrinA5 receptors and EphA5 ligands are expressed in the mesostriatal dopaminergic pathway

To investigate the in vivo expression of ephrinA5 receptors, we performed immunohistochemistry using antibodies against EphA5

and EphA3, and LAPIS techniques. Anti-EphA5 immunohistochemistry performed on E16.5 sagittal embryonic sections, showed a strong expression in the ventral mesencephalon whereas no expression was found neither in the MFB, nor in the LGE/striatum (Fig. 9 panel a). EphA3 was strongly expressed in the developing cortex but not in the mesostriatal pathway (Fig. 9 panel b, see the insert for higher magnification of the cortical expression). LAPIS, using ephrinA5Fc, allowed us to visualize all EphA receptors that would bind ephrinA5 *in vivo*. In the embryonic E14.5 mesostriatal pathway, expression of ephrinA5 receptors was strong in the ventral mesencephalon and weaker in the LGE/striatum. No expression was detected in the MFB (Fig. 9 panel c, see insert for higher magnification of staining).

To investigate the *in vivo* expression of putative EphA5 ligands, we performed RAPIS using EphA5Fc protein. Expression was detected at E14.5 in the ventral mesencephalon, in the thalamus and hypothalamus, in the ventral telencephalon and in the LGE/striatum (Fig. 9 panel d, see insert for higher magnification of staining).

The mesostriatal pathway is intact in ephrinA5 knock-out mice

We compared the mesostriatal pathway on E16.5 embryonic and adult sagittal brain sections of WT and eA5KO mice, using anti-TH immunohistochemistry. At E16.5, in WT embryos, the entire mesostriatal pathway was clearly visible and the striatal fibers were detectable. In WT adults, the mesostriatal pathway was completely formed and extended as previously reviewed (Van den Heuvel and Pasterkamp, 2008).

We did not observe any alteration or misrouting of this pathway in the eA5KO mice, during embryogenesis (Fig. 10) as well as in the adult (Fig. 11). As found in the WT dopaminergic pathway (Figs. 10 and 11, panels a to c), we detected TH+ somas in the ventral mesencephalon (VM) of the eA5KO mice (Figs. 10 and 11 panels d), TH+ axons in the MFB (Figs. 10 and 11 panels e) and TH+ projections connected to the LGE/striatum (Figs. 10 and 11 panels f). We noticed however, that in the three main regions of the mesostriatal pathway (i.e. VM, MFB and LGE/striatum), TH+ staining was weaker in the eA5KO than in the WT mice during development. This lower staining intensity was also observed using avidin–biotin peroxidase complex visualized with 3–3-diaminobenzidine tetrahydrochloride enzymatic reaction (data not shown).

Discussion

In the present study, we investigated the expression of ephrinA5 guidance molecules and their potential involvement in the establishment of dopaminergic mesostriatal projections during development. *In vitro*, we showed that mesencephalic dopaminergic neurons express ephrinA5 receptor, EphA5, and that ephrinA5-purified protein has a repulsive effect on mesencephalic dopaminergic axons. *In vivo*, ephrinA5 expression pattern observed in the vicinity of the dopaminergic pathway, and EphA5 expression detected in TH+ cells of the ventral mesencephalon, suggest that the ligand–receptor complex ephrinA5–EphA5 may be implicated in the guidance of the mesostriatal dopaminergic axons probably by way of repulsion. However, the lack of any alteration in the formation of this pathway during embryogenesis and in the adult eA5KO mice, as well as the *in vivo* expression of other EphA5 ligands in the vicinity of the pathway, suggests that ephrinA5 may not be the only factor involved in the mesencephalic TH+ axon guidance.

Spatio-temporal formation of dopaminergic mesostriatal projections

Establishment of mesencephalic dopaminergic projections has been mainly described in the developing rat brain. Recently, developmental progression of these projections has been reviewed by Van den Heuvel and Pasterkamp (2008). Several studies reported

in detail the development of these projections towards the striatum (Gates et al., 2004; Verney, 1999; Voorn et al., 1988; Specht, 1981a,b). They showed that during rat embryogenesis, mesencephalic dopaminergic cell bodies arise at E12 in the ventral surface of the mesencephalic flexure. By E13, axons grow first dorsally of the flexure and rapidly turn to a ventro-rostral direction to grow along an immature MFB lying ventrocaudally to the LGE. Between E17 and E19, axon growth pauses and then develops dorsally of the MFB into the LGE. Only from P4, dopaminergic axons colonize the entire striatum including the germinal zone of the LGE.

The spatio-temporal establishment of dopaminergic mesostriatal projections that we reported here in the developing mouse brain was similar to that described in the rat by Gates et al. (2004). Indeed, we observed TH+ somas in the mesencephalic flexure and TH+ projections in the developing MFB at E12.5. At this stage, no TH+ axons were detected in the striatum that was reached between E12.5 and E14.5. Between E14.5 and E18.5, a strong TH+ signal was detected in the ventral part of the striatum and then progressed to the dorsal striatum between E18.5 and P0 to spread to the entire striatum by P7. This suggests that mesencephalic dopaminergic axons first connect the LGE/striatum between E12.5 and E14.5 and that these connections are distributed on the entire striatum by postnatal stages. This is in accordance with the work of Hu et al. (2004), showing by injection of a retrograde tracer into the striatum, that the number of mesencephalic dopaminergic cells connecting the dorsal striatum increases from E15 to P7. Interestingly, this period is concomitant with striatal patch–matrix structure formation triggered by netrin-1 expressed in the ventricular zone lining the striatum (Hamasaki et al., 2001). As netrin-1 participates to matrix cell migration into the LGE and dopaminergic mesencephalic neurons express netrin-1 receptor (Livesey and Hunt, 1997), this diffusible guidance molecule could influence the maturation of dopaminergic striatal connections at these stages.

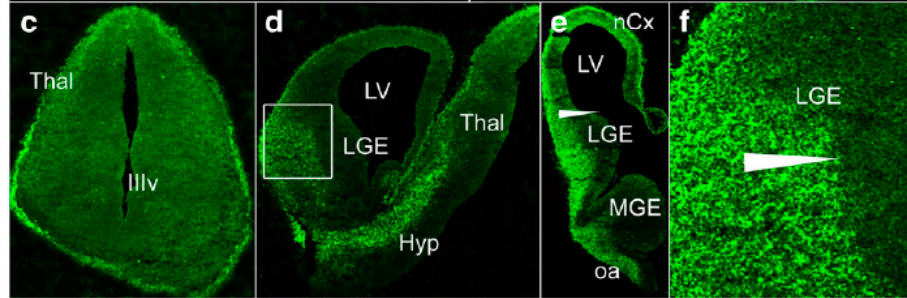
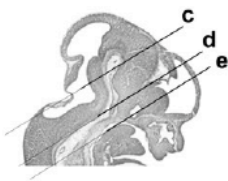
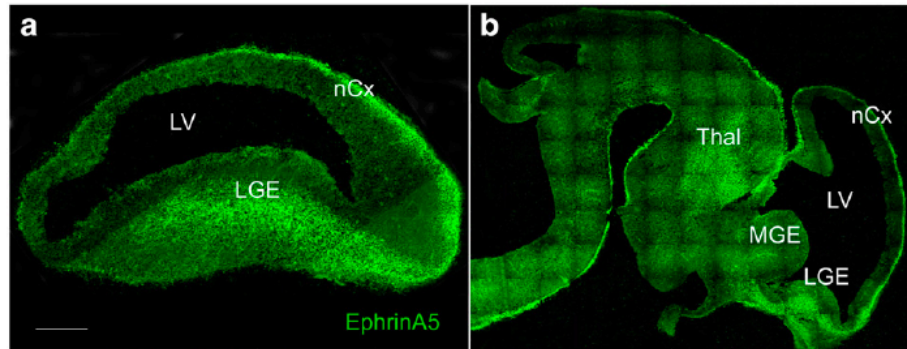
Spatio-temporal expression of ephrinA5 in the mesostriatal dopaminergic pathway

EphrinA5 mRNA and protein expressions were detected in the brain from E12.5 to P0. From P7 this expression dramatically decreased to extinction in the adult. This is in accordance with the developmental roles of this molecule in cell migration processes, axon guidance, topographic mapping, proliferation and synapse formation and stabilization that occur mainly during the embryonic and early postnatal periods (O'Leary and Wilkinson, 1999; Mueller et al., 2006; Wilkinson, 2001).

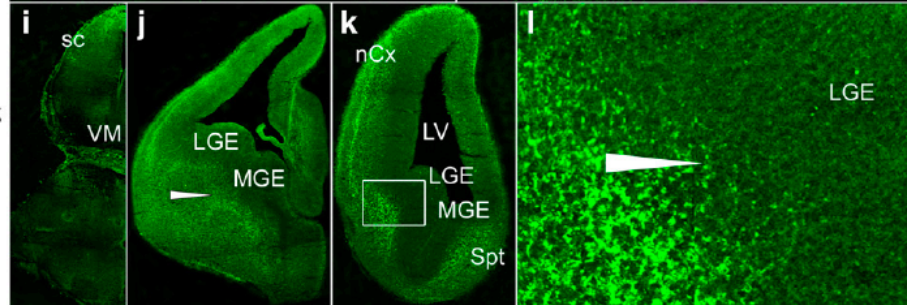
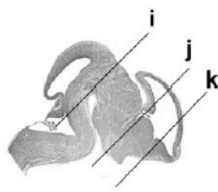
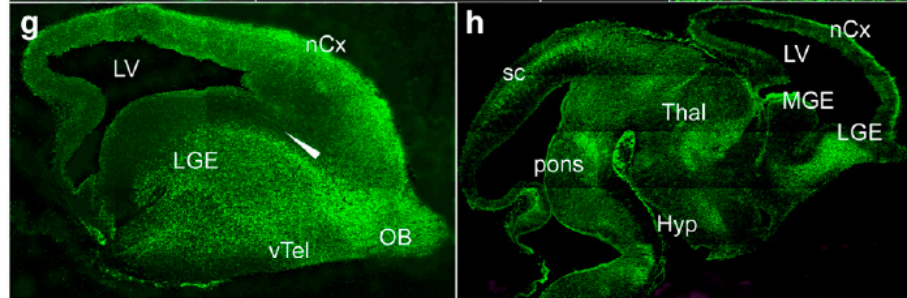
In the ventral mesencephalon, localization of ephrinA5 mRNA and protein differed. Strong mRNA expression was found in the red nucleus whereas no ephrinA5 protein was detected in this structure. This suggests that ephrinA5 may be expressed mainly in the rubrospinal projections and may play a role in neuronal connections in the spinal cord where its expression has been detected during development (Washburn et al., 2007). The identity of contact or diffusible guidance molecules that restrict the dopaminergic neurons in the ventral mesencephalon and direct them in a rostro-ventral direction towards the ventral diencephalon, remains unknown. However, it is clear that a chemorepulsive activity emerging from the caudal brainstem and a rostro-caudal gradient of guidance cues present in the dorsal midbrain, may participate to this guidance (Gates et al., 2004; Nakamura et al., 2000).

In the thalamus, ephrinA5 was expressed at both mRNA and protein levels. This suggests that ephrinA5 protein may be expressed either on neuron somas expressing ephrinA5 mRNA, and in this case may participate to the spatial restriction of somas, or on afferent projections, since ephrinA5 is known to play a role in the connections between the thalamus and the cortex during development (Dufour et al., 2006; Uziel et al., 2006).

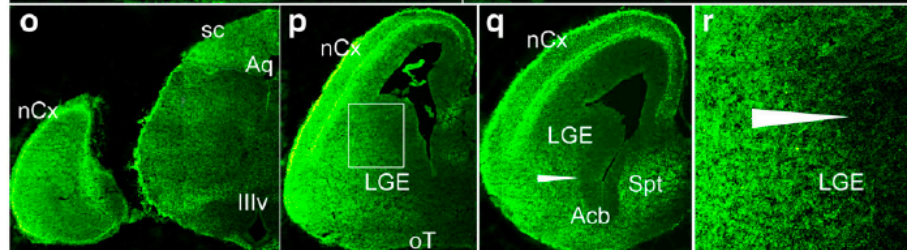
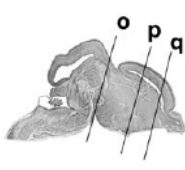
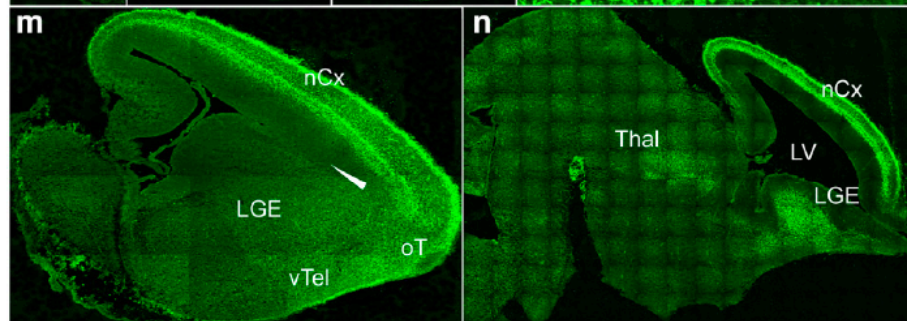
E12.5



E14.5



E16.5



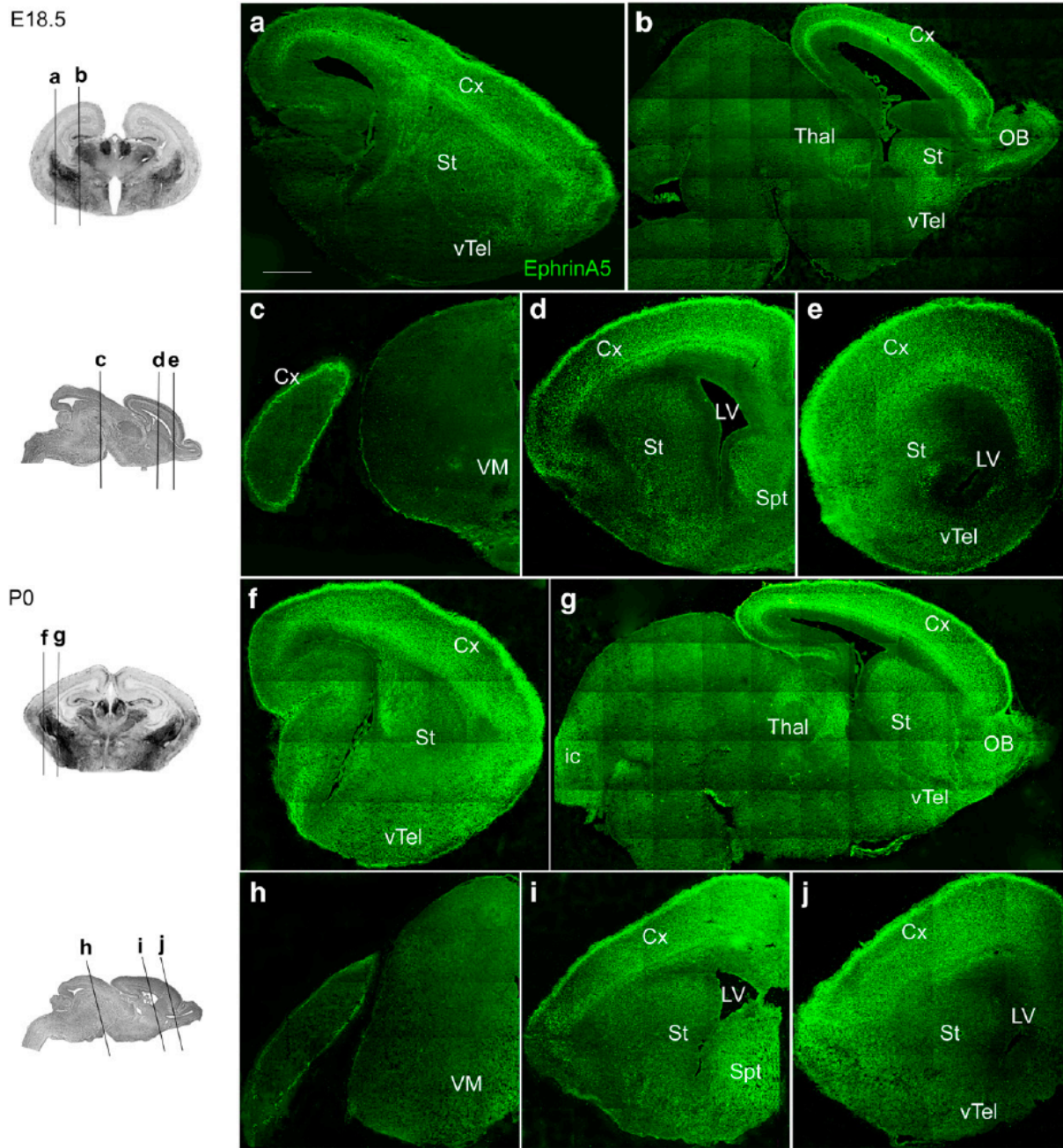


Fig. 7. EphrinA5 is expressed in the thalamus, ventral telencephalon, striatum and cortex between E18.5 and P0. Anti-ephrinA5 immunohistochemistry was performed on E18.5 and P0 brain sagittal and coronal sections. Two sagittal sections and three coronal sections are presented here for each embryonic stage. Strong ephrinA5 expression was observed in the cortex and in the striatum (panels a, b, d–g, i, j), in the thalamus and in the olfactory bulb (panels b and g), and in the ventral telencephalon (panels a, b, e, f, g, j). EphrinA5 expression gradients were not distinguishable. Scale bars: panels a, d, i: 400 μ m, b: 750 μ m, c, h: 250 μ m, e: 200 μ m, f: 500 μ m, g: 550 μ m, j: 450 μ m; Abbreviations: see Glossary.

In the ventral telencephalon, we observed ventro-dorsal and rostro-caudal gradients of ephrinA5 protein expression. EphrinA5 was strongly expressed during embryogenesis in the piriform cortex and olfactory tracts as described by St John et al. (2002).

In the LGE/striatum, ephrinA5 was expressed at both mRNA and protein levels. We did not detect any conserved gradient of ephrinA5

mRNA expression during embryonic and postnatal development. This observation is in line with the works of Janis et al. (1999) and Passante et al. (2008) showing that ephrinA5 is not graded in developing striatum, but delineates some parts of the matrix compartment and is expressed in a subpopulation of striosomal neurons. At the protein level, we showed for the first time that ephrinA5 protein was

Fig. 6. EphrinA5 is expressed in the thalamus, ventral telencephalon, LGE and cortex between E12.5 and E16.5. Anti-ephrinA5 immunohistochemistry was performed on E12.5, E14.5 and E16.5 brain sagittal and coronal sections. Two sagittal sections and three coronal sections are presented here for each embryonic stage. Sagittal sections showed rostro-caudal and ventro-dorsal gradients, indicated at E14.5 and E16.5 by arrowheads in respectively panels g and m, in the ventral telencephalon and the striatum. Coronal sections showed a latero-medial gradient from E12.5 to E16.5, indicated by arrowheads in panels e, j, q and f, l, r. Panels f, l and r are higher magnification views of gradients in respectively panels d, k and p. Scale bar: panels a: 200 μ m; b: 500 μ m; c: 250 μ m; d, j: 300 μ m; e: 400 μ m, f: 90 μ m, g: 350 μ m; h, k, o, p: 600 μ m; i, m: 450 μ m; l: 60 μ m; n: 1 mm; q: 700 μ m; r: 150 μ m Abbreviations: see Glossary.

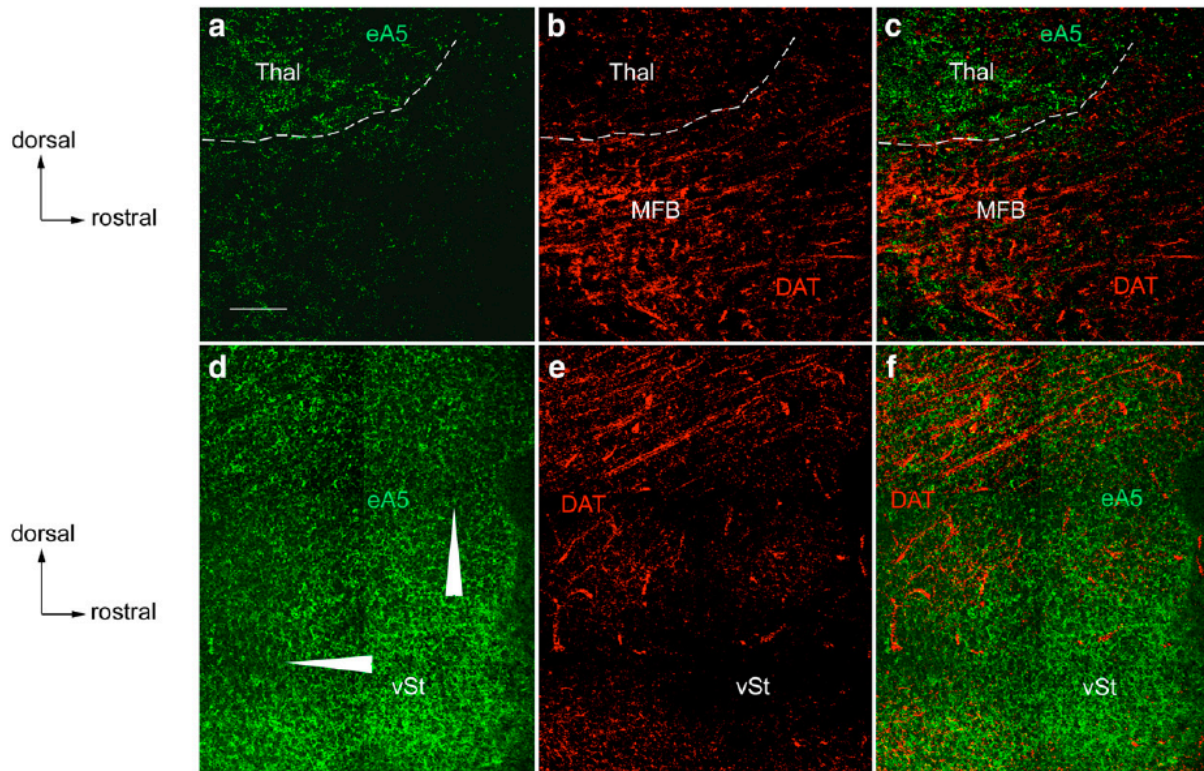


Fig. 8. EphrinA5 is expressed in the close vicinity of DAT+ axons in the thalamus and in the striatum. Double immunohistochemistry with ephrinA5 (panels a and d in green) and DAT antibodies (panels b and e in red) was performed on E16.5 and E18.5 brain sagittal sections. In the thalamus, ephrinA5 expression was distributed dorsally to the DAT+ axons as shown in panels a–c for E16.5 sagittal section. Dotted line delimited the ephrinA5 expression from the DAT expression. In the striatum, ephrinA5 expression on E18.5 sagittal sections showed ventro-dorsal and rostro-caudal gradients (indicated by arrowheads in panel d). DAT+ axons were localized dorsally to the high ventral ephrinA5 expression (panels e, f). Scale bars: panels a–c: 40 μ m; panels d–f: 220 μ m; Abbreviations: see Glossary.

expressed in ventro-dorsal and rostro-caudal gradients thus leading to a high ephrinA5 concentration in the ventro-rostral part of the striatum and a low ephrinA5 protein expression in the dorso-caudal part.

EphrinA5 and other EphA5 ligands may play a role in the mesostriatal dopaminergic projection establishment

EphA5 ligand expression pattern at E14.5 was observed not only in the telencephalon, the hypothalamus and the thalamus (Fig. 9 panel d) as shown for ephrinA5 protein expression (Fig. 6), but also in the ventral mesencephalon (Fig. 9 panel d), suggesting that, using this RAPIS method, we detected not only ephrinA5 but also other ephrinAs able to bind EphA5 expressed on TH+ neurons, at least in the mesencephalon.

In this line, considering the spatio-temporal distribution of mesencephalic dopaminergic axons and EphA5 ligand expression, we propose a hypothetical model involving ephrinAs and more specifically ephrinA5 in the ventral telencephalic guidance of the TH+ projections (Fig. 12).

Before E12.5 in the mouse, mesencephalic dopaminergic projections arise from the ventral mesencephalon and grow in a bundle ventrally to the thalamus that strongly expresses ephrinA5 protein (Fig. 12a). At this stage, thalamic ephrinA5 protein may not influence the dopaminergic axon guidance, since previous reports did not find any chemorepulsive effect of thalamic explants on TH+ neurons of the ventral mesencephalon (Gates et al., 2004). Moreover, we observed in vitro, that only a part of the mesencephalic axons respond to ephrinA5, whereas in vivo, all of them are found directed ventrally to the thalamus, forming the tightly fasciculated MFB. These findings suggest that either the dopaminergic axons are not sensitive to the

ephrinA5 presence, or that there is a combined action of repulsion by thalamic ephrinA5 and attraction by guidance molecules in the MFB. Attractive cues in the MFB remain to be identified.

By E14.5, TH+ axons grow to the most caudal part of the ventral telencephalon where they reach a high ephrinAs and particularly high ephrinA5 expression region (Fig. 12b). At this point, this high ephrinA5 expression (and possibly other ephrinAs expression detected by RAPIS technique) may have a repulsive effect on TH+ projections participating to the “turning behavior” of TH+ axons dorsally towards the striatum described by Gates et al. (2004). Indeed, we observed in vitro, that mesencephalic TH+ axons were repulsed by ephrinA5 protein. This was assessed using stripe assay technique, as described by Zimmer et al. (2007) that showed a repulsive activity of ephrinA5 on dissociated cortical neurons. The possible involvement of ephrinA5 in the TH+ projections “turning behavior” is supported by the work of Nomura et al. (2006), who showed that Pax6-regulated ephrinA5 acts as a repulsive molecule for olfactory cortex neurons in the developing telencephalon. However, an interesting point to be raised is that in vitro, we observed a partial repulsive action of ephrinA5 on TH+ axons. This suggests that mesencephalic TH+ projections may react differentially to the presence of ephrinA5. This may explain the well-described bi-directional progression of TH+ axons, on one hand connecting to the striatum, and on the other hand connecting to cortical regions. TH+ axons visualized in our in vitro stripe assay, seemed also to grow differentially in the presence of ephrinA5Fc or control Fc. Although our results were not statistically significant, we observed that TH+ axons migrating exclusively on ephrinA5Fc stripes (i.e. not repulsed by this molecule) tend to grow more than TH+ axons migrating exclusively on Fc purified fragment. EphrinA5 has already been described to affect neurite outgrowth either in a

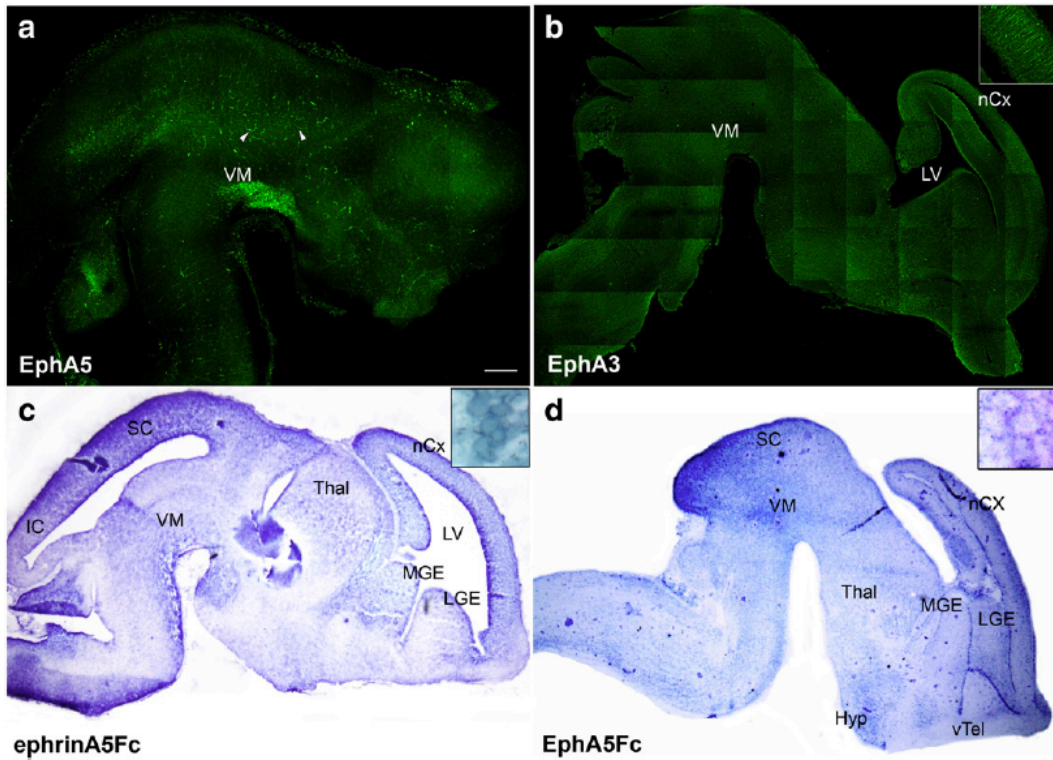


Fig. 9. EphrinA5 receptors and EphA5 ligands are expressed in the mesostriatal dopaminergic pathway. EphA5 and EphA3 immunohistochemistry performed on E16.5 embryonic brain sagittal section showed that EphA5 is expressed only in the ventral mesencephalon (panel a, arrowheads show vessel non-specific staining). EphA3 is expressed in the cortex and not in the mesostriatal pathway (panel b, see insert for higher magnification of cortical staining). LAPIS, using ephrinA5Fc, showed that EphA receptors are expressed in the ventral mesencephalon and at a lower level in the LGE/striatum (panel c, see insert for higher magnification). RAPIS, using EphA5Fc, showed that ephrinA ligands are expressed in the ventral mesencephalon, in the thalamus, in the hypothalamus, in the ventral telencephalon and in the LGE/striatum (panel d, see insert for higher magnification). Scale bar: panel a: 540 μ m, panel b: 800 μ m, panel c: 220 μ m, panel d: 325 μ m. Abbreviations: see Glossary.

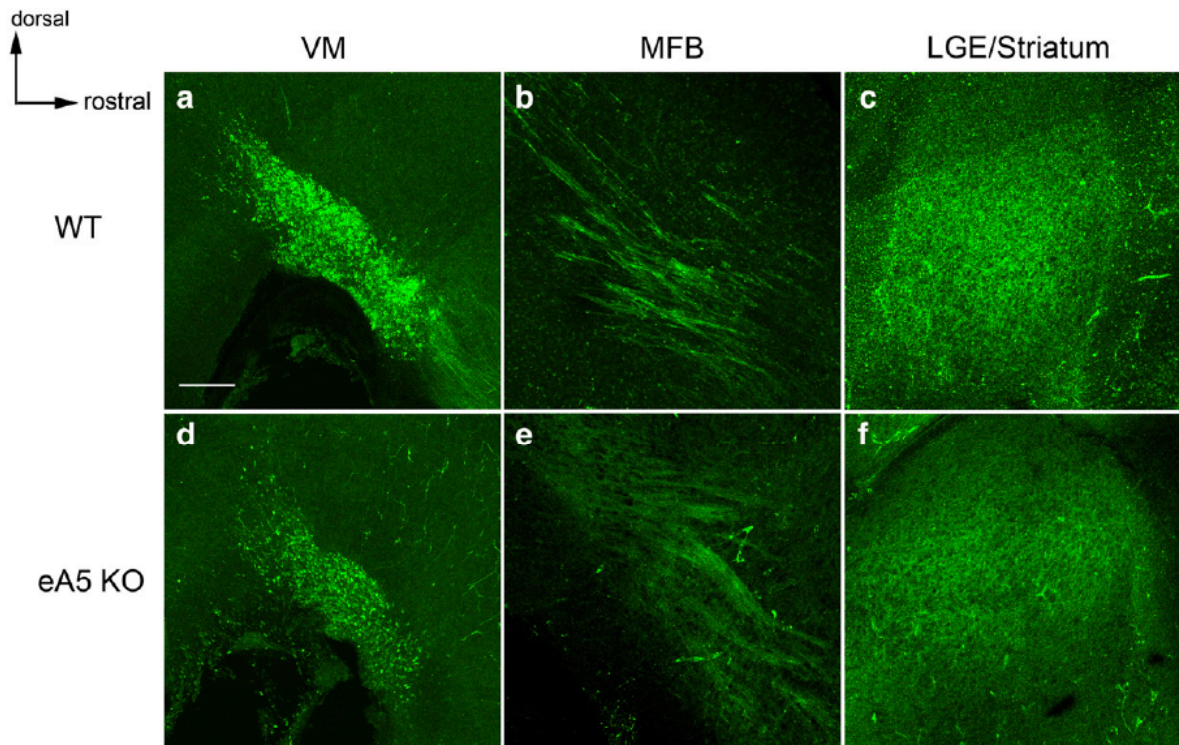


Fig. 10. The mesostriatal pathway is intact in ephrinA5 knock-out embryonic mice. TH immunohistochemistry performed on E16.5 embryonic brain sagittal sections, showed the presence of TH+ somas, MFB fibers and striatal projections in both wild type (panels a–c) and eA5KO animals (panels d–f). Scale bar: panels a, c, d, f: 140 μ m, panels b, e: 80 μ m. Abbreviations: see Glossary.

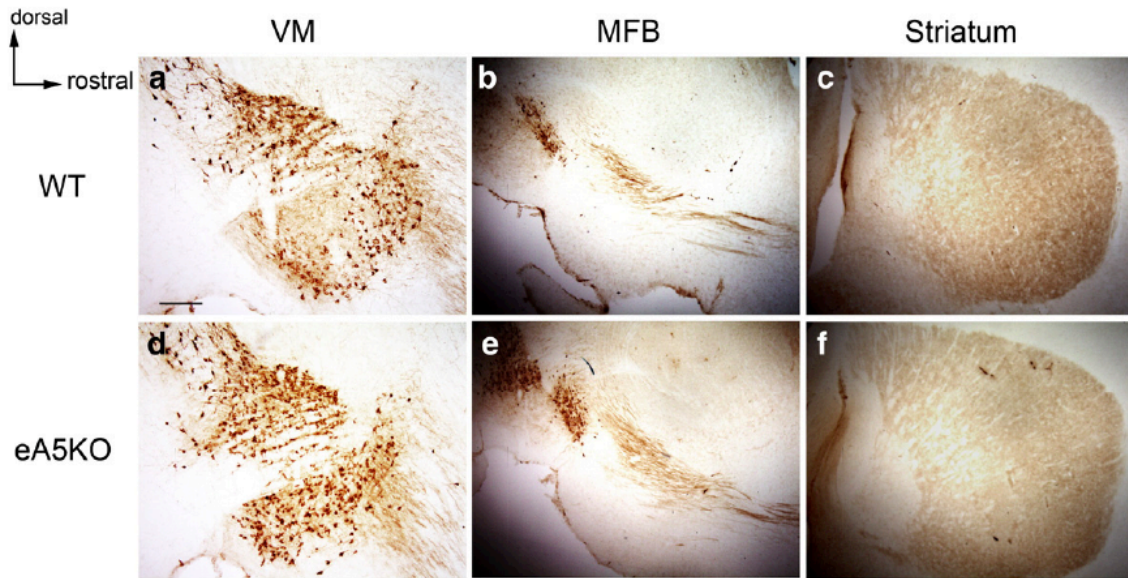


Fig. 11. The mesostriatal pathway is intact in ephrinA5 knock-out adult mice. TH immunohistochemistry performed on adult brain sagittal sections, showed the presence of TH+ somas, MFB fibers and striatal projections in both wild type (panels a–c) and eA5KO animals (panels d–f). Scale bar: panels a, d: 375 μ m, panels b, c, e, f: 150 μ m. Abbreviations: see Glossary.

positive or in a negative way depending of the nature of the cells (Gao et al., 2000). More recently, Cooper et al. (2009b) have demonstrated a stimulatory effect of ephrinA5 on mesencephalic dopaminergic axon outgrowth, when grew on uniform ephrinA5 carpet expressing cells.

EphA3 and EphA5 immunohistochemistry, and LAPIS, as well as data published by other authors concerning EphA4 and EphA7 in vivo expression (Greferath et al., 2002; Rogers et al., 1999), suggest that EphA5 is a potential candidate to mediate the interaction of TH+ axons with ephrinA5 and other ephrinAs, during their travel to the striatum. Indeed, anti-EphA5 immunohistochemistry performed in this work in vitro and in vivo, showed that, EphA5 is strongly expressed in the ventral mesencephalon in the TH+ cells, although in different proportions, as 26% of TH+ neurons showed EphA5 expression in vitro, whereas 60.5% of ventral mesencephalic TH+ cells expressed EphA5 receptor in vivo. This discrepancy may be

explained by the effect of culture conditions, restricting the TH+ cell population compared to the in vivo situation. In addition, EphA7 has been shown to be weakly expressed only in the basal midbrain at E12.5 and this expression disappeared at E14.5 (Rogers et al., 1999). EphA4 expression was detected in the striatum from E13.5 to P6 in mice, but not in the ventral midbrain, neither in the medial forebrain bundle (Greferath et al., 2002). Furthermore, we showed in this study, that, EphA3 is not expressed in the mesostriatal pathway, but is strongly expressed in the developing cortex as already described by Kudo et al. (2005). Our LAPIS study using ephrinA5Fc showed that EphAs were strongly expressed in the ventral mesencephalon and weakly expressed in the LGE/striatum. This is in accordance with results obtained using EphA binding assays by Janis et al. (1999). This strong signal in the ventral mesencephalon is probably due mostly to the EphA5 expression that we detected using immunohistochemistry. The weak striatal signal of EphAs that we, and Janis et al. (1999) obtained is not in line with the previously reported strong EphA4 expression in the striatum detected by immunohistochemistry by Greferath et al. (2002). As ephrinA5 was suggested not to bind EphA4 in the striatum (Janis et al., 1999), our LAPIS procedure may mainly detect ephrinA5Fc interaction with EphA5 and potentially with another member of the EphA receptor family.

Finally, it is likely that the presence of Eph–ephrin guidance molecules cannot be alone responsible for this dorsal turn. Chemoattractive signals emerging from the striatum at these stages may help to direct TH+ axons to connect the striatum. Netrin-1 and its receptor deleted in colorectal cancer (DCC) are expressed in the mesencephalic dopaminergic projections and in the striatum (Van den Heuvel and Pasterkamp, 2008), and may mediate this attraction.

From E14.5 to P0, and following their dorsal turn, TH+ projections invaded the striatum in a ventro-dorsal direction (Fig. 12c). We did not detect ephrinAs expression gradient using EphA5Fc RAPIS technique, suggesting that we highlighted the expression of a mixture of ephrinAs and consequently a mixture of protein gradients. However, high rostral and ventral ephrinA5 expression was observed, suggesting that it may repulse TH+ projections towards the low dorsal and caudal ephrinA5 expression domains. This ephrinA5 expression gradient may help the TH+ axons to locally spread within the striatum: low-responding ephrinA5 TH+ axons may preferentially stay connected in the ventral part of the striatum, whereas high-responding ephrinA5 TH+ axons may be repulsed towards the dorsal

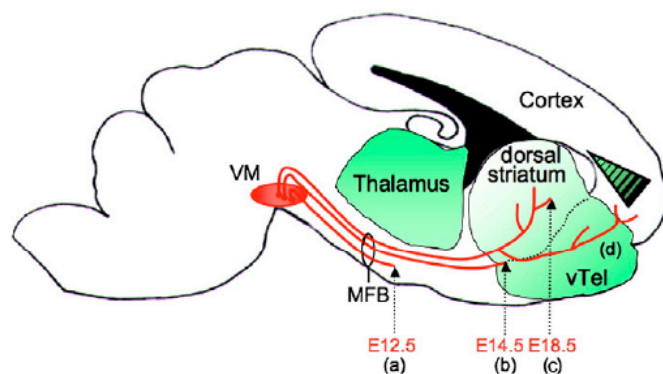


Fig. 12. Schematic representation of a hypothetical involvement of ephrinA5 in the mesostriatal pathway establishment during mouse embryogenesis. (a) At E12.5, mesencephalic dopaminergic (mDA) somas are located in the ventral mesencephalon and mDA axons form the MFB ventrally to the thalamus. (b) At E14.5, mDA axons invade the LGE/striatum in the ventral telencephalon close to the moderate ephrinAs and high ephrinA5 expression that may have a repulsive action to direct mDA axons dorsally. (c) Between E14.5 and E18.5 TH+ axons responding to ephrinA5 are directed into the striatum and invade it in a ventro-dorsal direction influenced by ventro-dorsal and rostro-caudal ephrinA5 gradients. (d) mDA axons that are not influenced by ephrinA5 cross the ventral telencephalic high expression region to connect the cortex. Abbreviations: see Glossary.

part of the striatum. Moreover, in the most ventral part of the telencephalon, non-responding ephrinA5 TH+ axons may grow to connect cortical regions (Fig. 12d). Such a neural map specification by gradients is a well-known mechanism used by ephrins. Ephrins regulate axon growth allowing axons to terminate at a neutral or optimum point in the gradient as it has been extensively shown for the retinotectal and thalamocortical systems (Flanagan, 2006). Such a mechanism operating in the striatum could explain the graded distribution of dopaminergic projections during the development and the extinction of ephrinA5 expression when TH+ axons connected the entire striatum at P7. Moreover, this model is strengthened by the work of Sieber et al. (2004) showing that disruption of EphA/ephrinA interactions resulted in the mistargeting of a fraction of substantia nigra dopaminergic projections, leading to a reduced number of dopaminergic projections in the dorsolateral striatum. Indeed, according to our model, a lack of ephrinA–EphA signaling, may induce less dopaminergic projections connecting to the dorsal part of the striatum since dopaminergic projections would not be repulsed from the ventral part. These axons would grow more ventrally instead of turning dorsally into the striatum. The dopaminergic projections would then be misrouted in the absence of ephrinA–EphA signaling.

Overall, ephrinA5 and EphA5 expression patterns as well as repulsive action of ephrinA5 mesencephalic TH+ axons, are in favor of an involvement of ephrinA5 in the formation of the mesostriatal pathway. Nevertheless, suppressing the *ephrinA5* gene did not affect this pathway, neither in the embryo, nor in the adult. This strongly suggests, that other ephrins than ephrinA5, detected by RAPIS method, may be also involved in the formation of this pathway. Indeed, it has previously been shown, in other systems such as the retinotectal one, that retinocollicular mapping appeared largely intact in ephrinA5 knock-out mice (Frisen et al., 1998) whereas ephrinA2 and ephrinA5 double mutants showed mapping abnormalities (Feldheim et al., 2000) while ephrinA2, ephrinA3 and ephrinA5 triple knock-out mice had severe mapping defects even if they did not completely lack their visual topography (Pfeiffenberger et al., 2006). This strongly suggests a partial redundancy between ephrins that could explain the absence of alteration of the mesostriatal pathway in ephrinA5 knock-out mice. More recently, this has been strengthened by the observation of compensative changes in gene expression after the mutation of a single ephrin gene (Peuckert et al., 2008). In order to obtain a better appreciation of the role of ephrins in the guidance of dopaminergic pathways, the whole ephrinA–EphA signaling may need to be disrupted (Sieber et al., 2004).

In conclusion, this study shows that ephrins, and more particularly ephrinA5, may play a role in the mesencephalic dopaminergic pathway establishment and highlights the possible differential guidance of dopaminergic mesencephalic axons. It is therefore of the first importance to refine the search for cellular and molecular sources of these guidance cues, considering the mesencephalic dopaminergic heterogeneous cell population. Understanding the molecular basis of this pathfinding may yield new avenues to increase the efficiency of cellular therapy in neurodegenerative disorders affecting this dopaminergic pathway, such as Parkinson's disease.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr B. Bloch for kindly providing DAT antibody. EphrinA5 vector and ephrinA5 knock-out mice were generous gifts from Dr. P. Vanderhaeghen.

We thank A. Cantereau for the help with confocal microscopy and B. Merceron for the technical assistance.

C.D. is a fellow of the French Ministry of Research.

This work was supported by the CNRS, the University of Poitiers, Fondation pour la Recherche sur le Cerveau (FRC), Fondation de l'Avenir and Fondation de France.

References

- Banisadr, G., Skrzydelski, D., Kitabgi, P., Rostène, W., Parsadaniantz, S.M., 2003. Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1593–1606.
- Baschong, W., Suetterlin, R., Laeng, R.H., 2001. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1565–1572.
- Chilton, J.K., 2006. Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev. Biol.* 292, 13–24.
- Cooper, M.A., Crockett, D.P., Nowakowski, R.S., Gale, N.W., Zhou, R., 2009a. Distribution of EphA5 receptor protein in the developing and adult mouse nervous system. *J. Comp. Neurol.* 514, 310–328.
- Cooper, M.A., Kobayashi, K., Zhou, R., 2009b. Ephrin-A5 regulates the formation of the ascending midbrain dopaminergic pathways. *Dev. Neurobiol.* 69, 36–46.
- Dickson, B.J., 2002. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 98, 1959–1964.
- Dufour, A., Egea, J., Kullander, K., Klein, R., Vanderhaeghen, P., 2006. Genetic analysis of EphA-dependent signaling mechanisms controlling topographic mapping in vivo. *Development* 133, 4415–4420.
- Egea, J., Klein, R., 2007. Bidirectional Eph–ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol.* 17, 230–238.
- Feldheim, D.A., Vanderhaeghen, P., Hansen, M.J., Frisen, J., Lu, Q., Barbacid, M., Flanagan, J.G., 1998. Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron* 21, 1303–1313.
- Feldheim, D.A., Kim, Y.-I., Bergemann, A.D., Frisen, J., Barbacid, M., Flanagan, J.G., 2000. Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25, 563–574.
- Flanagan, J.G., 2006. Neural map specification by gradients. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 59–66.
- Frisen, J., Yates, P.A., McLaughlin, T., Friedman, G.C., O'Leary, D.D.M., Barbacid, M., 1998. Ephrin-A5(Al-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 20, 235–243.
- Gao, P.P., Sun, C.H., Zhou, X.F., DiCicco-Bloom, E., Zhou, R., 2000. Ephrins stimulate or inhibit neurite outgrowth and survival as a function of neuronal cell type. *J. Neurosci. Res.* 60, 427–436.
- Gates, M.A., Coupe, V.M., Torres, E.M., Fricker-Gates, R.A., Dunnett, S.B., 2004. Spatially and temporally restricted chemoattractive and chemorepulsive cues direct the formation of the nigro-striatal circuit. *Eur. J. Neurosci.* 19, 831–844.
- Greferath, U., Canty, A.J., Messenger, J., Murphy, M., 2002. Developmental expression of EphA4-tyrosine kinase receptor in the mouse brain and spinal cord. *Mech. Dev.* 119 (Suppl. 1), S231–S238.
- Hamasaki, T., Goto, S., Nishikawa, S., Ushio, Y., 2001. A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons. *J. Neurosci.* 21, 4272–4280.
- Haupt, C., Huber, A.B., 2008. How axons see their way—axonal guidance in the visual system. *Front. Biosci.* 13, 3136–3149.
- Hernández-Montiel, H.L., Tamariz, E., Sandoval-Minero, M.T., Varela-Echavarría, A., 2008. Semaphorins 3A, 3C, and 3F in mesencephalic dopaminergic axon pathfinding. *J. Comp. Neurol.* 506, 387–397.
- Himanen, J.P., Nikolov, D.B., 2003. Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci.* 26, 46–51.
- Hu, Z., Cooper, M., Crockett, D.P., Zhou, R., 2004. Differentiation of the midbrain dopaminergic pathways during mouse development. *J. Comp. Neurol.* 476, 301–311.
- Jacobowitz, D.M., Abbott, L.C., 1998. Chemoarchitectonic Atlas of the Developing Mouse Brain. CRC Press, Boca Raton.
- Janis, L.S., Cassidy, R.M., Kromer, L.F., 1999. Ephrin-A binding and EphA receptor expression delineate the matrix compartment of the striatum. *J. Neurosci.* 19, 4962–4971.
- Kaufman, M.H., 1992. The Atlas of Mouse Development. Academic Press, London.
- Knöll, B., Drescher, U., 2002. Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci.* 25, 145–149.
- Knöll, B., Weigl, C., Nordheim, A., Bonhoeffer, F., 2007. Stripe assay to examine axonal guidance and cell migration. *Nat. Protoc.* 2, 1216–1224.
- Kudo, C., Ajioka, I., Hirata, Y., Nakajima, K., 2005. Expression profiles of EphA3 at both the RNA and protein level in the developing mammalian forebrain. *J. Comp. Neurol.* 487, 255–269.
- Lin, L., Isacson, O., 2006. Axonal growth regulation of fetal and embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons by Netrin-1 and Slits. *Stem Cells* 24, 2504–2513.
- Livesey, F.J., Hunt, S.P., 1997. Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. *Mol. Cell Neurosci.* 8, 417–429.
- Macé, K., Saxod, R., Feuerstein, C., Sadoul, R., Hemming, F.J., 2002. Chondroitin and keratan sulfates have opposing effects on attachment and outgrowth of ventral mesencephalic explants in culture. *J. Neurosci.* 22, 46–56.
- Mann, F., Zhukareva, V., Pimenta, A., Levitt, P., Bolz, J., 1998. Membrane-associated molecules guide limbic and nonlimbic thalamocortical projections. *J. Neurosci.* 18, 9409–9419.
- Maroof, A.M., Anderson, S.A., 2006. Off on a tangent: thalamocortical axons traverse a permissive corridor across the basal telencephalon. *Neuron* 50, 185–188.
- Mueller, B.K., Yamashita, T., Schaffar, G., Mueller, R., 2006. The role of repulsive guidance molecules in the embryonic and adult vertebrate central nervous system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 1513–1529.
- Nakamura, S., Ito, Y., Shirasaki, R., Murakami, F., 2000. Local directional cues control growth polarity of dopaminergic axons along the rostrocaudal axis. *J. Neurosci.* 20, 4112–4119.

- Nguyen Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Ma, L., Wang, K.H., Marillat, V., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., Chédotal, A., 2001. Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *J. Neurosci.* 21, 4281–4289.
- Nomura, T., Holmberg, J., Frisen, J., Osumi, N., 2006. Pax6-dependent boundary defines alignment of migrating olfactory cortex neurons via the repulsive activity of ephrin A5. *Development* 133, 1335–1345.
- O'Leary, D.D., Wilkinson, D.G., 1999. Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 65–73.
- Osborn, M., Weber, K., 1982. Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structures. *Methods Cell Biol.* 24, 97–132.
- Passante, L., Gaspard, N., Degraeve, M., Frisen, J., Kullander, K., De Maertelaer, V., Vanderhaeghen, P., 2008. Temporal regulation of Eph/ephrin signalling is required for the spatial patterning of the mammalian striatum. *Development* 135, 3281–3290.
- Peng, J., Stevenson, F.F., Doctrow, S.R., Andersen, J.K., 2005. Superoxide dismutase/catalase mimetics are neuroprotective against selective paraquat-mediated dopaminergic neuron death in the substantia nigra: implications for Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* 280, 29194–29198.
- Peuckert, C., Wacker, E., Rapus, J., Levitt, P., Bolz, J., 2008. Adaptive changes in gene expression patterns in the somatosensory cortex after deletion of ephrinA5. *Mol. Cell Neurosci.* 39, 21–31.
- Pfeiffenberger, C., Yamada, J., Feldheim, D.A., 2006. Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. *J. Neurosci.* 26, 12873–12884.
- Plachez, C., Richards, L.J., 2005. Mechanisms of axon guidance in the developing nervous system. *Curr. Topics Dev. Biol.* 69, 267–346.
- Prestoz, L., Chatzopoulou, E., Lemkine, G., Spassky, N., Lebras, B., Kagawa, T., Ikenaka, K., Zalc, B., Thomas, J.L., 2004. Control of axonophilic migration of oligodendrocyte precursor cells by Eph–ephrin interaction. *Neuron Glia Biol.* 1, 73–83.
- Richards, A.B., Scheel, T.A., Wang, K., Henkemeyer, M., Kromer, L.F., 2007. EphB1 null mice exhibit neuronal loss in substantia nigra pars reticulata and spontaneous locomotor hyperactivity. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2619–2628.
- Rogers, J.H., Ciossek, T., Ullrich, A., West, E., Hoare, M., Muir, E.M., 1999. Distribution of the receptor EphA7 and its ligands in development of the mouse nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 74, 225–230.
- Sieber, B.A., Kuzmin, A., Canals, J.M., Danielsson, A., Paratcha, G., Arenas, E., Alberch, J., Ogren, S.O., Ibáñez, C.F., 2004. Disruption of EphA/ephrin-a signaling in the nigrostriatal system reduces dopaminergic innervation and dissociates behavioral responses to amphetamine and cocaine. *Mol. Cell Neurosci.* 26, 418–428.
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., 1981a. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. II. Late ontogeny. *J. Comp. Neurol.* 199, 255–276.
- Specht, L.A., Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., 1981b. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny. *J. Comp. Neurol.* 199, 233–253.
- St John, J.A., Pasquale, E.B., Key, B., 2002. EphA receptors and ephrin-A ligands exhibit highly regulated spatial and temporal expression patterns in the developing olfactory system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 138, 1–14.
- Uziel, D., Garcez, P., Lent, R., Peuckert, C., Niehage, R., Weth, F., Bolz, J., 2006. Connecting thalamus and cortex: the role of ephrins. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 288, 135–142.
- Van den Heuvel, D.M., Pasterkamp, R.J., 2008. Getting connected in the dopamine system. *Prog. Neurobiol.* 85, 75–93.
- Vanderhaeghen, P., Lu, Q., Prakash, N., Frisen, J., Walsh, C.A., Frostig, R.D., Flanagan, J.G., 2000. A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex. *Nat. Neurosci.* 3, 358–365.
- Verney, C., 1999. Distribution of the catecholaminergic neurons in the central nervous system of human embryos and fetuses. *Microsc. Res. Tech.* 46, 24–47.
- Voorn, P., Kalsbeek, A., Jorritsma-Blyham, B., Groenewegen, H.J., 1988. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25, 857–887.
- Washburn, C.P., Cooper, M.A., Zhou, R., 2007. Expression of the tyrosine kinase receptor EphA5 and its ligand ephrinA5 during mouse spinal cord development. *Neurosci. Bull.* 23, 249–255.
- Wilkinson, D.G., 2001. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 155–164.
- Willson, C.A., Foster, R.D., Onifer, S.M., Whittemore, S.R., Miranda, J.D., 2006. EphB3 receptor and ligand expression in the adult rat brain. *J. Mol. Histol.* 37, 369–380.
- Yamamoto, N., Tamada, A., Murakami, F., 2003. Wiring of the brain by a range of guidance cues. *Prog. Neurobiol.* 68, 393–407.
- Yue, Y., Widmer, D.A., Halladay, A.K., Cerretti, D.P., Wagner, G.C., Dreyer, J.L., Zhou, R., 1999. Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin-B2. *J. Neurosci.* 19, 2090–2101.
- Zimmer, G., Kästner, B., Weth, F., Bolz, J., 2007. Multiple effect of ephrin-A5 on cortical neurons are mediated by Src family kinases. *J. Neurosci.* 27, 5643–5653.

Glossary

- Acb*: nucleus accumbens
Aq: aqueduct
BSA: bovine serum albumin
cLGE: caudal lateral ganglionic eminence
Cx: cortex
DAT: dopamine associated transporter
DCC: deleted colorectal cancer
eA5: ephrinA5
eASKO: ephrinA5 knock-out
HBSS: Hank's balanced salt solution
Hyp: hypothalamus
ic: inferior colliculus
KPBS: potassium phosphate buffered saline
LAPIS: ligand affinity probe in situ staining
LGE: lateral ganglionic eminence
LV: lateral ventricle
mDA axons: mesencephalic dopaminergic axons
MFb: medial forebrain bundle
MGE: medial ganglionic eminence
nCx: neocortex
oa: olfactory area
OB: olfactory bulb
oT: olfactory tract
PB: phosphate buffer
PBS: phosphate buffered saline
PFA: paraformaldehyde
RAPIS: receptor affinity probe in situ staining
RN: red nucleus
sc: superior colliculus
SN: substantia nigra
SNc: substantia nigra pars compacta
Spt: septum
St: striatum
TH: tyrosine hydroxylase
Thal: thalamus
TBS: Tris-buffered saline
vd: ventral diencephalon
VM: ventral mesencephalon
vSt: ventral striatum
vTel: ventral telencephalon
WT: wild type
IIIv: third ventricle

III. Expériences complémentaires

1. Introduction

L'étude de la voie mésostriatale présentée dans l'article précédent chez les souris éphrine-A5 *-/-*, nous a permis de mettre en évidence (1) une diminution de l'intensité du marquage de la TH, en fluorescence et en diaminobenzidine (DAB), de la voie mésostriatale et (2) une absence d'anomalie majeure dans la mise en place de cette voie au cours du développement. Ces deux observations nous ont ainsi conduits à réaliser des expériences complémentaires visant à (1) vérifier la diminution d'expression de la TH par une étude quantitative de l'enzyme en western blot et (2) étudier l'implication d'autres ligands de la famille des éphrines-A et B dans le guidage axonal des fibres exprimant la TH vers le striatum, en bloquant l'interaction entre les récepteurs Eph exprimés par ces fibres et les éphrines-A et B présentes dans l'environnement, sur des tranches de cerveau d'embryons de souris en culture. En effet, plusieurs études ont montré des phénomènes de redondance et de compensation fonctionnelle entre les membres de la famille des éphrines/Eph (*pour revue*, Blits-Huizinga *et coll.*, 2004). Chez la souris éphrine-A5 *-/-*, Peuckert *et coll.* (2008) ont récemment montré une augmentation de l'expression de 20% des gènes codant pour des molécules de la famille des éphrines/Eph, notamment le récepteur EphA5 et le ligand éphrine-A2. De plus, il a été montré, dans le système rétino-tectal, que la perte de fonction des éphrines-A2 et A3, en complément de celle d'éphrine-A5 est nécessaire pour voir apparaître des altérations de la topographie des projections rétino-tectales (Frisen *et coll.*, 1998 ; Feldheim *et coll.* 2000 ; Pfeiffenberger *et coll.*, 2006). Enfin, le récepteur EphA5, exprimé par les neurones dopaminergiques, est affiné non seulement pour éphrine-A5 mais aussi pour l'ensemble des éphrines-A (Gale *et coll.*, 1996), exprimées dans l'environnement de la voie mésostriatale (Janis *et coll.*, 1999 ; Cooper *et coll.*, 2008 ; Deschamps *et coll.*, 2009).

2. Approches techniques

a. Animaux

Des embryons, aux stades E12,5 et E16,5, et des souris adultes C57BL/6, âgés de 4 à 8 mois, de type sauvage et transgénique ont été utilisés dans cette étude. La date de conception de l'embryon a été définie à E0,5. Chez l'animal transgénique, le gène codant pour éphrine-A5 a été invalidé (éphrine-A5 *-/-*) selon la méthode décrite par Frisen *et coll.*, 1998.

b. Géotypage des souris éphrine-A5 *-/-*

L'ADN génomique des souris a été extrait à partir de 0,5cm de queue. Le tissu a été digéré dans une solution de lyse alcaline (NaOH 25mM, EDTA disodium 0,2mM, pH=12) à 94°C pendant 1h. Le lysat contenant l'ADN génomique a été ensuite neutralisé par l'ajout de TrisHCl 40mM, pH=5.

L'ADN a été amplifié par PCR en utilisant le kit Invitrogen AccuPrime Taq DNA Polymerase System. L'amorce sens est 5' TCC AGC TGT GCA GTT CTC CAA AAC A 3'. Les amorces anti-sens pour la détection de l'allèle sauvage et de l'allèle muté d'éphrine-A5 sont respectivement 5' ATT CCA AGA GGG GTG ACT ACC ACA TT 3' et 5' AGC CCA GAA AGC GAA GGA GCA AAG C 3'. Le programme de la PCR a débuté par une étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 5min. Ont suivi 30 cycles d'amplification de l'ADN composés chacun de trois étapes : une dénaturation à 94°C pendant 1min, l'hybridation des amorces à l'ADN cible à 46,5°C pendant 1min puis l'élongation des amorces par la TAQ DNA Polymérase à 72°C pendant 1min. Le programme s'est terminé par une étape à 72°C pendant 5min.

Après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, la taille des produits de PCR obtenus a permis de distinguer l'animal sauvage éphrine-A5 *+/+* (une bande à 397pb)

des animaux mutés homozygote éphrine-A5 -/- (une bande à 513pb) et hétérozygote éphrine-A5 +/- (deux bandes de 397pb et 513pb).

c. Étude quantitative par western blot de la TH chez la souris éphrine-A5 +/+ et éphrine-A5 -/-

Nous avons réalisé cette étude chez l'adulte et l'embryon au stade E16,5, stade durant lequel nous avons observé la plus importante expression d'éphrine-A5 (Deschamps *et coll.*, soumis à BMC Neurosciences). Les striata et les substances noires adultes ont été prélevés après dislocation cervicale des souris. Afin d'obtenir assez de matériel biologique par échantillon, nous avons regroupé les deux striata de chaque cerveau et les paires de substances noires de deux cerveaux. Nous avons également prélevé et regroupé les striata et les mésencéphales ventraux de 3 à 8 embryons de souris au stade E16,5. Au total, nous avons utilisé par expérience entre 8 et 12 échantillons (tableau IV).

Tableau IV – Nombre d'échantillons (n) de tissu issu du striatum, de la substance noire (SN) ou du mésencéphale ventral (MV) utilisés pour chaque expérience de western blot anti-TH chez la souris adulte et l'embryon E16,5, éphrine-A5 +/+ et éphrine-A5 -/-.

	Adulte		E16,5	
	+/+	-/-	+/+	-/-
Striatum	12	9	8	8
SN/ MV	8	8	8	8

Chaque échantillon de tissu a été homogénéisé au Potter de Thomas (800 rpm) dans 20 volumes de tampon de lyse (Tris-Base 3.03g/L, NaCl 8.77g/L, EDTA, 2H₂O 0.372g/L, NaF 500mM, PMSF 100mM) complétés d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases, puis soniqué aux ultrasons (10 secondes à 400 Watts) pour rompre les membranes cellulaires. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré et son contenu en protéines dosé selon la technique de dosage colorimétrique de Lowry *et coll.* (1951) modifiée par Pierce (DC Protein assay kit, Bio-rad). Cette méthode, qui combine une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu, est la plus couramment utilisée aujourd'hui du fait de sa très grande sensibilité. La séparation électrophorétique des protéines selon leur poids moléculaire

a été réalisée sur des gels d'acrylamide 10% (Tris 373mM pH=8,8, APS 0,05%, TEMED 1/2000) en condition dénaturante et réductrice. Leur transfert s'est ensuite effectué sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF), fluoropolymère thermoplastique très résistant. La détection de la TH et de la β -actine, contrôle interne dont l'expression ne varie pas d'un échantillon à l'autre, a été réalisée par immunomarquage sur les membranes en utilisant des anticorps monoclonaux primaires anti-TH de souris (Immunostar) et anti- β -actine de souris (Cell Signaling) dilués respectivement au 1/5000 et au 1/100000 dans la solution de saturation (BSA 5%, TBS 0,1M, Tween 0.5%). La TH a été utilisée afin de mettre en évidence les neurones dopaminergiques dans le MV et le striatum. Après incubation dans la solution d'anticorps secondaires anti-IgG de souris conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (Cell Signaling) dilués au 1/1000, la révélation a été effectuée par la technique de chimiluminescence, en utilisant le système ECL (Enhanced ChemiLuminescent, GE Healthcare). La métabolisation de ce substrat par l'HRP, couplée à l'anticorps secondaire, génère un produit qui émet de la lumière. L'image, acquise grâce au logiciel GeneSnap, a été analysée à l'aide du logiciel GeneTool. Cette méthode consiste à évaluer la densité optique de l'expression de la TH et de la β -actine du même échantillon. Le rapport de densité optique de la TH (DO TH) sur la densité optique de la β -actine (DO Actine) a été calculé. Ceci a permis normaliser le niveau d'expression de la TH, relatif à celui de la β -actine, d'un échantillon à l'autre. L'analyse statistique des résultats a été réalisée avec le logiciel Statview : la moyenne du rapport DO TH/DO Actine a été calculée pour la SN ou MV et le striatum, chez la souris éphrine-A5 +/+ et chez la souris éphrine-A5 -/-, et la différence a été analysée par un test de Student.

d. Étude de la progression de la voie mésostriatale après blocage de l'interaction éphrines/Eph, sur tranches sagittales de cerveau *ex vivo*

Les encéphales d'embryons au stade E12,5 ont été prélevés après dislocation cervicale de la mère, puis placés dans du milieu de dissection HBSS (Gibco) supplémenté de 20% de glucose (Sigma), 100U/mL de pénicilline – 100µg/mL de streptomycine (Gibco) et 35mM d'Hepes. Les méninges ont été retirées. Chaque cerveau d'embryon a été incisé selon l'axe médian, afin de le séparer en deux tranches égales d'environ 450µm d'épaisseur, dans lesquelles le trajet de la voie mésostriatale est conservé. L'une des deux tranches a servi de contrôle. Chaque tranche a été déposée sur un filtre Millicel-CM composé de mailles de 0,4µm (Millipore), en contact avec du milieu de culture Neurobasal (Gibco) supplémenté de 100U/mL de pénicilline – 100µg/mL de streptomycine (Gibco), 2mM de glutamine (Sigma) et 20% de sérum de cheval, puis incubée dans une atmosphère à 37°C contenant 5% de CO₂. Après 2h d'incubation, les protéines recombinantes EphA3 et EphB2 couplées à un fragment Fc (EphA3-Fc et EphB2-Fc) (R&D Systems) se fixant sur l'ensemble des éphrines-A et B ont été ajoutées à la concentration de 10µg/mL d'une part dans le milieu de culture et d'autre part directement sur les tranches (Passante *et coll.*, 2008). Le milieu en contact avec l'hémisphère controlatéral « contrôle » a reçu, quant à lui, uniquement le fragment Fc à 10µg/mL (Jackson ImmunoResearch). Après 2 jours *ex vivo*, le milieu de culture a été remplacé par du milieu Neurobasal (Gibco) sans sérum, supplémenté uniquement par 100U/ml de pénicilline – 100µg/ml de streptomycine (Gibco), 2mM de glutamine (Sigma) et 2% de complément B27, mais contenant toujours les protéines recombinantes ou le fragment Fc seul à la concentration de 10µg/mL. Tous les deux jours, ce milieu a été remplacé par du milieu frais, jusqu'à la fin de la culture.

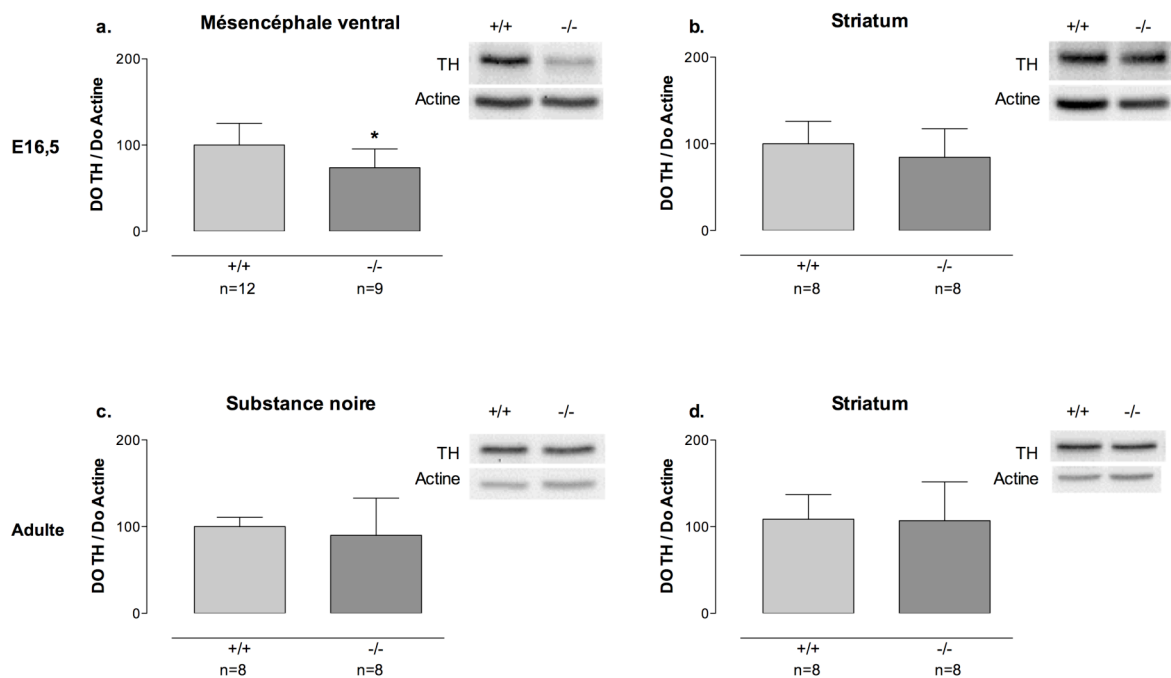


Figure XV – Quantification de la TH dans le mésencéphale ventral/substance noire et dans le striatum de la souris éphrine-A5 +/+ et éphrine-A5 -/-, au stade embryonnaire E16,5 (a et b) et chez l'adulte (c et d). a : chez l'embryon E16,5, le mésencéphale ventral présente une diminution de la TH significative de 26,1% chez la souris éphrine-A5 -/- par rapport à la souris sauvage (+/+) (* : $p = 0,0438$). b : une diminution non-significative de 15,6% est observée dans le striatum chez la souris éphrine-A5 -/- ($p = 0,3109$). c et d : aucune différence n'est observée chez l'adulte. DO TH/DO actine : rapport moyen de la densité optique de la tyrosine hydroxylase sur celle de l'actine.

e. Immunohistochimie

La culture a été stoppée par la fixation des tranches au paraformaldéhyde dilué à 4% dans du tampon TBS 0,1M, pendant 2h à température ambiante. Après plusieurs rinçages au TBS 0,1M, les tranches ont été incubées dans une solution de lait 5% et de triton X-100 0,5% dilués dans du TBS 0,1M, pendant 4h à RT, afin de saturer les sites non spécifiques. Nous avons visualisé les neurones dopaminergiques de la voie mésostriatale en incubant les tranches, durant 3 jours à 4°C, dans l'anticorps primaire monoclonal anti-TH de souris (Immunostar), dilué au 1/5000 dans la solution de blocage. Après rinçages au TBS 0,1M, les tranches ont été incubées pendant une demi-heure dans l'anticorps secondaire Alexa anti-souris 488 (Invitrogen) dilué au 1/400 dans la solution de saturation. Après 3 rinçages au TBS 0,1M, nous avons monté les tranches entre lame et lamelle dans la solution de montage DEPEX. L'observation de ces lames a été réalisée par microscopie confocale (Olympus) afin de réaliser des projections 2D de toute l'épaisseur de la tranche. Afin de concilier la meilleure résolution possible et une durée d'acquisition convenable, nous avons choisi d'utiliser un objectif x20 permettant de couvrir un champ de $500\mu\text{m}^2$ et de $1,25\mu\text{m}$ d'épaisseur, avec une résolution de 640×640 pixels. L'ouverture de l'iris confocal nous a permis d'effectuer des pas de $2\mu\text{m}$ dans l'épaisseur de la tranche. Les images ont été acquises avec le logiciel FV1000 (Olympus).

3. Résultats

a. La quantité de TH est réduite dans le mésencéphale ventral d'embryon de souris éphrine-A5 -/-

Nous avons mesuré, par western blot, la quantité de TH présente dans le MV ou la SN et dans le striatum chez la souris éphrine-A5 +/+ et éphrine-A5 -/-, au stade embryonnaire E16,5 et chez l'adulte (Figure XV). Nous avons observé une diminution significative de

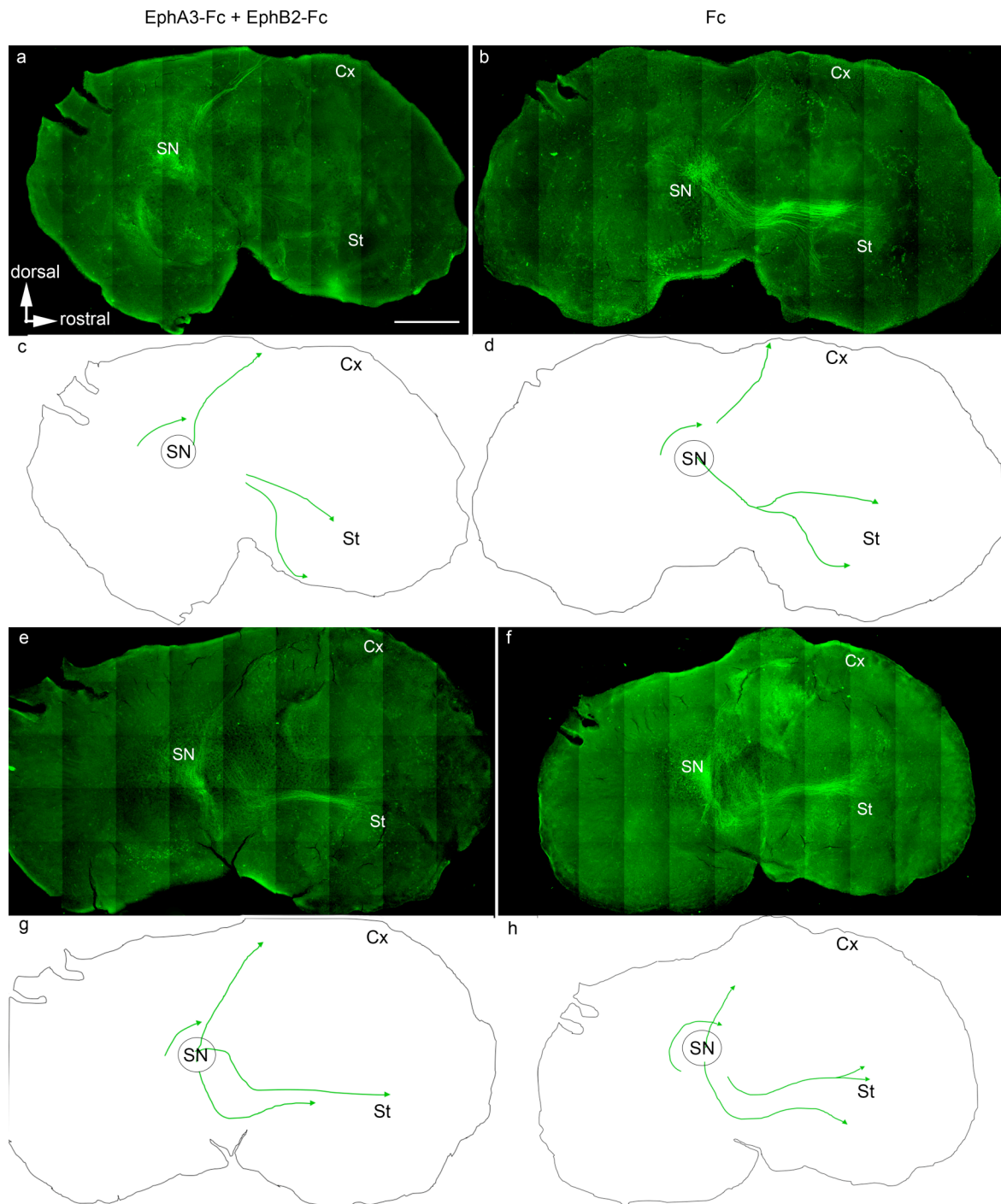


Figure XVI – Tracé *ex vivo* de la voie mésostriatale marquée par un anticorps anti-TH, après blocage de l'interaction des récepteurs Eph avec les éphrines. Pour chaque essai réalisé, une tranche sagittale à E12,5 a été mise en culture en présence de bloquants EphA3-Fc et EphB2-Fc (a et c) tandis que la tranche controlatérale a été mise en culture en présence de fragments Fc contrôles (b et d). L'intensité du marquage TH et le tracé de la voie ne sont pas reproductibles pour une même condition d'un essai à l'autre. Échelle : 600µm. SN : substance noire ; St : striatum ; Cx : cortex.

26,1% de la quantité de TH dans le MV de la souris éphrine-A5 -/- au stade embryonnaire E16,5 (* : $p = 0,0438$) (Figure XV, a). Dans le striatum, nous avons observé également une tendance à la diminution de 15,6% de la quantité de TH chez la souris éphrine-A5 -/- bien que celle-ci ne soit pas statistiquement significative ($p = 0,3109$) (Figure XV, b). Chez l'adulte, aucune différence n'a été mise en évidence, entre les souris éphrine-A5 +/+ et éphrine-A5 -/- (Figure XV, c et d).

b. Cartographie de la voie mésostriatale après blocage de l'interaction éphrines/Eph

Six tranches hémisphériques prélevées sur trois cerveaux d'embryons à E12,5 ont été mises en culture pendant 4 jours. La figure XIV présente quatre d'entre-elles. Pour chaque cerveau d'embryon, un hémisphère a été mis en présence des protéines EphA3-Fc et EphB2-Fc (Figure XVI, a et e), l'autre en présence de fragments Fc contrôles (Figure XVI, b et f). Les protéines chimériques permettent de bloquer l'interaction des éphrines-A et B présentes dans l'environnement des axones dopaminergiques, avec les récepteurs Eph exprimés par ces derniers. La signalisation directe médiée par les récepteurs Eph dans les cellules est ainsi abolie. Pour chacune de ces conditions, nous avons observé des cellules exprimant la TH dans le MV et des fibres exprimant également la TH, se dirigeant notamment vers le striatum et le télencéphale dorsal. Dans le premier essai, les fibres exprimant la TH sont moins visibles et leur marquage TH est moins intense en présence des bloquants (Figure XVI, a) qu'en présence des fragments Fc contrôles (Figure XVI, b). Dans le deuxième essai, le tracé de la voie mésostriatale est bien visible aussi bien en présence des bloquants (Figure XVI, e) qu'en présence des fragments Fc contrôles (Figure XVI, f). Enfin, dans le 3ème essai (données non présentées), le tracé des projections exprimant la TH est plus visible et l'intensité du marquage TH est plus forte en présence des bloquants qu'en présence des fragments Fc où le

tracé de la voie mésostriatale est moins marqué. Une observation à plus fort grossissement nous a permis de symboliser le trajet des fibres (Figure XVI, c, d, g et h), quel que soient les conditions de culture. Nous avons observé trois faisceaux issus du MV : le premier se dirige dorsalement tandis que les deux autres s'orientent rostralement vers le striatum ventral et dorsal. Aucune différence majeure entre ces différentes conditions n'a été mise en évidence.

4. Discussion

Ces expériences complémentaires nous ont permis de confirmer une diminution de la quantité de TH dans le MV et dans le striatum de l'embryon, observée précédemment par immunohistochimie. En revanche, le blocage de l'interaction des récepteurs Eph exprimés par les neurones dopaminergiques avec les éphrines de l'environnement n'a pas montré d'altération de la progression de la voie mésostriatale *ex vivo*.

a. Diminution de la TH dans le système mésostriatal embryonnaire chez la souris éphrine-A5 -/-

La confirmation de la réduction de l'expression de la TH dans le MV et le striatum, chez la souris éphrine-A5 -/- à E16,5, nous permet de formuler deux hypothèses. L'absence d'éphrine-A5 entraîne, chez l'embryon, soit une diminution du nombre de cellules exprimant la TH, soit une diminution du taux de TH dans les cellules dopaminergiques.

L'hypothèse d'une diminution du nombre de cellules exprimant la TH dans le MV de l'embryon de souris éphrine-A5 -/- pourrait être vérifiée à E16,5 par stéréologie. Cette méthode statistique permet d'estimer le nombre de cellules du MV en 3 dimensions à partir de mesures effectuées sur l'ensemble des différentes sections en 2 dimensions. Si une diminution du nombre de cellules exprimant la TH est avérée en l'absence d'éphrine-A5, une étude de l'apoptose par la méthode TUNEL et une étude de prolifération grâce à l'intercalant 5-bromo-

2-deoxyuridine (BrdU) couplées à une immunohistochimie anti-TH pourraient être envisagées au niveau du MV, sur des coupes coronales à E12,5 de cerveau de souris éphrine-A5 +/+ et éphrine-A5 -/-. L'expérience de prolifération devrait mettre en évidence les cellules dopaminergiques en mitose lors de l'incorporation de BrdU effectuée *in vivo* dans les femelles gestantes au stade E9.5, soit avant que ces cellules ne deviennent post-mitotiques à E12,5 (Thompson *et coll.*, 2006 ; Jensen *et coll.*, 2007).

C'est plus probablement par une action sur les mécanismes de prolifération qu'éphrine-A5 induirait l'augmentation du nombre de cellules dopaminergiques exprimant la TH. En effet, Flenniken *et coll.* (1996) ont montré l'expression d'éphrine-A5 dans le MV entre E8,5 et E10,5, lorsque les neurones dopaminergiques sont en prolifération (Thompson *et coll.*, 2006 ; Jensen *et coll.*, 2007). À ces stades, plus particulièrement aux stades E8,5 et E9,5, le seul récepteur d'éphrine-A5 exprimé dans le MV est EphB2 (Henkemeyer *et coll.*, 1994, 1996). En effet, les cellules dopaminergiques du MV n'expriment le récepteur EphA5 qu'à partir de E11 (Cooper *et coll.*, 2009 ; Deschamps *et coll.*, 2009) et faiblement EphA7 entre E12,5 et E14,5 (Rogers *et coll.*, 1999). De plus, la signalisation médiée par EphA7 serait impliquée dans l'apoptose via la caspase 3 (Depaepe *et coll.*, 2005), tandis que plusieurs études ont montré l'implication de la signalisation médiée par EphB2 dans l'induction de la prolifération cellulaire, notamment chez l'adulte au niveau de la zone sous-ventriculaire (Conover *et coll.*, 2000). En dehors du système nerveux, il a également été observé une réduction de la prolifération des cellules souches intestinales, chez les souris mutantes EphB2/EphB3 -/- (Holmberg *et coll.*, 2006). Récemment, Noberini et Pasquale (2009) ont montré que la signalisation médiée par EphB2 augmente la prolifération des cellules intestinales via l'activation de la protéine kinase Abl et la cycline D1. Ainsi, durant les stades E8,5 et E9,5, l'interaction éphrine-A5/EphB2 participerait à la prolifération des cellules exprimant la TH dans le MV, via la signalisation directe médiée par EphB2. Chez la souris

éphrine-A5 *-/-*, l'absence d'interaction d'éphrine-A5 avec EphB2 entraînerait une diminution de la prolifération, qui pourrait être également observée chez la souris EphB2 *-/-*. Pour tester cette hypothèse, une étude de la prolifération, utilisant l'intercalant BrdU incorporé dans des femelles gestantes à E9,5, couplée à une immunohistochimie anti-TH pourrait être envisagée sur des coupes coronales de cerveau au stade E12,5 chez la souris EphB2 *-/-* (Chen *et coll.*, 2004). Il est cependant intéressant de noter que la diminution du nombre de cellules exprimant la TH dans le MV chez l'embryon éphrine-A5 *-/-* serait transitoire et probablement compensée plus tard au cours du développement. En effet, nous n'avons observé aucune différence de quantité de TH en western blot chez l'adulte, à l'instar de nos observations en immunohistochimie (Deschamps *et coll.*, 2009). De la même manière, aucune différence du nombre de cellules n'a été mise en évidence dans le MV, chez la souris adulte éphrine-A5 *-/-* (Cooper *et coll.*, 2008), ni chez la souris adulte dans laquelle l'interaction des éphrines-A avec EphA5 a été perturbée (Sieber *et coll.*, 2004).

L'hypothèse d'une diminution du taux de TH dans les cellules dopaminergiques en absence d'éphrine-A5 serait également envisageable et pourrait s'expliquer par le fait que la signalisation directe médiée par les récepteurs EphA soit impliquée dans la différenciation des précurseurs neuronaux dopaminergiques. En effet, Aoki *et coll.* (2004) ont montré que l'expression des ARNm codant pour la TH, et d'autres marqueurs neuronaux dopaminergiques comme Ptx-3 et l'AADC (L-aromatic amino acid decarboxylase), augmente dans les précurseurs neuronaux en culture traités avec la protéine chimérique éphrine-A1-Fc, qui active la signalisation directe médiée par les récepteurs EphA. Ephrine-A5 pourrait donc assurer un certain niveau d'expression de la TH dans les cellules du MV, par l'intermédiaire du récepteur EphA5 majoritairement exprimé dans cette région (Deschamps *et coll.*, 2009).

b. Mise en évidence *ex vivo* d'une compensation fonctionnelle d'éphrine-A5 dans le guidage des fibres issues du mésencéphale ventral et exprimant la TH

L'absence d'anomalie topographique de la voie mésostriatale chez l'embryon éphrine-A5 *-/-* nous a amené à tester l'effet d'une compensation fonctionnelle d'éphrine-A5 par d'autres éphrines. En effet, Peuckert *et coll.* (2008) ont montré une augmentation de l'expression d'éphrine-A2 dans le cortex de souris éphrine-A5 *-/-*. De plus, éphrine-A2, exprimée dans le striatum pendant le développement, présente une forte homologie de séquence avec éphrine-A5 (Yue *et coll.*, 1999). Aussi, éphrine-A2 pourrait être l'une des molécules compensant la perte de fonction d'éphrine-A5. De même, la structure globale d'éphrine-A5 présentant de fortes similitudes avec les éphrines-B1 et B2 (Nikolov *et coll.*, 2007) et l'éphrine-B2 étant exprimée dans le striatum (Yue *et coll.*, 1999), il est possible que cette dernière contribue également à la compensation de la perte de fonction d'éphrine-A5. Afin de tester l'implication de l'ensemble des éphrines-A et B dans l'établissement de la voie mésostriatale, nous avons réalisé un modèle tissulaire *ex vivo* consistant à contrecarrer l'interaction des récepteurs Eph exprimés par les neurones dopaminergiques avec les éphrines de l'environnement. Ceci a été effectué par l'ajout des protéines chimériques EphA3-Fc et EphB2-Fc se fixant sur toutes les éphrines-A et B exprimées dans une tranche sagittale d'embryon E12,5, selon le modèle développé par Dufour *et coll.* (2003) et Passante *et coll.* (2008) dans le striatum. Par cette approche chez l'embryon, nous n'avons pas mis en évidence d'altération majeure de l'établissement de la voie mésostriatale. Pourtant, chez l'adulte, Sieber *et coll.* (2004) ont montré, par l'utilisation d'un traceur de la voie mésostriatale, une réduction de l'innervation dopaminergique du striatum lors de l'inhibition totale des interactions éphrines-A/EphA. Aussi, un traçage de cette voie dans notre modèle de tranches *ex vivo* par injection d'un traceur rétrograde dans le striatum dorsal pourrait nous permettre de

détecter des variations fines du nombre de projections sur le striatum. Ceci pourrait être réalisé chez l'animal éphrine-A5 $-/-$ d'une part et d'autre part lors du blocage de la signalisation directe médiée par les récepteurs Eph exprimés par les neurones dopaminergiques en utilisant les protéines chimériques EphA3-Fc et EphB2-Fc.

Ces expériences complémentaires ont ainsi montré qu'éphrine-A5 est impliquée dans le développement des cellules dopaminergiques du MV chez l'embryon, probablement par son action sur les mécanismes de prolifération des neurones exprimant la TH dans le MV. L'absence de cette molécule et le blocage de l'interaction des éphrines-A et B présentes dans l'environnement avec les récepteurs Eph exprimés par les neurones dopaminergiques de la voie mésostriatale, n'entraînant pas d'altération majeure du développement, suggèrent que d'autres acteurs issus de différentes familles de molécules de guidage exprimées dans ce système (revue détaillée en Introduction, paragraphe III. 2. b.) sont probablement impliqués dans le guidage axonal des neurones dopaminergiques issus du MV.

DISCUSSION GÉNÉRALE

I. RAPPEL DES RESULTATS	119
II. PROPOSITION D'UN NOUVEAU MODELE DE GUIDAGE AXONAL DES VOIES MESOSTRIATALE ET MESOCORTICALE	120
III. VERS DE NOUVELLES PISTES DE RECHERCHE DU ROLE DES EPHRINES/EPH DANS LA REPARATION DE LA VOIE MESOSTRIATALE LESEE CHEZ L'ADULTE	126
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE CONTROLE DU GUIDAGE AXONAL APRES GREFFE DANS LA SUBSTANCE NOIRE LESEE	132

Index des figures et tableau

- Figure XVII – Expression des molécules de guidage axonal diffusibles et membranaires ou trans-membranaires dans le cerveau du rongeur, impliquées dans le guidage rostro-ventral des axones des neurones dopaminergiques issus du mésencéphale ventral. _____ 120
- Figure XVIII – Expression des molécules de guidage diffusibles et membranaires ou transmembranaires dans le cerveau du rongeur, participant au maintien de la direction rostro-ventrale des voies mésostriatale et mésocorticale _____ 121
- Figure XIX – Expression des molécules de guidage axonal diffusibles et membranaires ou trans-membranaires dans le cerveau du rongeur, impliquées dans la mise en place des projections mésostriatales et mésocorticales. _____ 122

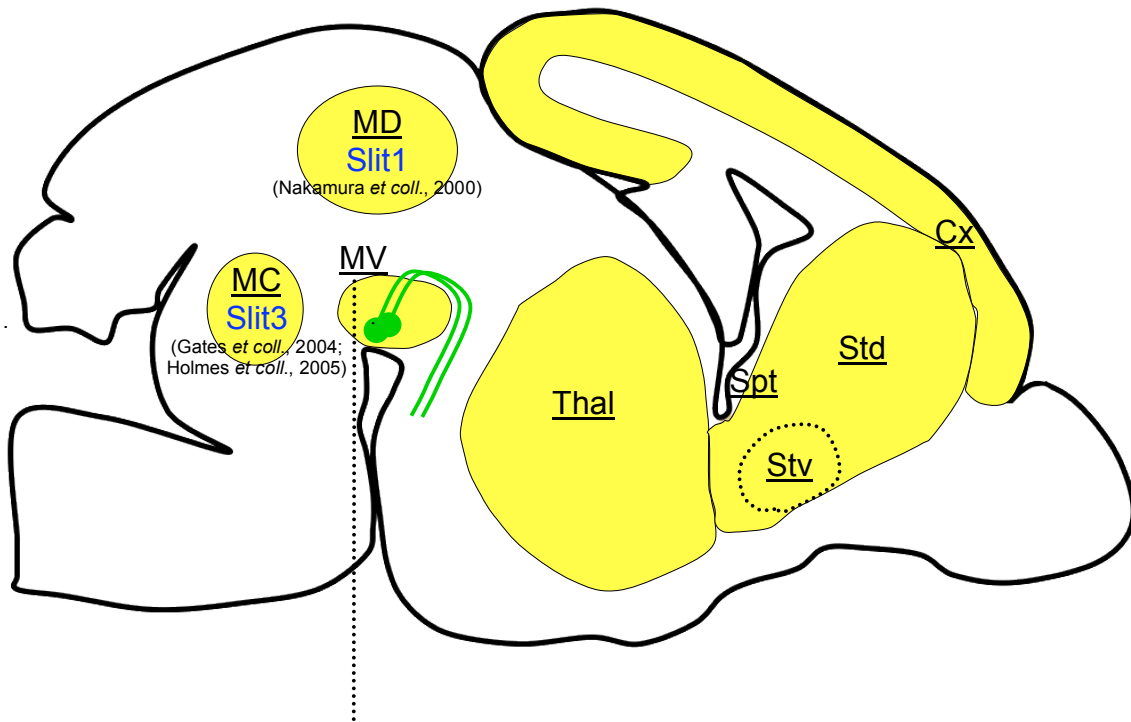
I. Rappel des résultats

Durant ce travail de thèse, nous avons étudié l'expression spatio-temporelle de la protéine éphrine-A5 dans l'ensemble du cerveau de souris, au cours du développement embryonnaire et chez le nouveau-né (Deschamps *et coll.*, soumis à BMC Neuroscience), et recherché le rôle de cette molécule de guidage dans l'établissement de la voie mésostriatale (Deschamps *et coll.*, 2009).

Pendant l'embryogenèse entre E12,5 et E16,5, nous avons observé une forte expression de la protéine éphrine-A5 puis une diminution de l'intensité du marquage à partir de E18,5 jusqu'à la disparition presque totale du signal à P0. Nous avons détecté la présence de la protéine éphrine-A5 dans le bulbe olfactif, le colliculus supérieur, le cortex, le thalamus, et le striatum. L'expression de la protéine éphrine-A5 au cours du développement semble ainsi être corrélée avec l'établissement des projections topographiques des systèmes olfactif, rétino-tectal, thalamocortical, corticothalamique et mésostriatal, suggérant l'implication de la protéine éphrine-A5 dans le développement de ces différents systèmes.

Nous avons plus précisément montré dans le système mésostriatal, *in vitro* et *in vivo*, qu'une proportion de neurones dopaminergiques exprime EphA5, récepteur du ligand éphrine-A5. De plus, nous avons montré, par *stripe assay*, que la protéine purifiée éphrine-A5 exerce un effet répulsif sur la majorité des projections dopaminergiques. *In vivo*, nous avons détecté, pendant l'embryogenèse et le développement postnatal, l'expression de la protéine éphrine-A5 selon un gradient décroissant rostro-caudal et ventro-dorsal à proximité des axones dopaminergiques dans le télencéphale ventral et dans le striatum. D'autres ligands du récepteur EphA5 ont également été détectés au niveau de la voie mésostriatale (Deschamps *et coll.*, 2009). Chez l'embryon de souris éphrine-A5 *-/-*, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de la TH dans le MV et dans le striatum suggérant qu'éphrine-A5 pourrait être impliquée dans la prolifération des neurones dopaminergiques et/ou dans la

E11,5 - E13,5



-**Nétrine-1/DCC** (Vitalis *et coll.*, 2000; Lin *et coll.*, 2005)

-**Robo1/Robo2** (Lin *et coll.*, 2005; Marillat *et coll.*, 2002)

-**Séma3A/Séma3F/Npn1/Npn2/Plexine A1/Plexine A3/NrCAM/L1CAM** (Kolk *et coll.*, 2009; Torre *et coll.*, 2010)

-**EphA5/éphrines-A** (Cooper *et coll.*, 2009; Deschamps *et coll.*, 2009)

Figure XVII – Expression des molécules de guidage axonal diffusibles et membranaires ou transmembranaires dans le cerveau du rongeur, potentiellement impliquées dans le guidage rostro-ventral des axones des neurones dopaminergiques issus du mésencéphale ventral. Les fibres dopaminergiques issues du MV sont illustrées en vert. MV : mésencéphale ventral ; MC : mésencéphale caudal ; MD : mésencéphale dorsal ; Cx : cortex ; Thal : thalamus ; Spt : septum ; Stv : striatum ventral ; Std : striatum dorsal ; ATV : aire tegmentale ventrale ; SN : substance noire ; Npn1 et 2 : neuropiline 1 et 2 ; DCC : récepteur « deleted colorectal cancer ».

régulation du niveau cellulaire de TH. L'ensemble de ces résultats montre que les éphrines-A, et plus particulièrement éphrine-A5, participent au développement, au guidage axonal et à la mise en place topographique des connexions dopaminergiques mésostriatales. Ces données nous permettent de compléter le modèle de guidage axonal des voies mésostriatale et mésocorticale, décrit précédemment par Van Den Heuvel et Pasterkamp (2008).

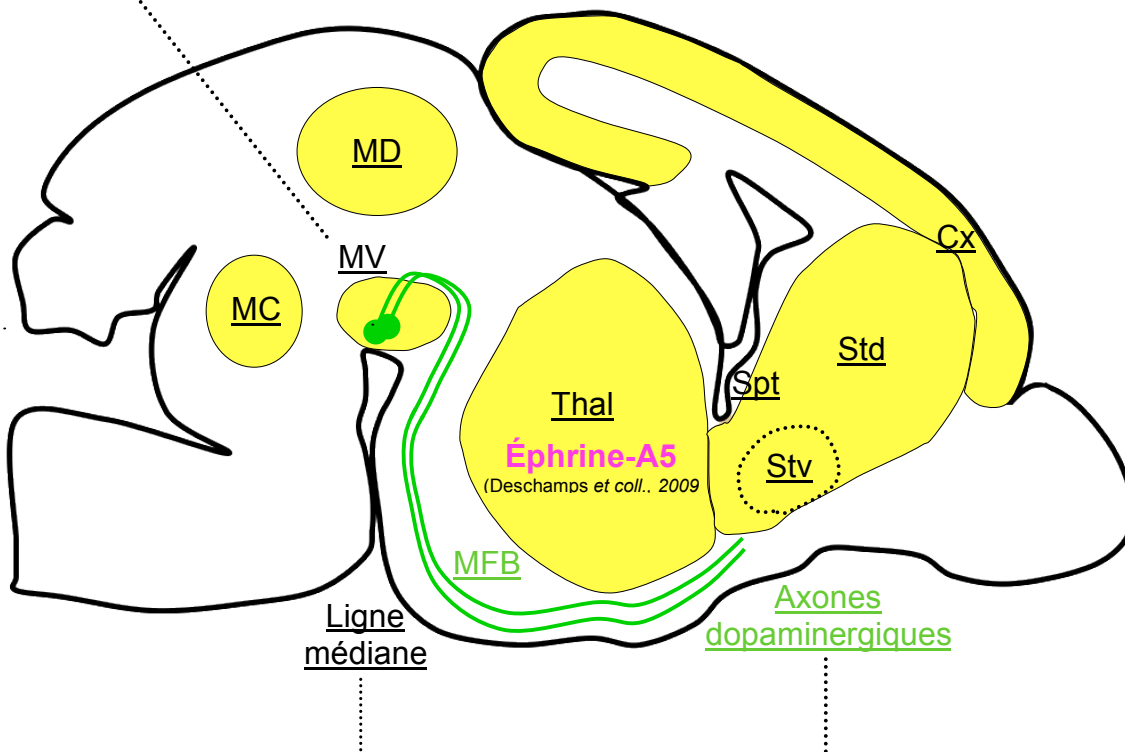
II. Proposition d'un nouveau modèle de guidage axonal des voies mésostriatale et mésocorticale

Depuis leur émergence à E12,5, les axones des neurones dopaminergiques de la voie mésostriatale doivent parcourir une longue distance du MV jusqu'à leur cible, le striatum. Chez la souris, les projections dopaminergiques sortent du MV en s'orientant vers les régions caudales et dorsales du cerveau. Un jeu de répulsion et d'attraction issues du mésencéphale caudal (MC) et du mésencéphale dorsal (MD) participerait au changement de direction du faisceau qui s'oriente alors rostralement pour former le MFB (Gates *et coll.*, 2004). Plusieurs familles de molécules prendraient part à cette répulsion : des molécules diffusibles et des molécules membranaires, respectivement illustrées en bleu et rose dans la figure XVII. La sécrétion de la nétrine-1 dans le MV participerait au maintien de la direction ventrale des axones dopaminergiques exprimant le récepteur DCC. En effet, chez la souris dont le gène codant pour le facteur de transcription Pax6 a été invalidé, l'expression ectopique de nétrine-1, observée au niveau de la zone de transition entre le thalamus dorsal et le prétegmentum, attire la plupart des neurones dopaminergiques exprimant le récepteur à la nétrine, DCC, qui poursuivent alors leur trajectoire dorsalement (Vitalis *et coll.*, 2000). En outre, l'interaction répulsive entre les récepteurs Robo1 et Robo2 exprimés par les neurones dopaminergiques (Lin *et coll.*, 2005 ; Marillat *et coll.*, 2002), et leurs ligands Slit1 et Slit3 respectivement présents dans le MD et MC y participerait aussi (Marillat *et coll.*, 2002 ; Gates *et coll.*, 2004 ;

E13.5

Séma3F

(Torre *et coll.*, 2010 ;
Kolk *et coll.*, 2009)



- **Slit1/Slit2** (Bagri *et coll.*, 2002; Marin *et coll.*, 2002, Kawano *et coll.*, 2008)
- **Séma3A** (Kawano *et coll.*, 2003)
- **Shh** (Hammond *et coll.*, 2009)

- **EphA5** (Deschamps *et coll.*, 2009; Cooper *et coll.*, 2009)
- **Robo1/Robo2** (Lin *et coll.*, 2005; Marillat *et coll.*, 2002)
- **Npn1/Npn2/Plexine A1/Plexine A3** (Torre *et coll.*, 2010; Kolk *et coll.*, 2009)
- **Patched/Smoothed** (Hammond *et coll.*, 2009)

Figure XVIII – Expression des molécules de guidage diffusibles et membranaires ou transmembranaires dans le cerveau du rongeur, potentiellement impliquées dans le maintien de la direction rostro-ventrale des voies mésostriatale et mésocorticale. Les fibres dopaminergiques issues du MV sont illustrées en vert. Le striatum ventral, futur noyau accumbens, est délimité par les pointillés. MV : mésencéphale ventral ; MC : mésencéphale caudal ; MD : mésencéphale dorsal ; Cx : cortex ; MFB : faisceau de fibres reliant le MV au télencéphale ; Thal : thalamus ; Spt : septum ; Std : striatum dorsal ; Stv : striatum ventral ; ATV : aire tegmentale ventrale ; SN : substance noire ; Shh : sonic hedgehog ; Npn1 et 2 : neuropiline 1 et 2

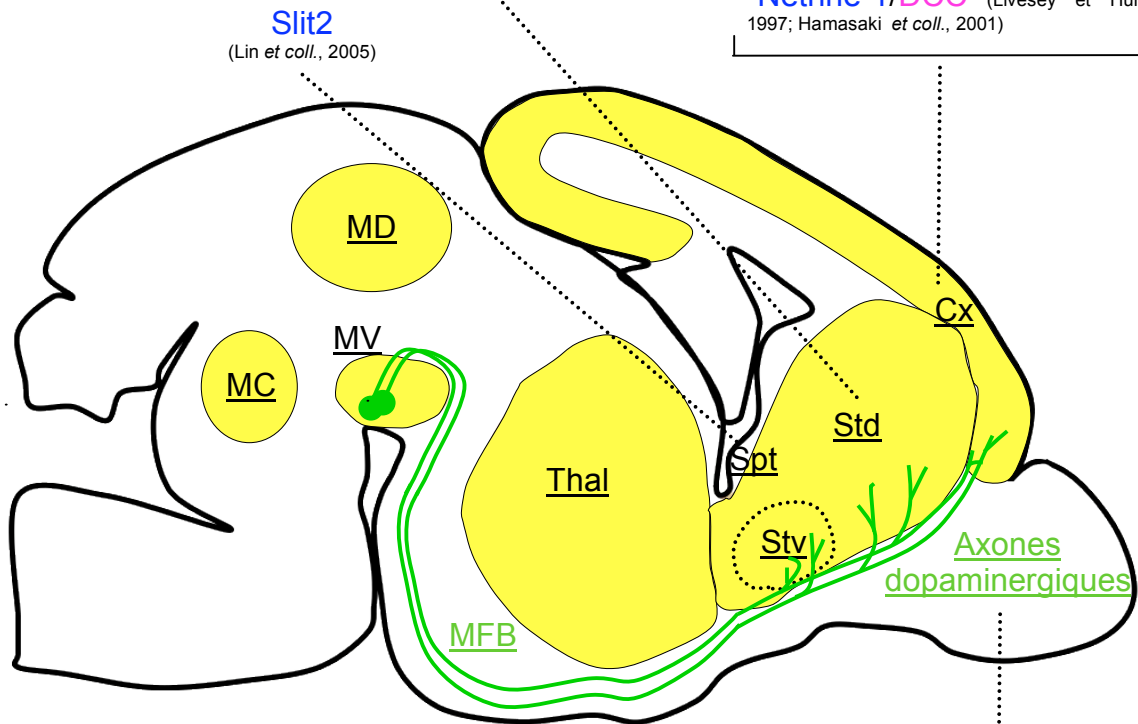
Holmes *et coll.*, 1995). La présence de la protéine Séma3A détectée à E13,5 dans le MV et celle de ses récepteurs et co-récepteurs exprimés par les neurones dopaminergiques, Npn1 et Npn2, les Plexines A1 et A3, et L1CAM et NrCAM, (Torre *et coll.*, 2010) pourraient également participer, par répulsion, au guidage axonal des neurones dopaminergiques émergents. De plus, le gradient croissant rostro-caudal de la protéine membranaire Séma3F dans le MV contribuerait également à leur prise de direction rostrale en repoussant les axones vers l'avant comme suggéré par Kolk *et coll.* (2009). Enfin, l'expression du récepteur EphA5 par les neurones dopaminergiques du MV dès E11,5 (Cooper *et coll.*, 2009 ; Deschamps *et coll.*, 2009) et de ses ligands putatifs (Deschamps *et coll.*, 2009) suggèrent une implication de ce récepteur dans le guidage axonal des fibres dopaminergiques émergentes.

Une fois ce changement de direction effectué, dès E13,5, les axones dopaminergiques empruntent le MFB (Figure XVIII). La protéine diffusible Séma3F mise en évidence dans le MV participerait à la fasciculation du MFB, via son interaction répulsive avec le récepteur Npn2 exprimé à la surface des neurones dopaminergiques (Torre *et coll.*, 2010 ; Kolk *et coll.*, 2009). En outre, l'expression de la protéine membranaire, éphrine-A5, dans le thalamus (Deschamps *et coll.*, 2009 ; Deschamps *et coll.*, soumis à *BMC Neuroscience*) permettrait de maintenir les fibres dopaminergiques du MFB en position ventrale. Ceci se ferait d'une part, par le biais de son action répulsive via le récepteur EphA5 exprimé par les neurones dopaminergiques de la voie mésostriatale (Deschamps *et coll.*, 2009) et d'autre part, par son action promotrice de la croissance axonale (Cooper *et coll.*, 2008) puisqu'il a été montré, *in vitro*, que les neurones issus du MV progressent sur les co-explants thalamiques mais ne s'y connectent pas (Gates *et coll.*, 2004). La présence des molécules diffusibles répulsives Slit1 et Slit2 détectées dès E13,5 au niveau de la ligne médiane (Bagri *et coll.*, 2002 ; Marin *et coll.*, 2002) préviendrait le croisement de cette ligne par les fibres du MFB, via leurs interactions

E14,5 - E18,5

- Éphrine-A5 (Deschamps *et coll.*, 2008; Cooper *et coll.*, 2008)
- Éphrine-B2 (Yue *et coll.*, 1999)
- Séma7A/Plexine C1 (Pasterkamp *et coll.*, 2007)
- Nétrine-1/DCC (Livesey et Hunt, 1997; Hamasaki *et coll.*, 2001)
- Éphrine-A2 (Janis *et coll.*, 2005)
- Éphrine-A3 (Janis *et coll.*, 2005)

- Éphrine-A5 (Deschamps *et coll.*, 2009; Cooper *et coll.*, 2009)
- Slit2 (Marillat *et coll.*, 2002)
- Séma3F (Kolk *et coll.*, 2009)
- Séma7A/Plexine C1 (Pasterkamp *et coll.*, 2007)
- Nétrine-1/DCC (Livesey et Hunt, 1997; Hamasaki *et coll.*, 2001)



- EphA5 (sauf projections vers le cortex) (Deschamps *et coll.*, 2008; Cooper *et coll.*, 2009)
- EphB1 (Yue *et coll.*, 1999)
- Robo1/Robo2 (Lin *et coll.*, 2005; Marillat *et coll.*, 2002)
- Plexine C1/Séma7A (Pasterkamp *et coll.*, 2007)
- Séma3A/Séma3F/Npn1/Npn2/Plexine A1/Plexine A3 (Torres *et coll.*, 2010)
- Nétrine-1/DCC/UNC5 (Vitalis *et coll.*, 2000; Lin *et coll.*, 2005; Xu *et coll.*, 2010)

Figure XIX – Expression des molécules de guidage axonal diffusibles et membranaires ou transmembranaires dans le cerveau du rongeur, potentiellement impliquées dans la mise en place des projections mésostriatales et mésocorticales. Les fibres dopaminergiques issues du MV sont illustrées en vert. Le striatum ventral, futur noyau accumbens, est délimité par les pointillés. MV : mésencéphale ventral ; MC : mésencéphale caudal ; MD : mésencéphale dorsal ; Cx : cortex ; MFB : faisceau de fibres reliant le MV au télencéphale ; Thal : thalamus ; Spt : septum ; Std : striatum dorsal ; Stv : striatum ventral ; ATV : aire tegmentale ventrale ; SN : substance noire ; DCC : récepteur « deleted colorectal cancer » ; Npn1 et 2 : neuropiline 1 et 2

avec Robo1 et Robo2, mis en évidence dans les neurones dopaminergiques du MV (Lin *et coll.*, 2005 ; Kawano *et coll.*, 2003). De même, l'interaction répulsive de Séma3A, également exprimée au niveau de la ligne médiane, avec ses récepteurs Npn1 et Npn2 et les Plexines A1 et A3 exprimés par les neurones dopaminergiques dans le MV, maintiendrait celles-ci dans leur trajectoire ipsilatérale (Bagri *et coll.*, 2002 ; Kawano *et coll.*, 2003 ; Torre *et coll.*, 2010). L'expression de la protéine diffusible et répulsive Shh au niveau de la ligne médiane semble également être impliquée dans le maintien de la direction ventrale des axones les plus médians, via les récepteurs Patched et Smoothened exprimés par les neurones dopaminergiques. Ceci permettrait ainsi de séparer les fibres de la voie mésostriatale, en position latérale, et de la voie mésocorticale, en position médiane (Hammond *et coll.*, 2009).

À partir de E14,5, les axones dopaminergiques projettent vers la partie la plus caudale du striatum ventral (Figure XIX), dans laquelle est observée une forte expression des éphrines-A dont éphrine-A5 (Deschamps *et coll.*, 2009). Le gradient d'expression décroissant ventro-dorsal et rostro-caudal de la protéine éphrine-A5 dans le striatum couplé à une répulsion issue du cortex, dans lequel éphrine-A5 est aussi fortement exprimée (Deschamps *et coll.*, 2009 ; Deschamps *et coll.*, soumis à BMC Neuroscience), conditionnerait la mise en place de la topographie des projections sur le striatum et le cortex. En effet, notre étude en *stripe assay* a montré que les axones des neurones dopaminergiques du MV ne sont pas tous repoussés par éphrine-A5, suggérant que plusieurs sous-populations de neurones dopaminergiques issus du MV coexistent. Associé au gradient d'expression d'éphrine-A5 dans le télencéphale, nous proposons l'hypothèse que trois sous-populations de neurones exprimant différents niveaux de récepteurs EphA5 seraient issues du MV embryonnaire et répondraient ainsi de manière différente aux gradients d'expression d'éphrine-A5 dans le télencéphale. Une première sous-population de neurones dopaminergiques exprimant une

forte concentration de récepteur EphA5 répondrait ainsi fortement à l'influence répulsive d'éphrine-A5, ce qui entraînerait le changement de direction de leurs axones vers le striatum dorsal exprimant peu la protéine éphrine-A5. Une deuxième sous-population de neurones dopaminergiques, exprimant une faible concentration de récepteur EphA5, serait moins sensible à la présence d'éphrine-A5 et se connecterait ainsi sur le striatum ventral exprimant fortement cette protéine. Enfin, une troisième sous-population de neurones dopaminergiques, n'exprimant pas le récepteur EphA5, ne serait pas influencée par la forte concentration d'éphrine-A5 et poursuivrait sa trajectoire rostro-ventrale pour se connecter sur le cortex préfrontal. La répulsion issue du cortex, également médiée par éphrine-A5, participerait au maintien des projections striatales, en contenant les axones exprimant le récepteur EphA5 dans le striatum. Ce type de mise en place de cartes topographiques par le biais de gradients de concentration est un phénomène fréquemment observé lors du fonctionnement des éphrines et bien décrit pour les systèmes retinotectal et thalamocortical (Flanagan, 2006). D'autres éphrines et Eph seraient également impliqués dans la mise en place des connexions mésostriatales comme le récepteur EphB1, dont l'ARNm est exprimé de manière différentielle dans le MV. EphB1 étant plus fortement exprimé par les neurones dopaminergiques de la SNc que par les neurones dopaminergiques de l'ATV, son interaction répulsive avec le ligand éphrine-B2, présent en grande concentration dans le striatum ventral, participerait à l'orientation des projections axonales issues de la SNc vers la région dorsale de ce dernier (Yue *et coll.*, 1999 ; Hu *et coll.*, 2004). Les neurones dopaminergiques de la SNc exprimant Robo1 et 2 et ceux de l'ATV exprimant majoritairement Robo2 seraient guidés grâce à l'expression de Slit2 dans les régions adjacentes au striatum, comme le cortex et le septum (Lin *et coll.*, 2005 ; Marillat *et coll.*, 2002). En effet, l'interaction répulsive Robo1/Slit2 permettrait de restreindre les projections issues de la SNc au niveau du striatum. À E15,5 chez le rat, Parsterkamp *et coll.* (2007) ont montré une forte expression du récepteur

Plexine C1 par les neurones dopaminergiques du MV et la présence de son ligand Séma7A dans le striatum et le cortex. Ceci suggère que l'interaction Plexine C1/Séma7A puisse également participer au guidage des neurones dopaminergiques issus du MV vers les régions télencéphaliques (Pasterkamp *et coll.*, 2007). Séma3F exprimée dans le cortex participerait également au guidage des axones des neurones dopaminergiques via une interaction attractive avec le récepteur Npn2 exprimé par ces neurones, comme montré par Kolk *et coll.* (2009), bien que d'autres récepteurs des sémaphorines comme Npn1 et les Plexines A1 et A3 ont également été mis en évidence dans ces neurones (Torre *et coll.*, 2010). L'interaction attractive nétrine-1/DCC pourrait également participer au guidage des axones dopaminergiques sur le striatum et le cortex, par le biais de l'expression du ligand nétrine-1 dans ces régions cibles et de celle du récepteur DCC par les neurones dopaminergiques du MV (Livesey et Hunt, 1997 ; Hamasaki *et coll.*, 2001). Récemment, une étude a également mis en évidence l'expression de récepteurs homologues de la famille des UNC5 par une partie des neurones dopaminergiques à E18, chez le rat (Xu *et coll.*, 2010). Or, les neurones exprimant les récepteurs UNC5 et DCC peuvent être attirés ou repoussés par la nétrine-1, en fonction notamment de la concentration du facteur de signalisation intracellulaire, l'AMPC (Moore *et coll.*, 2007). Ceci suggère ainsi des guidages axonaux différents entre les neurones exprimant uniquement le récepteur DCC et ceux exprimant les deux types de récepteurs. Enfin, la présence des éphrines-A2, A3 et A5, différemment exprimées dans les compartiments du striatum, matrice et striosomes, suggère leur implication dans la formation et le maintien des connexions mésostriatales (Janis *et coll.*, 1999).

L'ensemble de cette étude met en évidence une grande diversité de molécules de guidage exprimées d'une part par les neurones dopaminergiques issus du MV et d'autre part présentes dans leur microenvironnement. Ces neurones projettent sur différentes régions

cibles, le cortex, le striatum dorsal et le striatum ventral, et sont ainsi à l'origine des voies mésocorticale, nigrostriée et mésolimbique chez l'adulte. L'identification de marqueurs protéiques de ces différentes voies ou sous-populations de neurones est un enjeu important pour l'étude de leur mise en place au cours du développement. L'étude des molécules de guidage dans ces systèmes montre une expression différentielle, dans les neurones dopaminergiques issus du MV, de Robo, UNC5, DCC, EphB1 et EphA5, qui pourraient constituer ainsi un ensemble de marqueurs de ces différentes sous-populations neuronales. Ainsi, il serait intéressant d'identifier plus précisément le phénotype, l'origine et la région cible, des neurones dopaminergiques issus du MV exprimant ces différentes molécules, comme cela a déjà été montré pour *Girk2*, la calbindine et DAT exprimés différemment dans les neurones dopaminergiques de l'ATV et de la SNc (Wei *et coll.*, 1997 ; Fujita *et coll.*, 1993 ; Björklund et Dunnet, 2007). Ceci peut être envisagé par immunohistochimie et traçages rétrograde et antérograde des voies mésostriatale, mésocorticale et mésolimbique. À titre d'exemple dans notre étude, nous proposons l'existence de trois sous-populations de neurones dopaminergiques répondant de manière différentielle au gradient d'éphrine-A5 présent dans le télencéphale : une première sous-population exprimant fortement le récepteur EphA5 qui se connecterait au niveau de la partie dorsale du striatum, une deuxième sous-population exprimant de plus faibles taux de récepteur EphA5 qui se connecterait au niveau du striatum ventral et une troisième sous-population n'exprimant pas le récepteur qui continuerait sa progression en direction du cortex préfrontal, n'étant pas influencée par la présence d'éphrine-A5 dans cette région (Deschamps *et coll.*, 2009). EphA5 pourrait donc être utilisé comme marqueur de la voie mésostriatale, si les fibres de la voie mésocorticale ne l'expriment pas. Pour le vérifier, il est envisageable d'effectuer un traçage de ces voies dopaminergiques par injection d'un marqueur rétrograde au niveau du MV, couplé à une immunohistochimie dirigée contre EphA5. L'identification de marqueurs spécifiques des

sous-populations dopaminergiques issues du MV au cours du développement devrait permettre d'approfondir la compréhension du guidage axonal différentiel des voies mésocorticale et mésostriatale.

III. Vers de nouvelles pistes de recherche du rôle des éphrines/Eph dans la réparation de la voie mésostriatale lésée chez l'adulte

Aubert *et coll.* ont avancé, en 1995, l'idée que les molécules et les mécanismes impliqués dans les processus développementaux au cours de l'embryogenèse sont réutilisés lors de la régénération axonale chez l'adulte, par exemple en réponse à une lésion traumatique ou lors d'une maladie neurodégénérative, afin de rétablir l'intégrité fonctionnelle des circuits neuronaux. L'étude de l'implication fonctionnelle des éphrines/Eph pendant le développement ne relève donc pas seulement de la recherche fondamentale, mais peut ouvrir de nouvelles pistes de recherche sur leur rôle après une lésion chez l'adulte, et lors de la reconstruction des voies lésées après greffe cellulaire. Dans ce type de thérapie, l'enjeu pour les axones des neurones greffés est de réussir à parcourir de longues distances pour atteindre leur cible et d'établir des connexions selon un patron hautement spécifique afin de rétablir la fonction perdue, dans un environnement globalement non permissif à la repousse axonale, notamment du fait de la présence d'un certain nombre de molécules inhibitrices comme Nogo, des CSPGs (Chondroïtin Sulfate ProteoGlycans) et des glycoprotéines associées à la myéline (*pour revue*, Liu *et coll.*, 2006). Récemment, dans notre équipe, Gaillard *et coll.* (2009) ont montré la restauration de la voie nigrostriée dans un modèle murin de la maladie de Parkinson lésée à la 6-OHDA. Pour cela, les animaux, dont plus de 60% des neurones de la SNc ont été lésés, ont reçu une greffe intranigrale de cellules embryonnaires issues du MV de souris à

E12,5 et exprimant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) placée sous contrôle du promoteur du gène de la β -actine (Okabe *et coll.*, 1997). De cette manière, le développement des fibres issues des neurones greffés a pu être visualisée : trois jours après la greffe, les neurones greffés développent des axones, qui se dirigent vers les pédoncules cérébraux deux jours plus tard. Huit jours après la greffe, les fibres exprimant la GFP sont visibles dans le MFB, le long des pédoncules cérébraux et de la capsule interne et suivent une trajectoire similaire à celle de la voie nigrostriée intacte. Au niveau de l'hypothalamus, des fibres exprimant la GFP poussent dans la partie ventrale du pédoncule cérébral et s'étendent le long de son extension médio-latérale. Plus en avant, des fibres pénètrent dans le globus pallidus, s'étendant vers le striatum pour s'y connecter. Quinze jours après la greffe, les auteurs ont observé des regroupements de fibres exprimant la GFP dans le striatum. Quelques-unes sont également visibles dans le cortex frontal et d'autres, en moindre nombre, dans le noyau accumbens (striatum ventral) et la zone sous-ventriculaire. Enfin, deux à trois mois après la greffe, le nombre de fibres exprimant la GFP a augmenté dans le MFB, le striatum, le noyau accumbens, la zone sous-ventriculaire et le cortex moteur. Ces fibres expriment les marqueurs neuronaux dopaminergiques, TH, DAT et le transporteur vésiculaire des monoamines, VMAT. Dans le MV, les neurones dopaminergiques exprimant la GFP coexpriment majoritairement *Girk2*, marqueur préférentiel des neurones dopaminergiques issus de la SNc, et dans une moindre mesure, la calbindine, préférentiellement coexprimée par les neurones dopaminergiques issus de l'ATV. En outre, quelques fibres ectopiques sont également présentes dans le thalamus et l'amygdale. Enfin, les animaux lésés ayant reçu la greffe ont montré une récupération fonctionnelle de 94%, par rapport à la souris lésée (Gaillard *et coll.*, 2009). Ainsi, ces travaux montrent qu'une réparation anatomique et fonctionnelle de la voie nigrostriée est réalisable dans le cerveau adulte. Il est en effet possible que les neurones greffés dans la SNc lésée n'expriment pas encore les récepteurs aux molécules inhibitrices de

la repousse axonale, comme les récepteurs de Nogo ou des CSPGs, et étendent ainsi leurs axones dans un environnement permissif à la repousse (*pour revue*, Liu *et coll.*, 2006 ; Xie *et coll.*, 2008). La présence de molécules de guidage auxquelles les cellules greffées sont capables de répondre constitue également une condition essentielle à la réparation de la voie. Mais les mécanismes sous-jacents à cette réparation restent peu connus.

Dans notre étude, la mise en évidence de l'implication d'éphrine-A5 dans le guidage axonal des neurones dopaminergiques issus du MV au cours du développement permet d'envisager de nouvelles pistes de recherche visant à identifier les mécanismes moléculaires intervenant dans la réparation de la voie nigrostriée, dans ce modèle murin adulte de la maladie de Parkinson. Si ces molécules sont impliquées pendant le développement de la voie mésostriatale et/ou exprimées dans le cerveau adulte intact, il est ainsi possible que leur expression soit modulée suite à la lésion de la SNc, comme il a été montré dans d'autres systèmes.

En effet, il est connu que *dans le cerveau adulte intact*, les éphrines/Eph sont faiblement exprimés sauf dans les régions de haute plasticité, comme l'hippocampe, la zone sous-ventriculaire et le système olfactif (Yamaguchi et Pasquale, 2004). En outre, dans les différentes régions environnantes ou traversées par les voies mésostriatale et mésocorticale, on observe l'expression de récepteurs Eph. EphA4 est ainsi exprimé dans la SN (Martone *et coll.*, 1997 ; Xiao *et coll.*, 2006) et dans le cortex (Martone *et coll.*, 1997 ; Xiao *et coll.*, 2006), notamment au niveau des neurones pyramidaux (Moreno-Flores et Wandosell, 1999 ; Murai et Pasquale, 2004 ; Benson *et coll.*, 2005), tandis que EphB1 est présent dans le noyau accumbens (Xiao *et coll.*, 2006). Tous deux sont également exprimés dans le thalamus (Liebl *et coll.*, 2003 ; Xiao *et coll.*, 2006) et dans les compartiments matriciels du striatum (Martone *et coll.*, 1997). EphA5 est exprimé dans l'ATV, la SN, le thalamus, le striatum et le cortex (Olivieiri et Miescher, 1999 ; Cooper *et coll.*, 2009). Le cortex exprime également les

récepteurs EphB2 (Moreno-Flores et Wandosell, 1999) et le ligand éphrine-B2 (Xiao *et coll.*, 2006). Bien que leurs fonctions soient encore peu connues, il semblerait que ces molécules de guidage axonal, chez l'adulte, soient impliquées dans le maintien des connexions neuronales et la plasticité synaptique (*pour revue*, Goldshmit *et coll.*, 2006). À titre d'exemple dans l'hippocampe, le ligand éphrine-A3 exprimé par les prolongements astrocytaires bordant les synapses interagit avec les récepteurs exprimés par les épines dendritiques post-synaptiques. Cette interaction neurone/glie répulsive régulerait la fonction synaptique et la plasticité hippocampique. Ainsi, la souris EphA4 *-/-* présente une morphologie désorganisée de ces épines dendritiques, dont EphA4 (Murai *et coll.*, 2003). En outre, des comparaisons entre souris sauvages et souris présentant des déficits de l'expression d'éphrines ou d'Eph, ont montré que les signalisations éphrines/Eph pré- et post-synaptiques participent à la formation des synapses requises dans l'apprentissage et la mémoire (Murai *et coll.*, 2003 ; Rodenas-Ruano *et coll.*, 2006). Enfin, le récepteur EphB2 serait impliqué dans la génération de la potentialisation à long terme par les récepteurs NMDA via la signalisation directe (Takasu *et coll.*, 2002), tandis que l'éphrine-B3 y serait également impliquée, via la signalisation inverse (Armstrong *et coll.*, 2006).

Dans *le système nerveux adulte lésé*, plusieurs études ont montré la modulation de l'expression des éphrines, suite à la lésion notamment de la moelle épinière (Bundesen *et coll.*, 2003 ; Miranda *et coll.*, 1999 ; Willson *et coll.*, 2002, 2003 ; Irizarry-Ramirez *et coll.*, 2005), du nerf optique (Rodger *et coll.*, 2001, 2005 ; Knöll *et coll.* 2001a), de l'hippocampe (Moreno-Flores et Wandosell, 1999 ; Wang *et coll.*, 2003, 2005) et du cortex (Biervert *et coll.*, 2001). A titre d'exemple, une lésion de la moelle épinière entraîne la surexpression des récepteurs EphA3, A4, A5, A6, A7 et A8 et EphB2 et B3 ainsi que celle du ligand éphrine-B2 dans l'environnement de la lésion, tandis qu'une lésion du nerf optique entraîne non seulement l'augmentation de l'expression du récepteur EphA3 dans les neurones

ganglionnaires et des éphrines-A2, A3, A4 et A5 et d'éphrine-B2 dans le colliculus supérieur, mais également une diminution de l'expression du récepteur EphA5 dans la rétine.

Aussi, afin d'identifier les acteurs de la réparation de la voie nigrostriée observée dans le modèle murin de lésion de la SNc à la 6-OHDA, il serait intéressant d'étudier et de comparer les variations d'expression et les expressions *de novo* des éphrines/Eph chez l'adulte lésé, notamment celles des récepteurs EphA4, EphA5, EphB2 et EphB1 et de leurs ligands éphrines-A2, A3 et A5 et éphrine-B2 qui, comme décrit dans la littérature, sont exprimés lors de la mise en place de la voie mésostriatale (Deschamps *et coll.*, 2009 ; Deschamps *et coll.*, soumis à BMC Neurosciences ; Yu *et coll.*, 1999 ; Janis *et coll.*, 1999). Cette étude pourrait s'envisager par immunohistochimie, ou par hybridation *in situ* quantitative si les anticorps spécifiques font défaut, à différents stades après la lésion de la SNc à la 6-OHDA, notamment lors de la constitution éventuelle d'une cicatrice gliale inhibitrice de la repousse axonale sur le site de lésion (Bundesen *et coll.*, 2003 ; Liu *et coll.*, 2006).

Il est envisageable que la lésion *per se* ne suffise pas à déclencher les mécanismes de réparation et, de la même manière, les variations d'expression des facteurs impliqués dans le guidage des axones lésés. En revanche, la greffe de neurones embryonnaires issus du MV dans la SNc lésée pourrait induire des changements d'expression dans les structures environnantes et ainsi réactiver des signaux de guidage axonal dans le cerveau adulte, favorisant la croissance et le guidage des nouvelles connexions issues des neurones greffés. De plus, la présence de ces molécules de guidage exprimées par les neurones survivant à la lésion de la SNc (Gaillard *et coll.*, 2009) et par les fibres dopaminergiques intactes issues de l'ATV (Thompson *et coll.*, 2009) pourrait guider les fibres greffées. Ainsi, la recherche d'expression des éphrines et des Eph dans ces cellules et leur environnement donnerait une

information intéressante quant au rôle de ces fibres dans la repousse axonale et permettrait d'identifier les acteurs moléculaires mis en jeu. L'établissement ou non de gradients de concentration de ces molécules étant essentielle pour comprendre leur mode de fonctionnement, il serait également intéressant de rechercher leur mise en place éventuelle, comme il a déjà été effectué dans le système rétinotectal (Rodger *et coll.*, 2001).

En outre, de la même manière que les cellules greffées peuvent influencer sur l'expression des éphrines/Eph dans l'environnement, il est envisageable qu'à l'inverse le nouvel environnement adulte influe sur leur niveau d'expression dans les neurones greffés. Ainsi, l'expression des récepteurs Eph exprimés au cours du développement, serait donc à déterminer dans les neurones embryonnaires exprimant la TH, d'une part avant la greffe par RT-PCR, puis d'autre part après la greffe par immunohistochimie.

Enfin, l'utilisation de souris présentant l'inactivation d'un ou plusieurs gènes codant pour les éphrines-A et B et/ou les récepteurs Eph impliqués dans la mise en place de la voie nigrostriée, permettrait de tester l'effet réparateur de la greffe de cellules embryonnaires après lésion de la SNc, chez ces animaux. Étant donné le rôle d'éphrine-A5 dans le guidage axonal des neurones exprimant la TH pendant le développement, notamment au niveau du thalamus dans le maintien de la direction rostro-ventrale prise par le MFB et dans le striatum et le cortex lors de l'établissement des projections (Deschamps *et coll.*, 2009), il serait intéressant de tester *in vivo*, en premier lieu, l'effet de l'absence du gène codant pour éphrine-A5 sur la réparation anatomique et fonctionnelle de la voie mésostriatale lésée. En effet, s'il s'avère que la protéine éphrine-A5 est réexprimée suite à la lésion de la SNc puis la greffe de cellules dopaminergiques embryonnaires, son absence chez la souris éphrine-A5 *-/-* pourrait, par exemple, altérer la bonne reconnexion des axones sur le striatum. Compte tenu des compensations fonctionnelles entre les différents membres de la famille des éphrines, il serait

également nécessaire de tester l'effet de l'absence de plusieurs gènes codant pour différentes éphrines-A et B sur la réparation anatomique et fonctionnelle de la voie mésostriatale lésée, notamment les éphrines-A2, A5 et éphrine-B2 (Frisen *et coll.*, 1998 ; Feldheim *et coll.*, 2000 ; Pfeiffenberger *et coll.*, 2006).

IV. Conclusion et perspectives d'amélioration du guidage axonal après greffe dans la substance noire lésée

L'ensemble de ces études sur les éphrines/Eph étendues à d'autres molécules de guidage, au cours du développement, chez l'adulte sain ainsi que suite à une lésion et/ou greffe, devrait permettre, d'une part, de mieux comprendre le rôle de l'environnement dans la réparation anatomique et fonctionnelle de la voie nigrostriée dans le modèle animal lésé à la 6-OHDA et, d'autre part, d'envisager de nouvelles stratégies afin d'augmenter le nombre des projections sur le striatum tout en diminuant le nombre de fibres dopaminergiques ectopiques issus du transplant et qui s'orienteraient vers le thalamus (Gaillard *et coll.*, 2009). Par exemple, afin d'attirer plus fortement les axones dopaminergiques nouvellement générés vers leur cible striatale, il serait envisageable d'utiliser des microparticules de polymères biodégradables capables de libérer une protéine diffusible attractive qui n'aurait pas été réexprimée dans le striatum suite à la greffe, comme la nétrine-1 (*pour revue*, Sinha et Trehan, 2003). De même, si éphrine-A5 s'avère jouer un rôle dans la réparation de la voie nigrostriée chez la souris adulte lésée, nous pourrions également induire un gradient d'expression d'éphrine-A5 dans le striatum afin d'améliorer la topographie de l'innervation dopaminergique, après transplantation. Ceci pourrait s'envisager grâce à l'utilisation de vecteurs viraux injectés dans le striatum de manière contrôlée et localisée par stéréotaxie, et qui seraient capables de transduire le gène codant pour éphrine-A5 dans les cellules. (Thompson *et coll.*, 2009).

La greffe de neurones embryonnaires soulevant des questions éthiques et logistiques, la greffe de neurones dopaminergiques dérivés de cellules souches pluripotentes est également envisagée dans le cadre de la thérapie cellulaire de la maladie de Parkinson (Arias-Carrión et Yuan, 2009 ; Preynat-Seauve *et coll.*, 2009). L'expression des molécules de guidage dans ces cellules pourrait être modulée par mutagenèse dirigée avant la greffe afin qu'elles puissent présenter des acteurs moléculaires nécessaires à une bonne repousse axonale puis reconnexion sur leur structure cible. Par exemple l'expression du récepteur d'éphrine-A5, EphA5, et celle du récepteur de la nétrine-1, DCC, connues pour être impliquées dans le guidage des neurones dopaminergiques de la voie mésostriatale au cours du développement (Deschamps *et coll.*, 2009 ; Lin *et coll.*, 2005), pourraient ainsi être induites dans ces cellules.

L'étude de l'implication des molécules de guidage axonal pendant le développement puis chez l'adulte après lésion et lésion puis greffe est donc un champ de recherche majeur dans la découverte, la mise en place et l'amélioration de nouvelles stratégies de réparation des circuits neuronaux lésés, dans le cadre des maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson.

REFERENCES

1999. Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell*, pp. 551-552.
- Aoki, M., Yamashita, T., Tohyama, M., 2004. EphA receptors direct the differentiation of mammalian neural precursor cells through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*, pp. 32643-32650.
- Aoto, J., Chen, L., 2007. Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions. *Brain Res*, pp. 72-80.
- Arias-Carrión, O., Yuan, T.-F., 2009. Autologous neural stem cell transplantation: a new treatment option for Parkinson's disease? , *Med Hypotheses*, pp. 757-759.
- Armstrong, J.N., Saganich, M.J., Xu, N.-J., Henkemeyer, M., Heinemann, S.F., Contractor, A., 2006. B-ephrin reverse signaling is required for NMDA-independent long-term potentiation of mossy fibers in the hippocampus. *J Neurosci*, pp. 3474-3481.
- Arvanitis, D., Davy, A., 2008. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev*, pp. 416-429.
- Aubert, I., Ridet, J.L., Gage, F.H., 1995. Regeneration in the adult mammalian CNS: guided by development. *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 625-635.
- Bagri, A., Marín, O., Plump, A.S., Mak, J., Pleasure, S.J., Rubenstein, J.L.R., Tessier-Lavigne, M., 2002. Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron*, pp. 233-248.
- Bartley, T.D., Hunt, R.W., Welcher, A.A., Boyle, W.J., Parker, V.P., Lindberg, R.A., Lu, H.S., Colombero, A.M., Elliott, R.L., Guthrie, B.A., 1994. B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature*, pp. 558-560.
- Beckmann, M.P., Cerretti, D.P., Baum, P., Vanden Bos, T., James, L., Farrah, T., Kozlosky, C., Hollingsworth, T., Shilling, H., Maraskovsky, E., 1994. Molecular characterization of a family of ligands for eph-related tyrosine kinase receptors. *EMBO J*, pp. 3757-3762.
- Benson, M.D., Romero, M.I., Lush, M.E., Lu, Q.R., Henkemeyer, M., Parada, L.F., 2005. Ephrin-B3 is a myelin-based inhibitor of neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 10694-10699.
- Biervert, C., Horvath, E., Fahrig, T., 2001. Semiquantitative expression analysis of ephrine-receptor tyrosine kinase mRNA's in a rat model of traumatic brain injury. *Neurosci Lett*, pp. 25-28.
- Björklund, A., Dunnett, S.B., 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*, pp. 194-202.
- Blanco, L., Pavón, N., Alvañez, P., Díaz, C., Castellano, O., Castillo, L., de la Cuétara, K., Macías, R., 1998. [Transplantation of fetal dopaminergic cells simultaneously to the corpus striatum and pars reticularis of the substantia nigra in hemi-parkinsonian rats]. *Revista de neurologia*, pp. 361-365.
- Blits-Huizinga, C.T., Nellersa, C.M., Malhotra, A., Liebl, D.J., 2004. Ephrins and their receptors: binding versus biology. *IUBMB Life*, pp. 257-265.
- Bolz, J., Uziel, D., Mühlfriedel, S., Güllmar, A., Peuckert, C., Zarbalis, K., Wurst, W., Torii, M., Levitt, P., 2004. Multiple roles of ephrins during the formation of thalamocortical projections: maps and more. *J Neurobiol*, pp. 82-94.
- Boyd, A.W., Lackmann, M., 2001. Signals from Eph and ephrin proteins: a developmental tool kit. *Sci STKE*, p. re20.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., Kidd, T., 1999. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*, pp. 795-806.
- Brose, K., Tessier-Lavigne, M., 2000. Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell

migration. *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 95-102.

Bundesen, L.Q., Scheel, T.A., Bregman, B.S., Kromer, L.F., 2003. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J Neurosci*, pp. 7789-7800.

Cang, J., Kaneko, M., Yamada, J., Woods, G., Stryker, M.P., Feldheim, D.A., 2005. Ephrin-as guide the formation of functional maps in the visual cortex. *Neuron*, pp. 577-589.

Caras, I.W., 1997. A link between axon guidance and axon fasciculation suggested by studies of the tyrosine kinase receptor EphA5/REK7 and its ligand ephrin-A5/AL-1. *Cell Tissue Res*, pp. 261-264.

Carvalho, R.F., Beutler, M., Marler, K.J.M., Knöll, B., Becker-Barroso, E., Heintzmann, R., Ng, T., Drescher, U., 2006. Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nat Neurosci*, pp. 322-330.

Castellani, V., Yue, Y., Gao, P.P., Zhou, R., Bolz, J., 1998. Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits. *J Neurosci*, pp. 4663-4672.

Castellani, V., Chédotal, 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*, pp. 237-249.

Castellani, V., De Angelis, E., Kenwrick, S., Rougon, G., 2002. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J*, pp. 6348-6357.

Chédotal, A., 2007. Slits and their receptors. *Adv Exp Med Biol*, pp. 65-80.

Chen, Z.-Y., Sun, C., Reuhl, K., Bergemann, A., Henkemeyer, M., Zhou, R., 2004. Abnormal hippocampal axon bundling in EphB receptor mutant mice. *J Neurosci*, pp. 2366-2374.

Cheng, H.J., Flanagan, J.G., 1994. Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell*, pp. 157-168.

Cheng, H.J., Nakamoto, M., Bergemann, A.D., Flanagan, J.G., 1995. Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell*, pp. 371-381.

Cheng, H.J., Bagri, A., Yaron, A., Stein, E., Pleasure, S.J., Tessier-Lavigne, M., 2001. Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron*, pp. 249-263.

Chiang, Y., Morales, M., Zhou, F.C., Borlongan, C., Hoffer, B.J., Wang, Y., 2001. Fetal intra-nigral ventral mesencephalon and kidney tissue bridge transplantation restores the nigrostriatal dopamine pathway in hemiparkinsonian rats. *Brain Res*, pp. 200-207.

Ciossek, T., Monschau, B., Kremoser, C., Löschinger, J., Lang, S., Müller, B.K., Bonhoeffer, F., Drescher, U., 1998. Eph receptor-ligand interactions are necessary for guidance of retinal ganglion cell axons in vitro. *Eur J Neurosci*, pp. 1574-1580.

Connor, R.J., Menzel, P., Pasquale, E.B., 1998. Expression and tyrosine phosphorylation of Eph receptors suggest multiple mechanisms in patterning of the visual system. *Developmental Biology*, pp. 21-35.

Conover, J.C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., Alvarez-Buylla, A., 2000. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci*, pp. 1091-1097.

Cooke, J., Moens, C., Roth, L., Durbin, L., Shiomi, K., Brennan, C., Kimmel, C., Wilson, S., Holder, N., 2001. Eph signalling functions downstream of Val to regulate cell sorting and boundary formation in the caudal hindbrain. *Development*, pp. 571-580.

Cooper, M., Kobayashi, K., Zhou, R., 2008. Ephrin-A5 regulates the formation of the ascending midbrain

dopaminergic pathways. *Dev Neurobiol*.

Cooper, M.A., Crockett, D.P., Nowakowski, R.S., Gale, N.W., Zhou, R., 2009. Distribution of EphA5 receptor protein in the developing and adult mouse nervous system. *J Comp Neurol*, pp. 310-328.

Cowan, C.A., Henkemeyer, M., 2001. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature*, pp. 174-179.

Cowan, C.W., Shao, Y.R., Sahin, M., Shamah, S.M., Lin, M.Z., Greer, P.L., Gao, S., Griffith, E.C., Brugge, J.S., Greenberg, M.E., 2005. Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron*, pp. 205-217.

Cutforth, T., Moring, L., Mendelsohn, M., Nemes, A., Shah, N.M., Kim, M.M., Frisen, J., Axel, R., 2003. Axonal ephrin-As and odorant receptors: coordinate determination of the olfactory sensory map. *Cell*, pp. 311-322.

Dail, M., Kalo, M.S., Seddon, J.A., Côté, J.-F., Vuori, K., Pasquale, E.B., 2004. SHEP1 function in cell migration is impaired by a single amino acid mutation that disrupts association with the scaffolding protein cas but not with Ras GTPases. *J Biol Chem*, pp. 41892-41902.

Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., Yancopoulos, G.D., 1994. Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science*, pp. 816-819.

Davy, A., Gale, N.W., Murray, E.W., Klinghoffer, R.A., Soriano, P., Feuerstein, C., Robbins, S.M., 1999. Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev*, pp. 3125-3135.

Davy, A., Robbins, S.M., 2000. Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *EMBO J*, pp. 5396-5405.

Davy, A., Aubin, J., Soriano, P., 2004. Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev*, pp. 572-583.

Davy, A., Bush, J.O., Soriano, P., 2006. Inhibition of gap junction communication at ectopic Eph/ephrin boundaries underlies craniofrontonasal syndrome. *PLoS Biol*, p. e315.

Davy, A., Soriano, P., 2007. Ephrin-B2 forward signaling regulates somite patterning and neural crest cell development. *Developmental Biology*, pp. 182-193.

Depaepe, V., Suarez-Gonzalez, N., Dufour, A., Passante, L., Gorski, J.A., Jones, K.R., Ledent, C., Vanderhaeghen, P., 2005. Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature*, pp. 1244-1250.

Deschamps, C., Faideau, M., Jaber, M., Gaillard, A., Prestoz, L., 2009. Expression of ephrinA5 during development and potential involvement in the guidance of the mesostriatal pathway. *Exp Neurol*.

Dickson, B.J., 2002. Molecular Mechanisms of Axon Guidance. *Science*, pp. 1959-1964.

Dodelet, V.C., Pazzagli, C., Zisch, A.H., Hauser, C.A., Pasquale, E.B., 1999. A novel signaling intermediate, SHEP1, directly couples Eph receptors to R-Ras and Rap1A. *J Biol Chem*, pp. 31941-31946.

Donoghue, M.J., Lewis, R.M., Merlie, J.P., Sanes, J.R., 1996. The Eph kinase ligand AL-1 is expressed by rostral muscles and inhibits outgrowth from caudal neurons. *Mol Cell Neurosci*, pp. 185-198.

Dottori, M., Hartley, L., Galea, M., Paxinos, G., Polizzotto, M., Kilpatrick, T., Bartlett, P.F., Murphy, M., Köntgen, F., Boyd, A.W., 1998. EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 13248-13253.

Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Löschinger, J., Noda, M., Bonhoeffer, F., 1995. In vitro guidance

- of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell*, pp. 359-370.
- Dufour, A., Seibt, J., Passante, L., Depaepe, V., Ciossek, T., Frisen, J., Kullander, K., Flanagan, J.G., Polléux, F., Vanderhaeghen, P., 2003. Area specificity and topography of thalamocortical projections are controlled by ephrin/Eph genes. *Neuron*, pp. 453-465.
- Eberhart, J., Swartz, M.E., Koblar, S.A., Pasquale, E.B., Tanaka, H., Krull, C.E., 2000. Expression of EphA4, ephrin-A2 and ephrin-A5 during axon outgrowth to the hindlimb indicates potential roles in pathfinding. *Dev Neurosci*, pp. 237-250.
- Eberhart, J., Barr, J., O'Connell, S., Flagg, A., Swartz, M.E., Cramer, K.S., Tosney, K.W., Pasquale, E.B., Krull, C.E., 2004. Ephrin-A5 exerts positive or inhibitory effects on distinct subsets of EphA4-positive motor neurons. *J Neurosci*, pp. 1070-1078.
- Egea, J., Klein, R., 2007. Bidirectional Eph–ephrin signaling during axon guidance. *Trends in Cell Biology*, pp. 230-238.
- Ellsworth, C.A., Lyckman, A.W., Feldheim, D.A., Flanagan, J.G., Sur, M., 2005. Ephrin-A2 and -A5 influence patterning of normal and novel retinal projections to the thalamus: conserved mapping mechanisms in visual and auditory thalamic targets. *J Comp Neurol*, pp. 140-151.
- Elowe, S., Holland, S.J., Kulkarni, S., Pawson, T., 2001. Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction. *Mol Cell Biol*, pp. 7429-7441.
- Fallon, J.H., Moore, R.Y., 1978. Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol*, pp. 545-580.
- Feldheim, D.A., Vanderhaeghen, P., Hansen, M.J., Frisen, J., Lu, Q., Barbacid, M., Flanagan, J.G., 1998. Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron*, pp. 1303-1313.
- Feldheim, D.A., Kim, Y.I., Bergemann, A., Frisen, J., Barbacid, M., Flanagan, J.G., 2000. Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron*, pp. 563-574.
- Figuroa, J.D., Benton, R.L., Velazquez, I., Torrado, A.I., Ortiz, C.M., Hernandez, C.M., Diaz, J.J., Magnuson, D.S., Whittemore, S.R., Miranda, J.D., 2006. Inhibition of EphA7 up-regulation after spinal cord injury reduces apoptosis and promotes locomotor recovery. *J Neurosci Res*, pp. 1438-1451.
- Flanagan, J.G., Vanderhaeghen, P., 1998. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.*, pp. 309-345.
- Flanagan, J.G., 2006. Neural map specification by gradients. *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 59-66.
- Flenniken, A.M., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., Wilkinson, D.G., 1996. Distinct and overlapping expression patterns of ligands for Eph-related receptor tyrosine kinases during mouse embryogenesis. *Developmental Biology*, pp. 382-401.
- Frisen, J., Yates, P.A., Mclaughlin, T., Friedman, G.C., O'Leary, D.D.M., Barbacid, M., 1998. Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, pp. 235-243.
- Fujita, M., Shimada, S., Nishimura, T., Uhl, G.R., Tohyama, M., 1993. Ontogeny of dopamine transporter mRNA expression in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 19, 222-226.
- Gaillard, A., Decressac, M., Frappé, I., Fernagut, P.O., Prestoz, L., Besnard, S., Jaber, M., 2009. Anatomical and functional reconstruction of the nigrostriatal pathway by intranigral transplants. *Neurobiol Dis*, pp. 477-488.
- Gale, N.W., Holland, S.J., Valenzuela, D.M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T.E., Henkemeyer, M., Strebhardt,

- K., Hirai, H., Wilkinson, D.G., Pawson, T., Davis, S., Yancopoulos, G.D., 1996. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron*, pp. 9-19.
- Gao, P.P., Yue, Y., Zhang, J.H., Cerretti, D.P., Levitt, P., Zhou, R., 1998. Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrin-A5: implications in the development of thalamocortical projections. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 5329-5334.
- Gates, M.A., Coupe, V.M., Torres, E.M., Fricker-Gates, R.A., Dunnett, S.B., 2004. Spatially and temporally restricted chemoattractive and chemorepulsive cues direct the formation of the nigro-striatal circuit. *Eur J Neurosci*, pp. 831-844.
- Georgakopoulos, A., Litterst, C., Ghersi, E., Baki, L., Xu, C., Serban, G., Robakis, N.K., 2006. Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling. *EMBO J*, pp. 1242-1252.
- German, D.C., Manaye, K.F., 1993. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol*, pp. 297-309.
- Goldshmit, Y., Galea, M.P., Wise, G., Bartlett, P.F., Turnley, A.M., 2004. Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice. *J Neurosci*, pp. 10064-10073.
- Goldshmit, Y., McLenachan, S., Turnley, A., 2006. Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS. *Brain research reviews*, pp. 327-345.
- Greferath, U., Canty, A.J., Messenger, J., Murphy, M., 2002. Developmental expression of EphA4-tyrosine kinase receptor in the mouse brain and spinal cord. *Gene Expr Patterns*, pp. 267-274.
- Halladay, A.K., Tessarollo, L., Zhou, R., Wagner, G.C., 2004. Neurochemical and behavioral deficits consequent to expression of a dominant negative EphA5 receptor. *Brain Res Mol Brain Res*, pp. 104-111.
- Hamasaki, T., Goto, S., Nishikawa, S., Ushio, Y., 2001. A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons. *J Neurosci*, pp. 4272-4280.
- Hammond, R., Blaess, S., Abeliovich, A., 2009. Sonic hedgehog is a chemoattractant for midbrain dopaminergic axons. *PLoS ONE*, p. e7007.
- Hattori, M., Osterfield, M., Flanagan, J.G., 2000. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science*, pp. 1360-1365.
- Haupt, C., Huber, A.B., 2008. How axons see their way--axonal guidance in the visual system. *Front Biosci*, pp. 3136-3149.
- Henkemeyer, M., Marengere, L.E., McGlade, J., Olivier, J.P., Conlon, R.A., Holmyard, D.P., Letwin, K., Pawson, T., 1994. Immunolocalization of the Nuk receptor tyrosine kinase suggests roles in segmental patterning of the brain and axonogenesis. *Oncogene*, pp. 1001-1014.
- Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J.T., Saxton, T.M., Roder, J., Pawson, T., Klein, R., 1996. Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell*, pp. 35-46.
- Hilario, J.D., Rodino-Klapac, L.R., Wang, C., Beattie, C.E., 2009. Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue for axial motoneurons in vivo. *Developmental Biology*, pp. 190-200.
- Himanen, J.-P., Rajashankar, K.R., Lackmann, M., Cowan, C.A., Henkemeyer, M., Nikolov, D.B., 2001. Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature*, pp. 933-938.
- Himanen, J.-P., Nikolov, D.B., 2003. Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci*, pp. 46-51.
- Himanen, J.-P., Chumley, M.J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W.A., Jeffrey, P.D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D.A., Boyd, A.W., Henkemeyer, M., Nikolov, D.B., 2004. Repelling class discrimination: ephrin-A5

- binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci*, pp. 501-509.
- Himanen, J.-P., Saha, N., Nikolov, D.B., 2007. Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Current Opinion in Cell Biology*, pp. 534-542.
- Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J., Takaku, F., 1987. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science*, pp. 1717-1720.
- Hock, B., Böhme, B., Karn, T., Yamamoto, T., Kaibuchi, K., Holtrich, U., Holland, S., Pawson, T., Rübsamen-Waigmann, H., Strebhardt, K., 1998. PDZ-domain-mediated interaction of the Eph-related receptor tyrosine kinase EphB3 and the ras-binding protein AF6 depends on the kinase activity of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 9779-9784.
- Hohenester, E., Hussain, S., Howitt, J.A., 2006. Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors. *Biochem Soc Trans*, pp. 418-421.
- Holmberg, J., Clarke, D.L., Frisen, J., 2000. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature*, pp. 203-206.
- Holmberg, J., Armulik, A., Senti, K.-A., Edoff, K., Spalding, K., Momma, S., Cassidy, R., Flanagan, J.G., Frisen, J., 2005. Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev*, pp. 462-471.
- Holmberg, J., Genander, M., Halford, M.M., Annerén, C., Sondell, M., Chumley, M.J., Silvany, R.E., Henkemeyer, M., Frisen, J., 2006. EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell*, pp. 1151-1163.
- Holmes, C., Jones, S.A., Greenfield, S.A., 1995. The influence of target and non-target brain regions on the development of mid-brain dopaminergic neurons in organotypic slice culture. *Brain Res Dev Brain Res*, pp. 212-219.
- Hoogenraad, C.C., Milstein, A.D., Ethell, I.M., Henkemeyer, M., Sheng, M., 2005. GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat Neurosci*, pp. 906-915.
- Hornberger, M.R., Dütting, D., Ciossek, T., Yamada, T., Handwerker, C., Lang, S., Weth, F., Huf, J., Wessel, R., Logan, C., Tanaka, H., Drescher, U., 1999. Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron*, pp. 731-742.
- Hu, Z., Yue, X., Shi, G., Yue, Y., Crockett, D.P., Blair-Flynn, J., Reuhl, K., Tessarollo, L., Zhou, R., 2003. Corpus callosum deficiency in transgenic mice expressing a truncated ephrin-A receptor. *J Neurosci*, pp. 10963-10970.
- Hu, Z., Cooper, M., Crockett, D.P., Zhou, R., 2004. Differentiation of the midbrain dopaminergic pathways during mouse development. *J Comp Neurol*, pp. 301-311.
- Huai, J., Drescher, U., 2001. An ephrin-A-dependent signaling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *J Biol Chem*, pp. 6689-6694.
- Huynh-Do, U., Stein, E., Lane, A.A., Liu, H., Cerretti, D.P., Daniel, T.O., 1999. Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through α v β 3 and α 5 β 1 integrins. *EMBO J*, pp. 2165-2173.
- Irie, F., Yamaguchi, Y., 2004. EPHB receptor signaling in dendritic spine development. *Front Biosci*, pp. 1365-1373.
- Irizarry-Ramírez, M., Willson, C.A., Cruz-Orengo, L., Figueroa, J., Velázquez, I., Jones, H., Foster, R.D., Whittemore, S.R., Miranda, J.D., 2005. Upregulation of EphA3 receptor after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, pp. 929-935.
- Janes, P.W., Saha, N., Barton, W.A., Kolev, M.V., Wimmer-Kleikamp, S.H., Nievergall, E., Blobel, C.P.,

- Himanen, J.-P., Lackmann, M., Nikolov, D.B., 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*, pp. 291-304.
- Janis, L.S., Cassidy, R.M., Kromer, L.F., 1999. Ephrin-A binding and EphA receptor expression delineate the matrix compartment of the striatum. *J Neurosci*, pp. 4962-4971.
- Jensen, P., Bauer, M., Jensen, C.H., Widmer, H.R., Gramsbergen, J.B., Blaabjerg, M., Zimmer, J., Meyer, M., 2007. Expansion and characterization of ventral mesencephalic precursor cells: effect of mitogens and investigation of FA1 as a potential dopaminergic marker. *J Neurosci Res*, pp. 1884-1893.
- Kawano, H., Horie, M., Honma, S., Kawamura, K., Takeuchi, K., Kimura, S., 2003. Aberrant trajectory of ascending dopaminergic pathway in mice lacking Nkx2.1. *Experimental Neurology*, pp. 103-112.
- Kidd, T., Bland, K.S., Goodman, C.S., 1999. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell*, pp. 785-794.
- Knöll, B., Isenmann, S., Kilic, E., Walkenhorst, J., Engel, S., Wehinger, J., Bähr, M., Drescher, U., 2001a. Graded expression patterns of ephrin-As in the superior colliculus after lesion of the adult mouse optic nerve. *Mech Dev*, pp. 119-127.
- Knöll, B., Zarbališ, K., Wurst, W., Drescher, U., 2001b. A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development*, pp. 895-906.
- Kolk, S.M., Gunput, R.-A.F., Tran, T.S., Van Den Heuvel, D.M.A., Prasad, A.A., Hellemons, A.J.C.G.M., Adolfs, Y., Ginty, D.D., Kolodkin, A.L., Burbach, J.P.H., Smidt, M.P., Pasterkamp, R.J., 2009. Semaphorin 3F Is a Bifunctional Guidance Cue for Dopaminergic Axons and Controls Their Fasciculation, Channeling, Rostral Growth, and Intracortical Targeting. *J Neurosci*, pp. 12542-12557.
- Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., O'Connor, T.P., Patel, N.H., Admon, A., Bentley, D., Goodman, C.S., 1992. Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron*, pp. 831-845.
- Kudo, C., Ajioka, I., Hirata, Y., Nakajima, K., 2005. Expression profiles of EphA3 at both the RNA and protein level in the developing mammalian forebrain. *J Comp Neurol*, pp. 255-269.
- Kullander, K., Croll, S.D., Zimmer, M., Pan, L., McClain, J., Hughes, V., Zabski, S., DeChiara, T.M., Klein, R., Yancopoulos, G.D., Gale, N.W., 2001a. Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control. *Genes Dev*, pp. 877-888.
- Kullander, K., Mather, N.K., Diella, F., Dottori, M., Boyd, A.W., Klein, R., 2001b. Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo. *Neuron*, pp. 73-84.
- Kullander, K., Klein, R., 2002. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, pp. 475-486.
- Lemke, G., 1997. A coherent nomenclature for Eph receptors and their ligands. *Mol Cell Neurosci*, pp. 331-332.
- Lemke, G., Reber, M., 2005. Retinotectal mapping: new insights from molecular genetics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, pp. 551-580.
- Liebl, D.J., Morris, C.J., Henkemeyer, M., Parada, L.F., 2003. mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *J Neurosci Res*, pp. 7-22.
- Lilienbaum, A., Reszka, A.A., Horwitz, A.F., Holt, C.E., 1995. Chimeric integrins expressed in retinal ganglion cells impair process outgrowth in vivo. *Mol Cell Neurosci*, pp. 139-152.
- Lin, L., Rao, Y., Isacson, O., 2005. Netrin-1 and slit-2 regulate and direct neurite growth of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci*, pp. 547-555.
- Lin, L., Isacson, O., 2006. Axonal Growth Regulation of Fetal and Embryonic Stem Cell-Derived Dopaminergic

- Neurons by Netrin-1 and Slits. *Stem Cells*, pp. 2504-2513.
- Lindvall, O., Björklund, A., 1974. The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol Scand Suppl*, pp. 1-48.
- Liu, B.P., Cafferty, W.B.J., Budel, S.O., Strittmatter, S.M., 2006. Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, pp. 1593-1610.
- Livesey, F.J., Hunt, S.P., 1997. Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development. *Mol Cell Neurosci*, pp. 417-429.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, pp. 265-275.
- Lu, Q., Sun, E.E., Klein, R., Flanagan, J.G., 2001. Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell*, pp. 69-79.
- Mackaretschian, K., Lau, C.K., Caras, I., McConnell, S.K., 1999. Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by ephrin-A5 expression. *Cereb Cortex*, pp. 601-610.
- Mann, F., Peuckert, C., Dehner, F., Zhou, R., Bolz, J., 2002. Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development*, pp. 3945-3955.
- Marillat, V., Cases, O., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., Chédotal, A., 2002. Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol*, pp. 130-155.
- Marín, O., Baker, J., Puelles, L., Rubenstein, J.L.R., 2002. Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development*, pp. 761-773.
- Maroof, A., Anderson, S., 2006. Off on a Tangent: Thalamocortical Axons Traverse a Permissive Corridor across the Basal Telencephalon. *Neuron*, pp. 185-188.
- Marston, D.J., Dickinson, S., Nobes, C.D., 2003. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol*, pp. 879-888.
- Martone, M.E., Holash, J.A., Bayardo, A., Pasquale, E.B., Ellisman, M.H., 1997. Immunolocalization of the receptor tyrosine kinase EphA4 in the adult rat central nervous system. *Brain Res*, pp. 238-250.
- Mclaughlin, T., O'Leary, D.D.M., 2005. MOLECULAR GRADIENTS AND DEVELOPMENT OF RETINOTOPIC MAPS. *Annu. Rev. Neurosci.*, pp. 327-355.
- McLennan, R., Krull, C.E., 2002. Ephrin-as cooperate with EphA4 to promote trunk neural crest migration. *Gene Expr*, pp. 295-305.
- Mehlen, P., Mazelin, L., 2003. The dependence receptors DCC and UNC5H as a link between neuronal guidance and survival. *Biol Cell*, pp. 425-436.
- Mendes, S.W., Henkemeyer, M., Liebl, D.J., 2006. Multiple Eph receptors and B-class ephrins regulate midline crossing of corpus callosum fibers in the developing mouse forebrain. *J Neurosci*, pp. 882-892.
- Mendez, I., Sadi, D., Hong, M., 1996. Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants. *J Neurosci*, pp. 7216-7227.
- Mendez, I., Hong, M., 1997. Reconstruction of the striato-nigro-striatal circuitry by simultaneous double dopaminergic grafts: a tracer study using fluorogold and horseradish peroxidase. *Brain Res*, pp. 194-205.
- Mendez, I., Baker, K.A., Hong, M., 2000. Simultaneous intrastriatal and intranigral grafting (double grafts) in the rat model of Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, pp. 328-339.
- Meyer, G., Varoqueaux, F., Neeb, A., Oschlies, M., Brose, N., 2004. The complexity of PDZ domain-mediated

- interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin. *Neuropharmacology*, pp. 724-733.
- Miller, K., Kolk, S.M., Donoghue, M.J., 2006. EphA7-ephrin-A5 signaling in mouse somatosensory cortex: developmental restriction of molecular domains and postnatal maintenance of functional compartments. *J Comp Neurol*, pp. 627-642.
- Miranda, J.D., White, L.A., Marcillo, A.E., Willson, C.A., Jagid, J., Whittemore, S.R., 1999. Induction of Eph B3 after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, pp. 218-222.
- Monschau, B., Kremoser, C., Ohta, K., Tanaka, H., Kaneko, T., Yamada, T., Handwerker, C., Hornberger, M.R., Löschinger, J., Pasquale, E.B., Siever, D.A., Verderame, M.F., Müller, B.K., Bonhoeffer, F., Drescher, U., 1997. Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO J*, pp. 1258-1267.
- Moore, S.W., Tessier-Lavigne, M., Kennedy, T.E., 2007. Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol*, pp. 17-31.
- Moreno-Flores, M.T., Wandosell, F., 1999. Up-regulation of Eph tyrosine kinase receptors after excitotoxic injury in adult hippocampus. *Neuroscience*, pp. 193-201.
- Murai, K.K., Nguyen, L.N., Irie, F., Yamaguchi, Y., Pasquale, E.B., 2003. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci*, pp. 153-160.
- Murai, K.K., Pasquale, E.B., 2004. Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, pp. 304-314.
- Nair-Roberts, R.G., Chatelain-Badie, S.D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J.P., Ungless, M.A., 2008. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*, pp. 1024-1031.
- Nakamoto, M., Cheng, H.J., Friedman, G.C., McLaughlin, T., Hansen, M.J., Yoon, C.H., O'Leary, D.D.M., Flanagan, J.G., 1996. Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell*, pp. 755-766.
- Nakamura, S., Ito, Y., Shirasaki, R., Murakami, F., 2000. Local directional cues control growth polarity of dopaminergic axons along the rostrocaudal axis. *J Neurosci*, pp. 4112-4119.
- Nikkhah, G., Bentlage, C., Cunningham, M.G., Björklund, A., 1994. Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J Neurosci*, pp. 3449-3461.
- Nikkhah, G., Cunningham, M.G., Cenci, M.A., McKay, R.D., Björklund, A., 1995. Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. I. Evidence for anatomical reconstruction of the nigrostriatal pathway. *J Neurosci*, pp. 3548-3561.
- Nikolov, D.B., Li, C., Lackmann, M., Jeffrey, P.D., Himanen, J.-P., 2007. Crystal structure of the human ephrin-A5 ectodomain. *Protein Sci*, pp. 996-1000.
- Noberini, R., Pasquale, E.B., 2009. Proliferation and tumor suppression: not mutually exclusive for Eph receptors. *Cancer Cell*, pp. 452-454.
- Nomura, T., 2006. Pax6-dependent boundary defines alignment of migrating olfactory cortex neurons via the repulsive activity of ephrin A5. *Development*, pp. 1335-1345.
- Noren, N.K., Pasquale, E.B., 2004. Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. *Cell Signal*, pp. 655-666.
- North, H.A., Zhao, X., Kolk, S.M., Clifford, M.A., Ziskind, D.M., Donoghue, M.J., 2009. Promotion of proliferation in the developing cerebral cortex by EphA4 forward signaling. *Development*, pp. 2467-2476.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., Nishimune, Y., 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407, 313-319.

- O'Leary, D.D.M., Wilkinson, D.G., 1999. Eph receptors and ephrins in neural development. *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 65-73.
- Olivieri, G., Miescher, G.C., 1999. Immunohistochemical localization of EphA5 in the adult human central nervous system. *J Histochem Cytochem*, pp. 855-861.
- Orsulic, S., Kemler, R., 2000. Expression of Eph receptors and ephrins is differentially regulated by E-cadherin. *J Cell Sci*, pp. 1793-1802.
- Otal, R., Burgaya, F., Frisen, J., Soriano, E., Martínez, A., 2006. Ephrin-A5 modulates the topographic mapping and connectivity of commissural axons in murine hippocampus. *Neuroscience*, pp. 109-121.
- Ozdinler, P.H., Erzurumlu, R.S., 2002. Slit2, a branching-arborization factor for sensory axons in the Mammalian CNS. *J Neurosci*, pp. 4540-4549.
- Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K.S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U., Klein, R., 2002. EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell*, pp. 725-737.
- Palmer, A., Klein, R., 2003. Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev*, pp. 1429-1450.
- Pasquale, E.B., 2005. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, pp. 462-475.
- Passante, L., Gaspard, N., Degraeve, M., Frisen, J., Kullander, K., De Maertelaer, V., Vanderhaeghen, P., 2008. Temporal regulation of ephrin/Eph signalling is required for the spatial patterning of the mammalian striatum. *Development*, pp. 3281-3290.
- Pasterkamp, R.J., Peschon, J.J., Spriggs, M.K., Kolodkin, A.L., 2003. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature*, pp. 398-405.
- Pasterkamp, R.J., Kolk, S.M., Hellemons, A.J.C.G.M., Kolodkin, A.L., 2007. Expression patterns of semaphorin7A and plexinC1 during rat neural development suggest roles in axon guidance and neuronal migration. *BMC Dev Biol*, p. 98.
- Penzes, P., Johnson, R.C., Sattler, R., Zhang, X., Hujanir, R.L., Kambampati, V., Mains, R.E., Eipper, B.A., 2001. The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, pp. 229-242.
- Peschanski, M., Bachoud-Lévi, A.-C., Hantraye, P., 2004. Integrating fetal neural transplants into a therapeutic strategy: the example of Huntington's disease. *Brain*, pp. 1219-1228.
- Peuckert, C., Wacker, E., Rapus, J., Levitt, P., Bolz, J., 2008. Adaptive changes in gene expression patterns in the somatosensory cortex after deletion of ephrinA5. *Mol Cell Neurosci*, pp. 21-31.
- Pfeiffenberger, C., Yamada, J., Feldheim, D.A., 2006. Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. *J Neurosci*, pp. 12873-12884.
- Plachez, C., Richards, L., 2005. Mechanisms of Axon Guidance in the Developing Nervous System. *Current Topics in Developmental Biology*, pp. 267-346.
- Prakash, N., Vanderhaeghen, P., Cohen-Cory, S., Frisen, J., Flanagan, J.G., Frostig, R.D., 2000. Malformation of the functional organization of somatosensory cortex in adult ephrin-A5 knock-out mice revealed by in vivo functional imaging. *J Neurosci*, pp. 5841-5847.
- Preynat-Seauve, O., Burkhard, P.R., Villard, J., Zingg, W., Ginovart, N., Feki, A., Dubois-Dauphin, M., Hurst, S.A., Mauron, A., Jaconi, M., Krause, K.-H., 2009. Pluripotent stem cells as new drugs? The example of Parkinson's disease. *Int J Pharm*, pp. 113-121.

- Rajasekharan, S., Kennedy, T.E., 2009. The netrin protein family. *Genome Biol*, p. 239.
- Richards, A.B., Scheel, T.A., Wang, K., Henkemeyer, M., Kromer, L.F., 2007. EphB1 null mice exhibit neuronal loss in substantia nigra pars reticulata and spontaneous locomotor hyperactivity. *Eur J Neurosci*, pp. 2619-2628.
- Rodenas-Ruano, A., Perez-Pinzon, M.A., Green, E.J., Henkemeyer, M., Liebl, D.J., 2006. Distinct roles for ephrinB3 in the formation and function of hippocampal synapses. *Developmental Biology*, pp. 34-45.
- Rodger, J., Lindsey, K.A., Leaver, S.G., King, C.E., Dunlop, S.A., Beazley, L.D., 2001. Expression of ephrin-A2 in the superior colliculus and EphA5 in the retina following optic nerve section in adult rat. *Eur J Neurosci*, pp. 1929-1936.
- Rodger, J., Symonds, A.C.E., Springbett, J., Shen, W.-Y., Bartlett, C.A., Rakoczy, P.E., Beazley, L.D., Dunlop, S.A., 2005. Eph/ephrin expression in the adult rat visual system following localized retinal lesions: localized and transneuronal up-regulation in the retina and superior colliculus. *Eur J Neurosci*, pp. 1840-1852.
- Rogers, J.H., Ciossek, T., Ullrich, A., West, E., Hoare, M., Muir, E.M., 1999. Distribution of the receptor EphA7 and its ligands in development of the mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*, pp. 225-230.
- Round, J., Stein, E., 2007. Netrin signaling leading to directed growth cone steering. *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 15-21.
- Rünker, A.E., Little, G.E., Suto, F., Fujisawa, H., Mitchell, K.J., 2008. Semaphorin-6A controls guidance of corticospinal tract axons at multiple choice points. *Neural development*, p. 34.
- Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., Tessier-Lavigne, M., 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*, pp. 409-424.
- Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., Tessier-Lavigne, M., 1996. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell*, pp. 1001-1014.
- Shamah, S.M., Lin, M.Z., Goldberg, J.L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R.L., Corfas, G., Debant, A., Greenberg, M.E., 2001. EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell*, pp. 233-244.
- Sieber, B., Kuzmin, A., Canals, J., Danielsson, A., Paratcha, G., Arenas, E., Alberch, J., Ogren, S., Ibanez, C., 2004. Disruption of EphA/ephrin-A signaling in the nigrostriatal system reduces dopaminergic innervation and dissociates behavioral responses to amphetamine and cocaine. *Molecular and Cellular Neuroscience*, pp. 418-428.
- Sinha, V.R., Trehan, A., 2003. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release*, pp. 261-280.
- SPERRY, R.W., 1963. CHEMOAFFINITY IN THE ORDERLY GROWTH OF NERVE FIBER PATTERNS AND CONNECTIONS. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 703-710.
- St John, J.A., Tisay, K.T., Caras, I.W., Key, B., 2000. Expression of EphA5 during development of the olfactory nerve pathway in rat. *J Comp Neurol*, pp. 540-550.
- St John, J.A., Key, B., 2001. EphB2 and two of its ligands have dynamic protein expression patterns in the developing olfactory system. *Brain Res Dev Brain Res*, pp. 43-56.
- St John, J.A., Pasquale, E.B., Key, B., 2002. EphA receptors and ephrin-A ligands exhibit highly regulated spatial and temporal expression patterns in the developing olfactory system. *Brain Res Dev Brain Res*, pp. 1-14.
- Stein, E., Savaskan, N.E., Ninnemann, O., Nitsch, R., Zhou, R., Skutella, T., 1999. A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting. *J Neurosci*, pp. 8885-8893.

- Sun, Z.H., Lai, Y.L., Zeng, W.W., Zhao, D., Ye, Z.W., Zuo, H.C., Xie, Z.P., 2003. Mesencephalic progenitors can improve rotational behavior and reconstruct nigrostriatal pathway in PD rats. *Acta Neurochir Suppl*, pp. 175-180.
- Suto, F., Murakami, Y., Nakamura, F., Goshima, Y., Fujisawa, H., 2003. Identification and characterization of a novel mouse plexin, plexin-A4. *Mech Dev*, pp. 385-396.
- Swanson, L.W., 1982. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull*, pp. 321-353.
- Symonds, A.C.E., King, C.E., Bartlett, C.A., Sauv , Y., Lund, R.D., Beazley, L.D., Dunlop, S.A., Rodger, J., 2007. EphA5 and ephrin-A2 expression during optic nerve regeneration: a 'two-edged sword'. *Eur J Neurosci*, pp. 744-752.
- Takasu, M.A., Dalva, M.B., Zigmond, R.E., Greenberg, M.E., 2002. Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. *Science*, pp. 491-495.
- Takemoto, M., Fukuda, T., Sonoda, R., Murakami, F., Tanaka, H., Yamamoto, N., 2002. Ephrin-B3-EphA4 interactions regulate the growth of specific thalamocortical axon populations in vitro. *Eur J Neurosci*, pp. 1168-1172.
- Tanaka, M., Ohashi, R., Nakamura, R., Shinmura, K., Kamo, T., Sakai, R., Sugimura, H., 2004. Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2. *EMBO J*, pp. 1075-1088.
- Thompson, L., Barraud, P., Andersson, E., Kirik, D., Björklund, A., 2005. Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections. *J Neurosci*, pp. 6467-6477.
- Thompson, L.H., Andersson, E., Jensen, J.B., Barraud, P., Guillemot, F., Parmar, M., Björklund, A., 2006. Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon. *Exp Neurol* 198, 183-198.
- Thompson, L.H., Grealish, S., Kirik, D., Björklund, A., 2009. Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci*, pp. 625-638.
- Torii, M., Levitt, P., 2005. Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism. *Neuron*, pp. 563-575.
- Torre, E.R., Gutekunst, C.-A., Gross, R.E., 2010. Expression by midbrain dopamine neurons of Sema3A and 3F receptors is associated with chemorepulsion in vitro but a mild in vivo phenotype. *Mol Cell Neurosci*.
- Torres, R., Firestein, B.L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E.N., Haganir, R.L., Bredt, D.S., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., 1998. PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron*, pp. 1453-1463.
- Uziel, D., Mühlfriedel, S., Zarbalis, K., Wurst, W., Levitt, P., Bolz, J., 2002. Miswiring of limbic thalamocortical projections in the absence of ephrin-A5. *J Neurosci*, pp. 9352-9357.
- Vandenhevel, D., Pasterkamp, R., 2008. Getting connected in the dopamine system. *Progress in Neurobiology*, pp. 75-93.
- Vanderhaeghen, P., Lu, Q., Prakash, N., Frisen, J., Walsh, C.A., Frostig, R.D., Flanagan, J.G., 2000. A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex. *Nat Neurosci*, pp. 358-365.
- Vernier, P., Moret, F., Callier, S., Snapyan, M., Wersinger, C., Sidhu, A., 2004. The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: insights from embryology and evolution of the mesostriatocortical system. *Ann N Y Acad Sci*, pp. 231-249.
- Vitalis, T., Cases, O., Engelkamp, D., Verney, C., Price, D.J., 2000. Defect of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the brains of mice lacking the transcription factor Pax6. *J Neurosci*, pp. 6501-6516.

- Voorn, P., Kalsbeek, A., Jorritsma-Byham, B., Groenewegen, H.J., 1988. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience*, pp. 857-887.
- Walter, J., Henke-Fahle, S., Bonhoeffer, F., 1987. Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development*, pp. 909-913.
- Wang, Y., Ying, G.-X., Liu, X., Zhou, C.-F., 2003. Semi-quantitative expression analysis of ephrin mRNAs in the deafferented hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, pp. 79-83.
- Wang, Y., Ying, G.-X., Liu, X., Wang, W.-Y., Dong, J.-H., Ni, Z.-M., Zhou, C.-F., 2005. Induction of ephrin-B1 and EphB receptors during denervation-induced plasticity in the adult mouse hippocampus. *Eur J Neurosci*, pp. 2336-2346.
- Washburn, C.P., Cooper, M.A., Zhou, R., 2007. Expression of the tyrosine kinase receptor EphA5 and its ligand ephrin-A5 during mouse spinal cord development. *Neuroscience bulletin*, pp. 249-255.
- Wei, J., Dlouhy, S.R., Bayer, S., Piva, R., Verina, T., Wang, Y., Feng, Y., Dupree, B., Hodes, M.E., Ghetti, B., 1997. In situ hybridization analysis of *Girk2* expression in the developing central nervous system in normal and weaver mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 762-771.
- Wilkinson, D.G., 2000. Topographic mapping: organising by repulsion and competition? , *Curr Biol*, pp. R447-451.
- Wilkinson, D.G., 2001. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci*, pp. 155-164.
- Williams, S.E., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D.J., Gale, N.W., Holt, C.E., Mason, C.A., Henkemeyer, M., 2003. Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron*, pp. 919-935.
- Willson, C.A., Irizarry-Ramírez, M., Gaskins, H.E., Cruz-Orengo, L., Figueroa, J.D., Whittemore, S.R., Miranda, J.D., 2002. Upregulation of EphA receptor expression in the injured adult rat spinal cord. *Cell Transplant*, pp. 229-239.
- Willson, C.A., Miranda, J.D., Foster, R.D., Onifer, S.M., Whittemore, S.R., 2003. Transection of the adult rat spinal cord upregulates EphB3 receptor and ligand expression. *Cell Transplant*, pp. 279-290.
- Winslow, J.W., Moran, P., Valverde, J., Shih, A., Yuan, J.Q., Wong, S.C., Tsai, S.P., Goddard, A., Henzel, W.J., Hefti, F., 1995. Cloning of AL-1, a ligand for an Eph-related tyrosine kinase receptor involved in axon bundle formation. *Neuron*, pp. 973-981.
- Woo, S., Rowan, D.J., Gomez, T.M., 2009. Retinotopic mapping requires focal adhesion kinase-mediated regulation of growth cone adhesion. *J Neurosci*, pp. 13981-13991.
- Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J.Y., Rao, Y., 1999. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature*, pp. 331-336.
- Wu, C., Qiu, R., Wang, J., Zhang, H., Murai, K., Lu, Q., 2009. ZHX2 Interacts with Ephrin-B and regulates neural progenitor maintenance in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*, pp. 7404-7412.
- Xiao, D., Miller, G.M., Jassen, A., Westmoreland, S.V., Pauley, D., Madras, B.K., 2006. Ephrin/Eph receptor expression in brain of adult nonhuman primates: implications for neuroadaptation. *Brain Res*, pp. 67-77.
- Xie, F., Zheng, B., 2008. White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Experimental Neurology*, pp. 302-312.
- Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V., Wilkinson, D.G., 1999. In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature*, pp. 267-271.

- Xu, B., Goldman, J.S., Rymar, V.V., Forget, C., Lo, P.S., Bull, S.-J., Vereker, E., Barker, P.A., Trudeau, L.-E., Sadikot, A.F., Kennedy, T.E., 2010. Critical Roles for the Netrin Receptor DCC in Dopaminergic Neuronal Precursor Migration, Axon Guidance, and Axon Arborization. *Neuroscience*.
- Yabuta, N.H., Butler, A.K., Callaway, E.M., 2000. Laminar specificity of local circuits in barrel cortex of ephrin-A5 knockout mice. *J Neurosci*, p. RC88.
- Yamaguchi, Y., Pasquale, E.B., 2004. Eph receptors in the adult brain. *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 288-296.
- Yin, Y., Yamashita, Y., Noda, H., Okafuji, T., Go, M.J., Tanaka, H., 2004. EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A ligands in cis. *Neurosci Res*, pp. 285-296.
- Yue, Y., Widmer, D.A., Halladay, A.K., Cerretti, D.P., Wagner, G.C., Dreyer, J.-L., Zhou, R., 1999. Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrin-B2. *J Neurosci*, pp. 2090-2101.
- Yukawa, K., Tanaka, T., Bai, T., Ueyama, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Maeda, M., Suzuki, K., Kikutani, H., Kumanogoh, A., 2005. Semaphorin 4A induces growth cone collapse of hippocampal neurons in a Rho/Rho-kinase-dependent manner. *Int J Mol Med*, pp. 115-118.
- Zantek, N.D., Azimi, M., Fedor-Chaikin, M., Wang, B., Brackenbury, R., Kinch, M.S., 1999. E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. *Cell Growth Differ*, pp. 629-638.
- Zhang, J.H., Cerretti, D.P., Yu, T., Flanagan, J.G., Zhou, R., 1996. Detection of ligands in regions anatomically connected to neurons expressing the Eph receptor Bsk: potential roles in neuron-target interaction. *J Neurosci*, pp. 7182-7192.
- Zimmer, M., Palmer, A., Köhler, J., Klein, R., 2003. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol*, pp. 869-878.
- Zimmer, G., Kästner, B., Weth, F., Bolz, J., 2007. Multiple effects of ephrin-A5 on cortical neurons are mediated by SRC family kinases. *J Neurosci*, pp. 5643-5653.
- Zimmer, G., Garcez, P., Rudolph, J., Niehage, R., Weth, F., Lent, R., Bolz, J., 2008. Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. *Eur J Neurosci*, pp. 62-73.

ADDITUM (article publié)

Deschamps C., Morel M., Janet T., Page G., Jaber M., Gaillard A., Prestoz L., 2010.
Ephrin-A5 protein distribution in the developing mouse brain. BMC Neurosci,11 :105.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

EphrinA5 protein distribution in the developing mouse brain

Claire Deschamps¹, Milena Morel², Thierry Janet¹, Guylène Page², Mohamed Jaber¹, Afsaneh Gaillard¹, Laetitia Prestoz^{1*}

Abstract

Background: EphrinA5 is one of the best-studied members of the Eph-ephrin family of guidance molecules, known to be involved in brain developmental processes. Using in situ hybridization, ephrinA5 mRNA expression has been detected in the retinotectal, the thalamocortical, and the olfactory systems; however, no study focused on the distribution of the protein. Considering that this membrane-anchored molecule may act far from the neuron soma expressing the transcript, it is of a crucial interest to localize ephrinA5 protein to better understand its function.

Results: Using immunohistochemistry, we found that ephrinA5 protein is highly expressed in the developing mouse brain from E12.5 to E16.5. The olfactory bulb, the cortex, the striatum, the thalamus, and the colliculi showed high intensity of labelling, suggesting its implication in topographic mapping of olfactory, retinocollicular, thalamocortical, corticothalamic and mesostriatal systems. In the olfactory nerve, we found an early ephrinA5 protein expression at E12.5 suggesting its implication in the guidance of primary olfactory neurons into the olfactory bulb. In the thalamus, we detected a dynamic graduated protein expression, suggesting its role in the corticothalamic patterning, whereas ephrinA5 protein expression in the target region of mesencephalic dopaminergic neurones indicated its involvement in the mesostriatal topographic mapping. Following E16.5, the signal faded gradually and was barely detectable at P0, suggesting a main role for ephrinA5 in primary molecular events in topographic map formation.

Conclusion: Our work shows that ephrinA5 protein is expressed in restrictive regions of the developing mouse brain. This expression pattern points out the potential sites of action of this molecule in the olfactory, retinotectal, thalamocortical, corticothalamic and mesostriatal systems, during development. This study is essential to better understand the role of ephrinA5 during developmental topographic mapping of connections and to further characterise the mechanisms involved in pathway restoration following cell transplantation in the damaged brain.

Background

Ephrins are ligands for transmembrane Eph-receptors, the largest group of receptor tyrosine kinases, that have been shown to be implicated in various developmental mechanisms such as cell adhesion, cell migration, boundary formation, axonal pathfinding, axon guidance, layer-specific arborisations, target area, topographic mapping and apoptosis [1-5]. A total of 9 members have been identified to date and are divided into two sub-families consisting of 6 ephrinA (A1-A6) and 3 ephrinB

(B1-B3) ligand types [5]. EphrinA and B differ in their membrane-anchorage and on their receptor affinity: ephrinA are glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked proteins and bind generally to the EphA-receptors, whereas ephrinB have a transmembrane domain and a cytoplasmic region, and interact preferentially with EphB-receptors. Exceptions in the binding discrimination between classes are that ephrinA5, at high concentration, can bind to EphB2 [6], and ephrinB-ligands to EphA4 [7]. Ephrins and their receptors are highly expressed in the developing nervous system and often in complementary gradients inside delimited regions of the central nervous system [8,9]. This feature is particularly well described in the retinotectal system, where graded

* Correspondence: laetitia.prestoz@univ-poitiers.fr

¹Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, CNRS, 40 avenue du Recteur Pineau, F-86022, France

Full list of author information is available at the end of the article

Eph and ephrin expressions establish the topographically ordered retinocollicular projection: temporal retinal axons, which express high levels of EphA-receptors, terminate in a low ephrin expression region of the tectum (the anterior part), whereas, nasal axons, which exhibit a low Eph-receptor expression, connect to the posterior tectum, which is a high ephrinA expression region [10].

Within the ephrinA group, ephrinA5 has been extensively studied and was shown to be a ligand for EphA3 [11,12], EphA4 [13,14], EphA5 [10], EphA7 [15] and EphB2 [6] receptors. The study of its expression, mainly explored at the mRNA level in the rodent developing brain, has shown that ephrinA5 is present from early organogenesis [16] to postnatal stages throughout the central nervous system. In the telencephalon, ephrinA5 mRNA is expressed in the olfactory system [17,18], in the lateral and medial ganglionic eminences and their ventricular zones [19-21] and in the cortex [22-27]. EphrinA5 transcript expression has been also detected in the diencephalon (hypothalamus and thalamus) [10,21,27-29] and in the inferior and superior colliculi as well as in the pretectal nuclei and the red nucleus of the mesencephalon [28,30,10,21].

In several systems such as the retinotectal [10,30], the retinothalamic [31] and the thalamocortical [23,24,26,29] ones, ephrinA5 and its receptors have been found to be expressed in opposite gradients on the projections and their target respectively, leading to a repulsive ligand-receptor interaction. An exception to these observations was described in the olfactory system, where high ephrinA5 expressing region is connected by axons containing an important concentration of ephrinA5 receptors. This suggests that ephrinA5 interaction with its receptors could also mediate an attractive signal in some systems [17,32].

Although ephrinA5 mRNA expression has been extensively described during development as mentioned above, distribution of the protein in the developing central nervous system is still lacking. Thereby, putative functions of this molecule during development have been mainly deduced from its mRNA expression pattern and from studies using ephrinA5 knock-out mice. However, the use of these genetic tools may present some limitations, given that, partial redundancy that exists between ephrinA-ligands [33,34].

Given the importance of this guidance membrane-anchored protein location in its actions, sometimes far from the neurone soma expressing the mRNA, we used here immunohistochemistry to analyse the spatiotemporal ephrinA5 protein expression in the mouse brain during embryogenesis and in newborns. We compared the distribution of ephrinA5 protein to the transcript location, and to previous functional studies, providing

new insights to the involvement of ephrinA5 in the development of the brain.

Results

To determine the ephrinA5 protein expression, we used an affinity purified polyclonal antibody directed against a part of the C-terminal region of the human ephrinA5 protein, described in our previous work [21]. Specificity of this antibody was checked comparing immunohistochemistry on sagittal sections of E16.5 wild type and ephrinA5 knock-out (eA5KO) mouse brains. No staining was detected in the eA5KO brains as shown in figure 1 for the parietal cortex where ephrinA5 wild type expression is particularly high.

In wild type mice, we identified the presence of ephrinA5 protein in the mouse brain at four stages during embryonic development: E12.5, E14.5, E16.5, E18.5, and in newborns. Both sagittal and coronal sections showed dynamic spatiotemporal ephrinA5 immunoreactivity in the telencephalic, diencephalic, mesencephalic and metencephalic brain structures. Following P0, the ephrinA5 signal was barely detectable.

Details of ephrinA5 expression distribution are presented below for each developmental stage, and summarized in table 1.

EphrinA5 protein expression at E12.5

The earliest stage we examined was embryonic day E12.5 (Figure 2a-l). Within the *telencephalon*, the olfactory nerve (Figure 2h) presented robust ephrinA5 immunoreactivity. Well-stained cell profiles were also observed in the neocortex (Figure 2a) and in the piriform cortex (Figure 2h). Lateral ganglionic eminence (Figure 2i) and lateral (Figure 2b) and medial (Figure 2c) ganglionic eminence differentiating zones exhibited

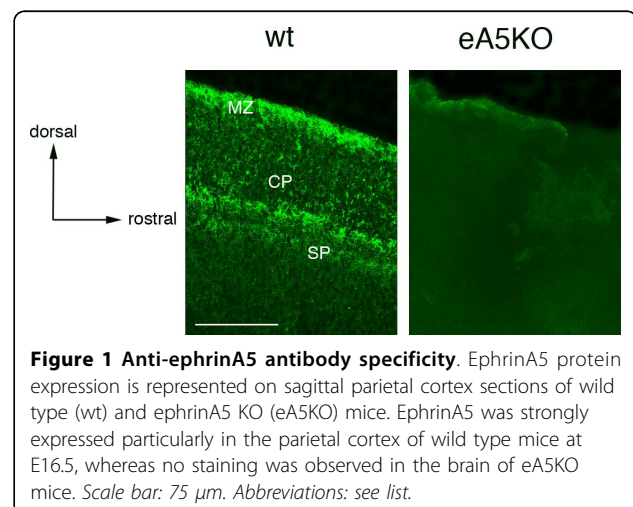


Table 1 EphrinA5 protein distribution in the developing mouse brain

	TELENCEPHALON	DIENCEPHALON	MESENCEPHALON	METENCEPHALON
E12.5	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Olfactory nerve</u> • <u>Neocortex</u> • <u>Piriform cortex</u> • <u>LGE</u> • <u>LGE dz l. v. > m. d.</u> • <u>MGE dz l. v. > m. d.</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Preoptic dz</u> <i>l. v. > m. d.</i> • <u>Preoptic area</u> • <u>Ventral thalamus</u> • <i>v. r. > d. c.</i> • <u>Hypothalamus</u> <i>v. r. > d. c.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Mesencephalic tegmentum</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Isthmus</u> • <u>Cerebellum</u>
E14.5	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Olfactory bulb</u> • <u>Neocortex S1 (CP)</u> • <u>Piriform cortex</u> • <u>LGE l. v. r. > m. d. c.</u> • <u>Subventricular zone</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Preoptic area</u> • <u>Ventral thalamus</u> <i>v. r. > d. c.</i> • <u>Subthalamic area</u> • <u>Hypothalamus</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Mesencephalic tegmentum</u> • <u>Superior colliculus</u> • <u>Inferior colliculus</u> <i>l. > m.</i> • <u>Preteectum</u> <i>l. v. > m. d.</i> • <u>Commissure of superior colliculus</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Isthmus dz</u> • <u>Cerebellar vermis</u>
E16.5	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Olfactory structures: GCL, MCL, olfactory tubercle, lateral olfactory tract</u> • <u>Septum</u> • <u>LGE v. r. > d. c.</u> • <u>Neocortex (MZ, CP, SP)</u> • <u>Frontal cortex</u> • <u>Parietal cortex (S1)</u> • <u>Insular cortex</u> • <u>Retrosplenial cortex</u> • <u>Piriform cortex</u> • <u>Hippocampus</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Preoptic area</u> • <u>Thalamus</u> <i>v. r. > d. c.</i> • <u>Hypothalamus</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Mesencephalic tegmentum</u> • <u>Superior colliculus</u> • <u>Inferior colliculus</u> <i>c. > r.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Isthmus</u> • <u>Cerebellar vermis</u> • <u>Pons</u>
E18.5	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Olfactory structures: GCL, olfactory tubercle, lateral olfactory tract</u> • <u>Striatum</u> • <u>Nucleus accumbens</u> • <u>Septum l. v. > m. d.</u> • <u>Lateral migratory stream</u> • <u>Piriform cortex</u> • <u>Insular cortex</u> • <u>Cingulate cortex</u> • <u>Retrosplenial cortex</u> • <u>Perirhinal cortex</u> • <u>Neocortex</u> • <u>Parietal cortex (S1)</u> • <u>Occipital cortex (layers I & V)</u> • <u>Hippocampus (CA1, CA3, DG)</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Thalamus</u> <i>l. d. > m. v.</i> • <u>Hypothalamus</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Mesencephalic tegmentum</u> • <u>Superior colliculus</u> • <u>Inferior colliculus</u> <i>l. > m.</i> • <u>Commissure of superior colliculus</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Cerebellum</u> • <u>Pons</u>
P0	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Olfactory structures: GCL, subventricular zone, olfactory tubercle, lateral olfactory tract</u> • <u>Subventricular zone</u> • <u>Striatum l. v. > m. d.</u> • <u>Nucleus accumbens</u> • <u>Septum</u> • <u>Parietal cortex</u> • <u>Frontal cortex</u> • <u>Retrosplenial cortex</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Thalamus</u> • <u>Hypothalamus</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Mesencephalic tegmentum</u> • <u>Superior colliculus</u> • <u>Inferior colliculus</u> <i>c. > r.</i> • <u>Commissure of superior colliculus</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Cerebellum</u>

EphrinA5 was expressed in the same brain regions of the telencephalon, diencephalon, mesencephalon and metencephalon from E12.5, throughout the embryonic development until P0. The intensity of staining was high from E12.5 to E16.5 and then decreased until P0 to become non-existent in P7 animals (data not shown). The names of brain regions exhibiting a strong ephrinA5 protein expression were underlined and highlighted in bold, whereas names of brain structures showing a moderate ephrinA5 protein expression were only underlined. Names of brain regions exhibiting weak or non-existent ephrinA5 protein expression were not highlighted. Black arrowheads indicate ephrinA5 protein expression gradients. *Abbreviations: see list.*

strong ephrinA5 immunoreactivity. In these latter structures, we detected a spatial disparity of ephrinA5 expression in a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient (arrowheads in figure 2, panels b and c respectively).

Among the *diencephalic structures*, the preoptic differentiating zone (Figure 2d), the preoptic area (Figure 2h), as well as the hypothalamus and the ventral thalamus, visualized on coronal (Figure 2e, f) and sagittal sections (Figure 2j, l), also exhibited strongly labelled ephrinA5

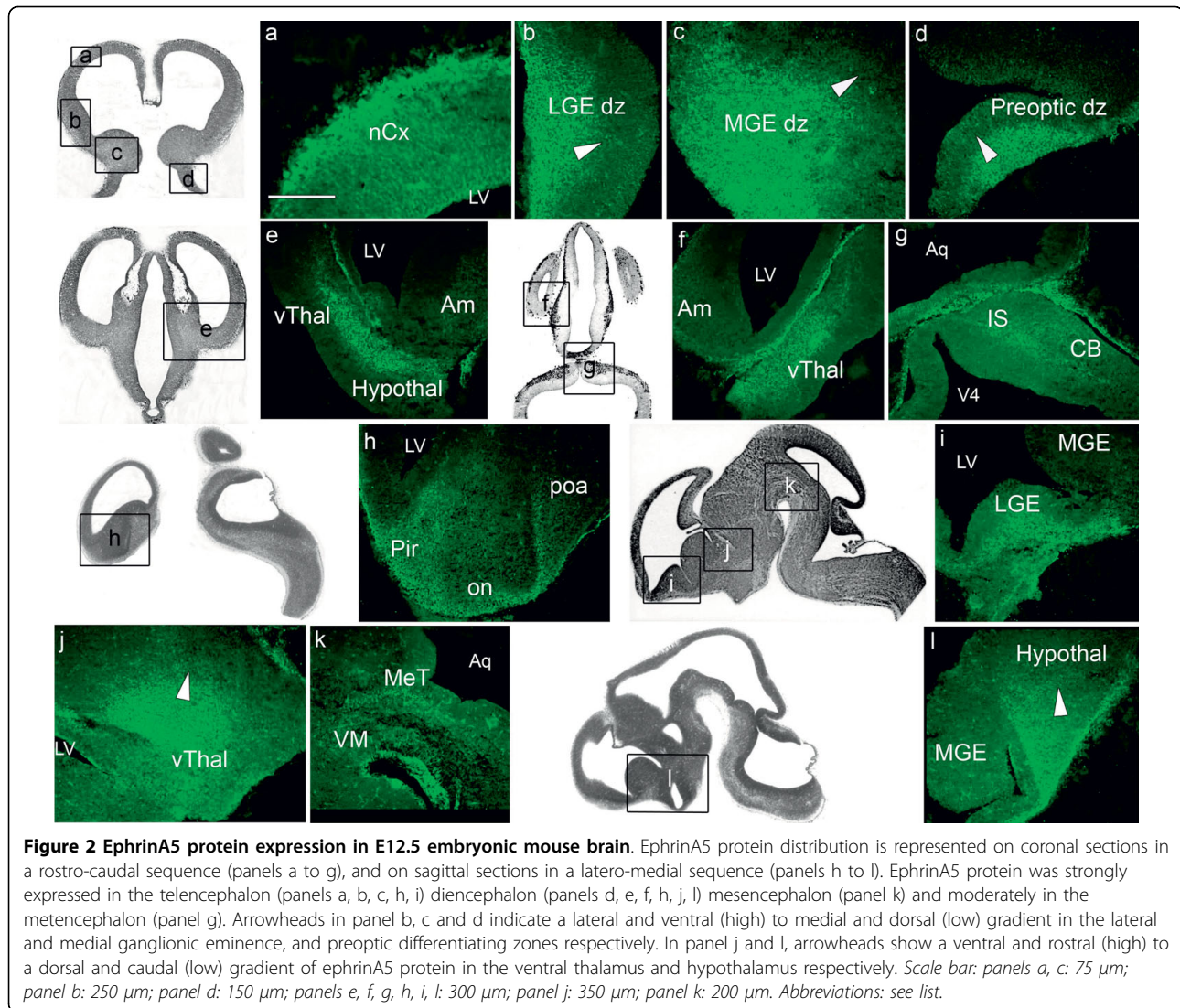


Figure 2 EphrinA5 protein expression in E12.5 embryonic mouse brain. EphrinA5 protein distribution is represented on coronal sections in a rostro-caudal sequence (panels a to g), and on sagittal sections in a latero-medial sequence (panels h to l). EphrinA5 protein was strongly expressed in the telencephalon (panels a, b, c, h, i), diencephalon (panels d, e, f, h, j, l), mesencephalon (panel k) and moderately in the metencephalon (panel g). Arrowheads in panel b, c and d indicate a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient in the lateral and medial ganglionic eminence, and preoptic differentiating zones respectively. In panel j and l, arrowheads show a ventral and rostral (high) to a dorsal and caudal (low) gradient of ephrinA5 protein in the ventral thalamus and hypothalamus respectively. Scale bar: panels a, c: 75 μ m; panel b: 250 μ m; panel d: 150 μ m; panels e, f, g, h, i, l: 300 μ m; panel j: 350 μ m; panel k: 200 μ m. Abbreviations: see list.

immunoreactive cells. We noticed spatial variations of ephrinA5 expression within the preoptic differentiating zone, the thalamus and the hypothalamus: in the preoptic differentiating zone, ephrinA5 was expressed in a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient as shown by arrowhead in figure 2, panel d and in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient in the ventral thalamus and in the hypothalamus (arrowheads in figure 2, panels j and l respectively).

In the *mesencephalon*, only the mesencephalic tegmentum exhibited a strong level of ephrinA5 immunoreactivity (Figure 2k). The ventral mesencephalon was unstained (Figure 2k).

The *metencephalon* was moderately stained: ephrinA5 protein was present in the isthmus and in the cerebellum, as visualized in figure 2, panel g.

Overall, at E12.5, ephrinA5 protein was strongly expressed in the telencephalon, diencephalon,

mesencephalon, whereas its expression was moderate in the metencephalon (Table 1).

EphrinA5 protein expression at E14.5

At E14.5, ephrinA5 expression was strongly expressed in the four major regions of the developing brain (Figure 3a-q). In the *telencephalon*, high level of ephrinA5 immunoreactivity was detected, except in the olfactory bulb (Figure 3a) and in the subventricular zone (Figure 3e) where ephrinA5 protein expression was moderate. Strongly immunoreactive cells were observed in the neocortex, especially in the cortical plate of the primitive somatosensory cortex (Figure 3b) and in the piriform cortex (Figure 3f). EphrinA5 immunoreactivity was also robust in the lateral ganglionic eminence, visualized on coronal (Figure 3c, d, f) and sagittal sections (Figure 3n), in a lateral and ventral (high) to medial and caudal (low) gradient (arrowhead in figure 3,

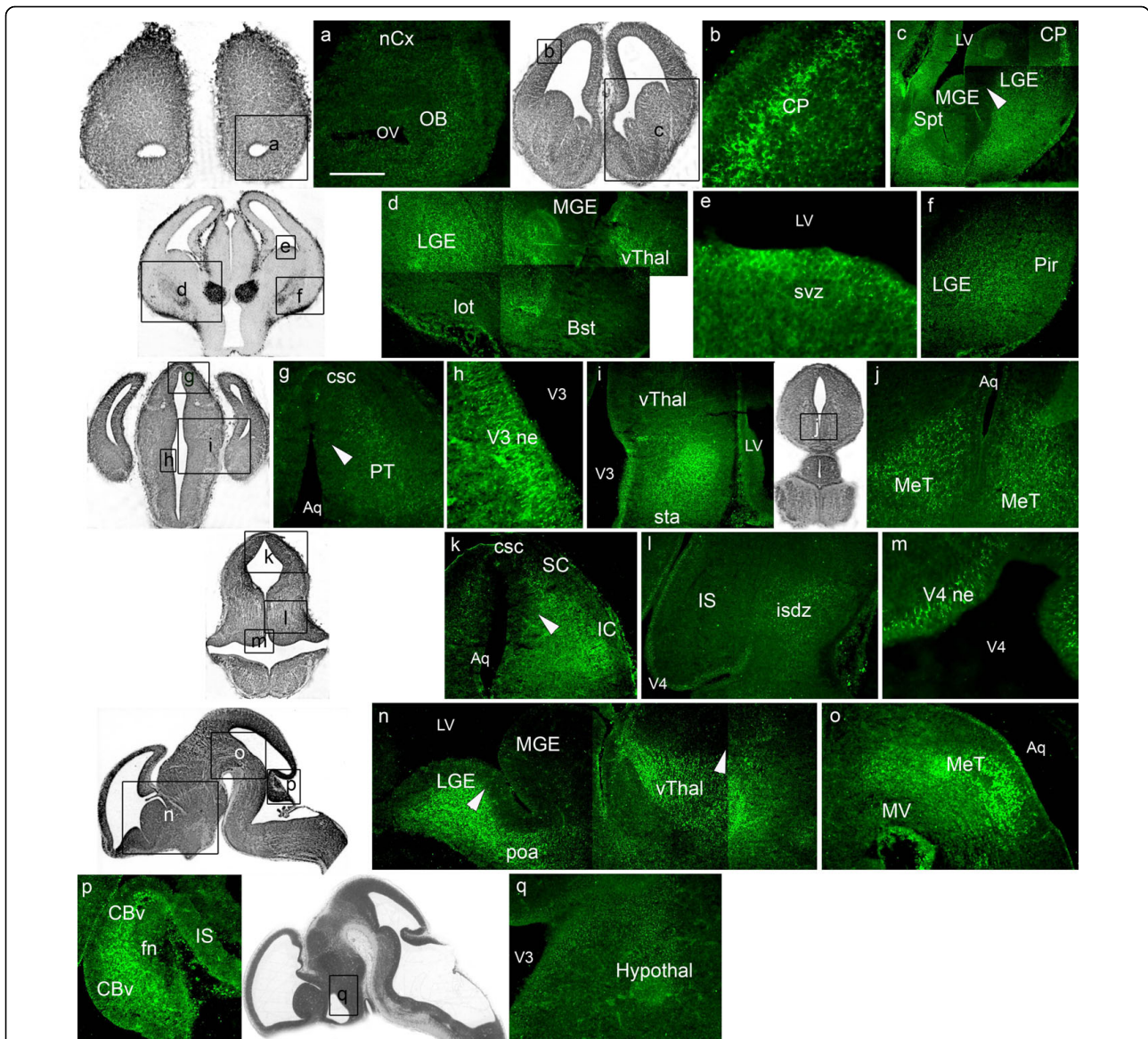


Figure 3 EphrinA5 protein expression in E14.5 embryonic mouse brain. EphrinA5 protein distribution is represented on coronal sections in a rostro-caudal sequence (panels a to m) and on sagittal sections in a latero-medial sequence (panels n to q). EphrinA5 protein was differentially expressed within brain regions. EphrinA5 was strongly expressed in the telencephalon (panels b, c, d, f, n) in the diencephalon (panels d, i, n) in the mesencephalon (panels g, j, k, o) and in the metencephalon (panels l and p) excepted in the olfactory bulb (panel a), the subventricular zone (panel e), the hypothalamus (panel q) and the isthmus differentiating zone (panel l) where expression was moderate. Arrowheads in panels c and g indicate ephrinA5 expression gradients respectively in the lateral ganglionic eminence and in the pretectum, in a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) direction. The inferior colliculus exhibited a lateral (high) to medial (low) gradient (arrowhead in panel k). Arrowheads in panel n show ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradients in the lateral ganglionic eminence and the ventral thalamus. Scale bar: panels a, b, i, j, k, q: 150 μ m; panel c: 300 μ m; panel d: 400 μ m; panels e, h, m: 75 μ m; panels f, g, l, p: 200 μ m; panel n: 350 μ m; panel o: 250 μ m. Abbreviations: see list.

panel c) and in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient (arrowhead in figure 3, panel n).

In the *diencephalon*, ephrinA5 was strongly expressed in the preoptic area (Figure 3n) and in the ventral thalamus, visualized on coronal (Figure 3d) and on sagittal sections in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient (Figure 3n). We also observed

a high ephrinA5 staining in the subthalamic area (Figure 3i) and moderate immunoreactivity in the hypothalamus (Figure 3q).

In the *mesencephalon*, coronal (Figure 3j) and sagittal (Figure 3o) sections in the mesencephalic tegmentum exhibited robust ephrinA5 immunoreactivity. Furthermore, ephrinA5 was strongly expressed in the inferior

and superior colliculi (Figure 3k) and in the pretectum (Figure 3g). We observed a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient in the pretectum (arrowhead in figure 3, panel g) and a lateral (high) to medial (low) gradient in the inferior colliculus (arrowhead in figure 3, panel k). The commissure of superior colliculus (Figure 3g, k) also presented robust ephrinA5 immunoreactivity. In return, the ventral mesencephalon was unstained (Figure 3o).

In the *metencephalon*, cells from the isthmus differentiating zone were weakly stained (Figure 3l), whereas the cerebellar vermis exhibited a strong ephrinA5 expression (Figure 3p).

Finally, we noticed that cells from the neuroepithelia of the third (Figure 3h, i) and fourth (Figure 3m) ventricles and of the aqueduct (Figure 3o) exhibited strong ephrinA5 immunoreactivity.

Overall, ephrinA5 protein was strongly expressed in the same brain regions than earlier in the development. The olfactory bulb, the subventricular zone, the hypothalamus and the isthmus differentiating zone were however moderately stained (Table 1).

EphrinA5 protein expression at E16.5

At E16.5, the intensity of ephrinA5 immunostaining was high in most of the developing brain structures (Figure 4a-u). The *telencephalon* exhibited strong ephrinA5 expression in olfactory structures such as the granule (Figure 4a) and the mitral (Figure 4b) cell layers of the olfactory bulb, the olfactory tubercle (Figure 4e) and the lateral olfactory tract (Figure 4h). We also detected a high level of ephrinA5 immunoreactivity in the septum (Figure 4s) and in the lateral ganglionic eminence, as visualized on coronal (Figure 4d, e) and sagittal sections (Figure 4u). Within the lateral ganglionic eminence, ephrinA5 was expressed in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient (arrowheads in figure 4, panels e and u). Moreover, the frontal (Figure 4b) and parietal (Figure 4d) parts of the neocortex exhibited a strong ephrinA5 protein expression in the marginal zone, the cortical plate and the subplate as observed in the primitive somatosensory cortex (Figure 4c). Insular (Figure 4d), retrosplenial (Figure 4f) and piriform (Figure 4h) cortices also exhibited ephrinA5 immunoreactive cells, although these two latter structures showed less intense immunostaining. EphrinA5 protein expression was moderate in the hippocampus (Figure 4j).

In the *diencephalon*, ephrinA5 staining in the preoptic area (Figure 4l) was moderate compared to previous stages, whereas the thalamus, visualized on coronal (Figure 4g, i, j) and sagittal sections (Figure 4u), still exhibited strong ephrinA5 expression. In this structure, ephrinA5 staining was higher in the ventral and rostral part than in the dorsal and caudal part (arrowheads in

figure 4, panels i and u). An intense staining was also detected in the hypothalamus (Figure 4o).

In the *mesencephalon*, the mesencephalic tegmentum (Figure 4m) and the superior colliculus (Figure 4n) exhibited strongly immunostained cells. EphrinA5 labeling was also detected in the ventricular zone of the inferior colliculus in a caudal (high) to rostral (low) gradient (arrowhead in figure 4, panel t). The ventral mesencephalon was unstained (Figure 4m).

In the *metencephalon*, the isthmus was moderately stained (Figure 4p) whereas high immunoreactivity in the cerebellum (Figure 4r) and in the pons (Figure 4p) was detected.

Neuroepithelia of the third (Figure 4k) and fourth (Figure 4p, q) ventricles and neuroepithelium of the aqueduct (Figure 4m, n) exhibited ephrinA5 immunostaining as well.

Moreover, to specify retinocollicular mapping, we tested the expression of ephrinA5 protein in the retina. Immunohistochemistry localized ephrinA5 protein in the nasal part of the retina and the retinal ganglion cell layer (Figure 5).

Overall, E16.5 embryonic stage showed high levels of ephrinA5 immunoreactivity in the same regions than those previously described earlier in the development, with the exception of the preoptic area that was moderately stained compared to E12.5 and E14.5 stages (Table 1).

EphrinA5 protein expression at E18.5

At E18.5, ephrinA5 protein expression was generally less intense than earlier in the development (Figure 6a-v). In the *telencephalon*, the granule cell layer of the olfactory bulb (Figure 6a), the olfactory tubercle and the lateral olfactory tract (Figure 6b) exhibited a moderate immunoreactive intensity. Moreover, ephrinA5 expression was weak in the striatum as shown on coronal (Figure 6d, h) and sagittal sections (Figure 6v), and almost non-existent in the nucleus accumbens (Figure 6v). A moderate ephrinA5 expression was detected in the septum in a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient (arrowhead in figure 6, panel f) and in the lateral migratory stream (Figure 6d). The piriform (Figure 6b), insular (Figure 6d, h), cingulate (Figure 6c), including the retrosplenial cortex (Figure 6i), and the frontal cortex (Figure 6e) exhibited weak staining intensity. Moderate intensity of ephrinA5 expression was observed in the perirhinal cortex (Figure 6n), in layers I and V in the occipital cortex (Figure 6m) and in the primary somatosensory region of the parietal cortex (Figure 6g). In the hippocampus, weak immunostaining was localized in the CA1 and CA3 regions, and in the dentate gyrus (Figure 6l).

In *diencephalic* structures, ephrinA5 expression was moderate in the thalamus, with the strongest

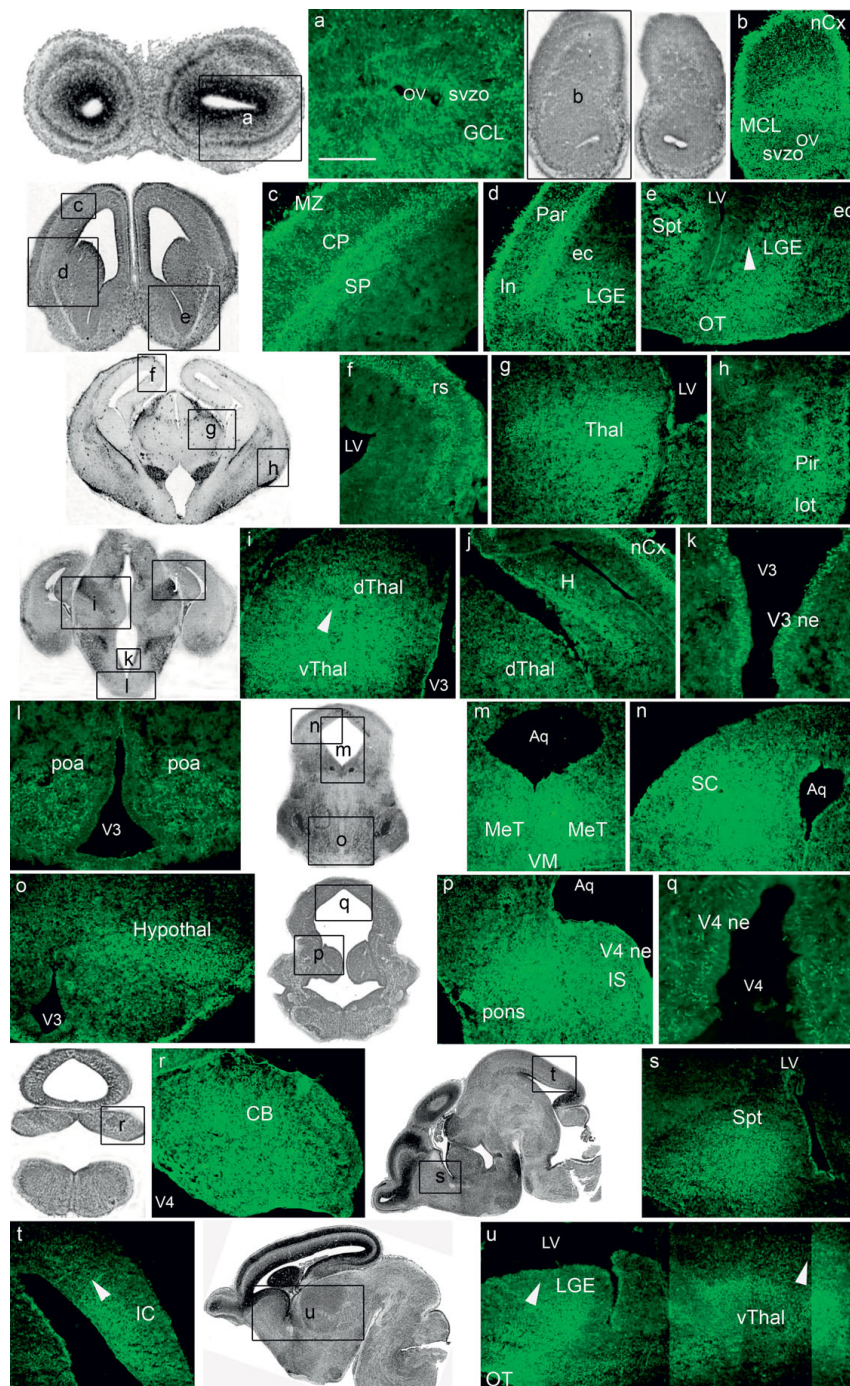


Figure 4 EphrinA5 protein expression in E16.5 embryonic mouse brain. EphrinA5 protein distribution is represented on coronal sections in a rostro-caudal sequence (panels a to r) and on sagittal sections in a medio-lateral sequence (panels s to u). At 16.5, ephrinA5 protein was strongly expressed in the telencephalon (panels a, b, c, d, e, j, s, u) diencephalon (panels g, i, j, l, o, u) mesencephalon (panels m, n, t) and metencephalon (panels r, p) excepted in the retrosplenial (panel f) and piriform (panel h) cortices, in the hippocampus (panel j) in the preoptic area (panel l) and in the isthmus (panel p) where the expression was moderate. In the lateral ganglionic eminence, ephrinA5 protein was expressed in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient (arrowheads in panels e and u). In panel i and u, arrowheads represent a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient in the thalamus and in panel t, a caudal (high) to rostral (low) gradient in the inferior colliculus. Scale bar: panels a, k, q: 75 μ m; panels b, d, n: 350 μ m; panels c, e, o, r: 200 μ m; panels f, l, t: 150 μ m; panels g, h, i, j, p: 300 μ m; panels m, u: 400 μ m. Abbreviations: see list.

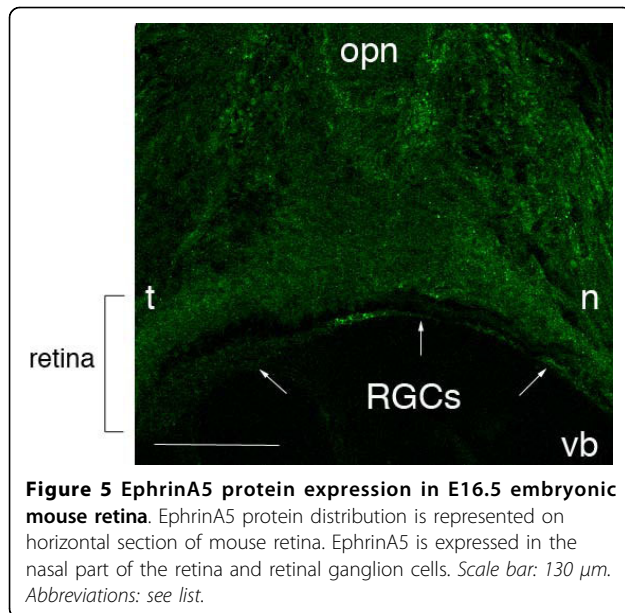


Figure 5 EphrinA5 protein expression in E16.5 embryonic mouse retina. EphrinA5 protein distribution is represented on horizontal section of mouse retina. EphrinA5 is expressed in the nasal part of the retina and retinal ganglion cells. Scale bar: 130 μ m. Abbreviations: see list.

immunoreactivity in the dorsal part, contrary to the previous stages, thus leading to a lateral and dorsal (high) to medial and ventral (low) gradient (arrowhead in figure 6, panel j). Weakly stained cells were detected in the hypothalamus (Figure 6p).

In the *mesencephalon*, the commissure of the superior colliculus (Figure 6o), the mesencephalic tegmentum (Figure 6q) and the superior and inferior colliculi (Figure 6r) exhibited ephrinA5 immunoreactive cells. EphrinA5 expression was however stronger in the inferior part of the colliculus than in the superior region, exhibiting a lateral (high) to medial (low) gradient (arrowhead in figure 6, panel r). The ventral mesencephalon was unstained (Figure 6q).

In the *metencephalon*, the cerebellum and the pons were weakly stained (Figure 6t).

Finally, cells from the neuroepithelia of the third (Figure 6k, p) and fourth (Figure 6u) ventricles, and the neuroepithelium of the aqueduct (Figure 6q, r, s) exhibited high immunoreactivity.

EphrinA5 protein expression at P0

In newborn mice, ephrinA5 expression intensity was dramatically decreased in all regions of the brain, compared to the previous stage E18.5 (Figure 7a-q). In the *telencephalon*, we were however able to detect weakly stained cells in the olfactory structures: the granule cell layer (Figure 7a), the olfactory subventricular zone (Figure 7b), the olfactory tubercle (Figure 7f), and the lateral olfactory tract (Figure 7f). Moreover, ephrinA5 immunoreactive cells were observed in the subventricular zone (Figure 7d), in the striatum (Figure 7e, l), and in the nucleus accumbens (Figure 7f). In the striatum, we

detected a discrete ephrinA5 expression gradient from the lateral and ventral (high) to the medial and dorsal (low) parts (arrowhead in figure 7, panel e). Moderate ephrinA5 staining was observed in the septum (Figure 7o) whereas the parietal (Figure 7e, h), the frontal (Figure 7c) and the retrosplenial (Figure 7g) cortices exhibited weak ephrinA5 protein expression. The hippocampus (Figure 7h), the piriform, the occipital and the perirhinal cortices were unstained (data not shown).

Within the *diencephalic* structures, a very weak ephrinA5 signal was present in the dorsal and in the ventral part of the thalamus (Figure 7i, l). The hypothalamus expressed moderate ephrinA5 protein expression level (Figure 7p).

In the *mesencephalon*, the mesencephalic tegmentum (Figure 7q) exhibited weakly immunostained cells as well as the superior (Figure 7j) and inferior (Figure 7m) colliculi. In the inferior colliculus, we however detected a caudal (high) to rostral (low) gradient (arrowhead in figure 7, panel m). The commissure of superior colliculus exhibited moderate ephrinA5 immunoreactivity (Figure 7k).

Within the *metencephalon*, weak ephrinA5 immunoreactivity was detected in the cerebellum (Figure 7n).

Ventricles and Sylvius aqueduct's neuroepithelia were unstained (data not shown).

Overall, at P0, ephrinA5 protein expression decreased in all brain regions compared to previous stages. The strongest ephrinA5 protein expression was found in the septum, in the hypothalamus and in the commissure of superior colliculus, although these protein expression levels were still moderate compared to the earliest developmental stages (Table 1).

Following P0, ephrinA5 expression was barely detectable.

Discussion

The present work describes for the first time, the distribution of ephrinA5 protein in the embryonic developing mouse brain. EphrinA5 protein expression appeared to be dynamic and complex, and particularly high from E12.5 to E16.5 in the olfactory bulb, the cortex, the LGE/striatum, the thalamus, and the colliculus. Its expression generally decreased from E18.5 to become very weak at P0 and extinct at P7 (data not shown), contrary to the mRNA level that stays elevated in the newborn [9]. In spite of this graded decrease, ephrinA5 protein expression at P0 was still observed in the same regions of the brain than at earlier stages (i.e. in the olfactory structures, cortex, striatum, thalamus, hypothalamus, nucleus accumbens, colliculus and cerebellum). As primary molecular events in topographic map formation occur between E15 and P7 in the mouse [49], this suggests that high ephrinA5 expression during

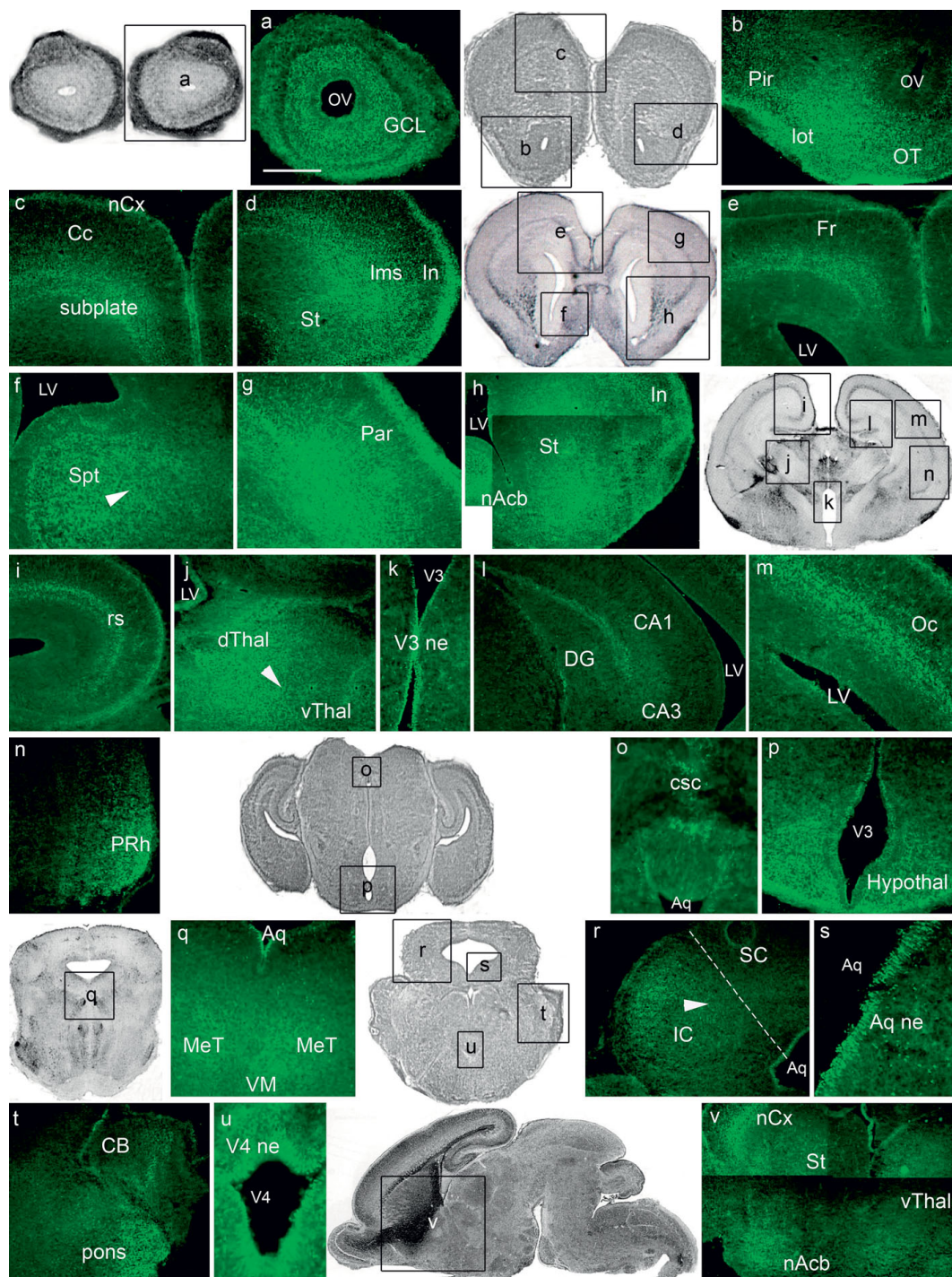


Figure 6 EphrinA5 protein expression in E18.5 embryonic mouse brain. EphrinA5 protein distribution is represented on coronal sections in a rostro-caudal sequence (panels a to u) and on a sagittal section (panel v). At E18.5, ephrinA5 is mostly expressed in the telencephalon especially in olfactory structures (panels a, b) in the septum (panel f) in the lateral migratory stream (panel d) and in the cortex (panels g, m, n, v) at a moderate level. The thalamus (panel j) and inferior colliculus (panel r) showed also a moderate expression, whereas other brain structures exhibited weak ephrinA5 immunoreactivity. Arrowheads in panels f, j and r represent respectively a lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient in the septum, a lateral and dorsal (high) to medial and ventral (low) gradient in the thalamus and a lateral (high) to medial (low) gradient in the inferior colliculus. Dotted line in panel r indicates the limit between the superior and the inferior colliculi. Scale bar: panels a, b: 250 μ m; panels c, e, n: 400 μ m; panels d, j, r, t: 300 μ m; panels f, g, l: 200 μ m; panel h: 450 μ m; panels i, m: 250 μ m; panel k: 100 μ m; panel o: 110 μ m; panel p: 175 μ m; panel q: 150 μ m; panel s: 100 μ m, panel v: 550 μ m. Abbreviations: see list.

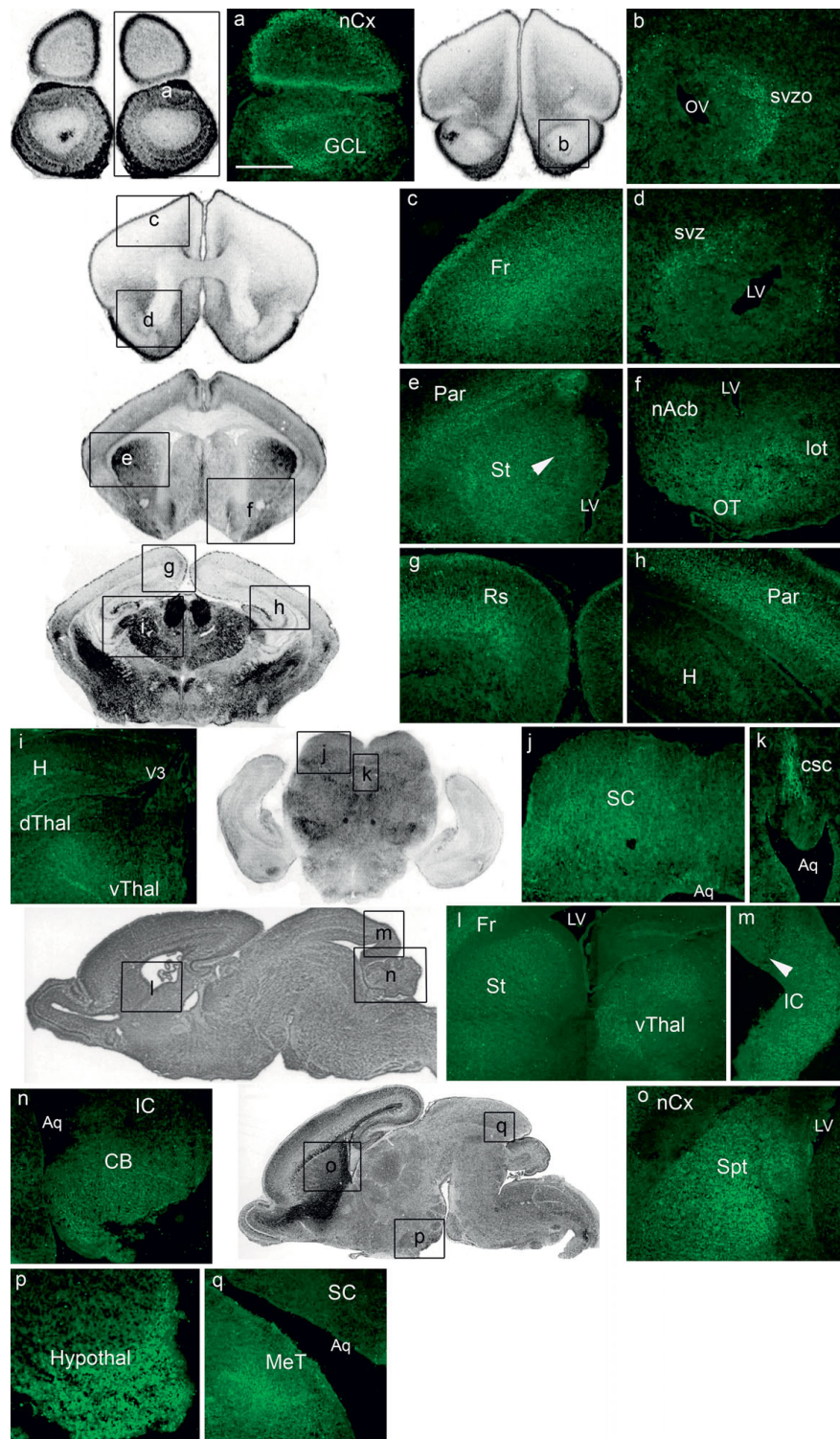


Figure 7 EphrinA5 protein expression in newborn mouse brain. EphrinA5 protein distribution is represented on coronal sections in a rostral-caudal sequence (panels a to k) and on sagittal sections in a medio-lateral sequence (panels l to q). EphrinA5 protein expression dramatically decreased in all brain regions compared to previous stages. The strongest expression was observed in the septum (panel o) the hypothalamus (panel p) and in the commissure of superior colliculus (panel k). Arrowheads in panels e and m indicate respectively a discrete lateral and ventral (high) to medial and dorsal (low) gradient in the striatum and a caudal (high) to rostral (low) gradient in the inferior colliculus. *Scale bar: panel a: 250 μ m; panels b, m, p, q: 200 μ m; panels c, e, f, g, h, n: 300 μ m; panels d, k: 150 μ m; panels i, l: 500 μ m; panel j: 400 μ m; panel o: 350 μ m.* Abbreviations: see list.

embryogenesis, may participate in early target connection mechanisms, whereas ephrinA5 may be implicated to a lesser extent in map remodelling process during the first postnatal week. This transient expression during embryonic development is in line with early axon guidance and topographic mapping in the olfactory, the retinotectal, the thalamocortical, the corticothalamic and the mesostriatal systems. This indicates multiple functions of this molecule in the establishment of these systems, as discussed in the following sections.

Central olfactory system

To the best of our knowledge, the olfactory system is the only brain system, in which ephrinA5 expression has been studied at the protein level, using immunohistochemistry [35]. Our study is complementary to this one as it brings new data especially concerning the expression of the protein in the secondary olfactory neuron population.

Olfaction initiates in the nasal neuroepithelium where primary olfactory neurons reside, each one encoding a single odour receptor type [36,37]. These neurons send axons, forming the olfactory nerve and project to the olfactory bulb in the rostro-ventral telencephalon, where they sort out and target specific glomeruli. Glomeruli are designed as contact zone between growth cones of the primary olfactory neurons and dendrites of secondary olfactory neurons, known as mitral and tufted cells located in the olfactory bulb [35]. Primary olfactory neurons, mitral and tufted cells are neurons supporting early synaptic relays of the mouse olfactory system and so arise in a relatively parallel fashion between E9.5 and E10.5 [38]. In our study, we showed for the first time that the olfactory nerve expressed ephrinA5 in early embryogenesis (E12.5), suggesting either an involvement of this molecule in the guidance of primary olfactory neurons into the olfactory bulb or, an implication of ephrinA5 in the fasciculation of primary olfactory axons inside the olfactory nerve, possibly through an interaction with EphA4- and/or EphA5-receptors, shown to be expressed during embryogenesis in the olfactory nerve [35].

Interestingly, we found that ephrinA5 was expressed in the mitral cell layer of the olfactory bulb, transiently during embryogenesis, at E16.5. The function of this molecule at this precise stage is still unclear but it may be implicated in the positioning of the mitral cell layer in the olfactory bulb. Indeed, ephrins are known to be involved in cell migration and boundary formation in other nervous systems [2,3], and at this stage the cell body of developing mitral cells appears to transform from tangential to radial orientation with rearrangement of its microtubules structure [39]. Moreover, the presence of potential ephrinA5 receptors such as EphA3 [40], EphB2 [41], EphA5 [35,42,43], EphA7 and EphA4

[35] has been also described in the mitral cells during embryogenesis. This suggests that ephrinA5 and its receptors are not expressed in complementary gradient as it has been described for other systems such as the retinotectal one [8,44]. Instead, we showed that ephrinA5 is uniformly expressed in this structure as for its receptors [40-42,35,20]. This ligand-receptor interaction may result in an attraction of the cells, thus regulating the connections of mitral cells. Indeed, this mechanism has already been demonstrated in the accessory olfactory system, where axons expressing high levels of ephrinA5 project to regions of the accessory olfactory bulb that express high levels of EphA6, suggesting that EphA6-ephrinA5 interaction promotes adhesion or attraction between first and second order accessory neurones [17].

Later during embryogenesis, the mitral cells leave the olfactory bulb in the lateral olfactory tract, which synapses on five major regions of the mature telencephalon including the olfactory tubercle and the piriform cortex that project to the thalamus. We detected the expression of ephrinA5 protein from E16.5 on in the lateral olfactory tract and the olfactory tubercle. This expression was strong at E16.5, slightly diminished at E18.5 and became very weak at P0, suggesting that this molecule may be involved in the secondary olfactory neuron guidance, since its presence is concomitant to the development of this telencephalic pathway [45]. EphrinA5 expression in the lateral olfactory tract and olfactory tubercle may also have a role in the fasciculation of axons inside these structures, since fasciculation can be regulated by manipulating chemorepulsive interactions mediated by Eph receptors [46]. As axon path-finding in olfactory map formation has been mainly investigated when primary olfactory axons enter the olfactory bulb glomeruli [47], our data give new insights concerning the guidance of the secondary mitral cell axons onto the thalamus.

Finally, we detected the presence of ephrinA5 protein in the piriform cortex at E12.5, earlier than the expression of this protein in the mitral cells and in the lateral olfactory tract that appeared at E16.5. This ephrinA5 expression in the piriform cortex dramatically decreased from E18.5, when the secondary olfactory axons connect this target [45]. This suggests that ephrinA5 protein expression in the piriform cortex during early embryogenesis may not be related to the connection of the axons of the lateral olfactory tract, but rather may play a role in the formation of the piriform cortex architecture.

Visual system

Expression of ephrinA5 transcript has been extensively studied in this system and especially in the retinocollicular topographic mapping [10,48-50]. We investigated

ephrinA5 protein expression in the retina and detected a high expression in the nasal part compared to the temporal one. This result is in accordance with the previously described retinal ephrinA5 expression pattern in the chick [51] and with ephrinA5 mRNA expression found in a high-nasal-to-low-temporal gradient in the developing mouse embryo retina [52]. As previously described, the mouse retinal ganglion cells also expressed EphA5 and EphA6 receptors [53]. This suggests that ephrinA5 protein may be co-expressed with these molecules and interact in *cis* or in *trans* then modulating the tectum or colliculus connectivity. Indeed, several studies confirmed the role of axonally expressed ephrinA ligands in the development of the retinotectal projection [54]. However, whether growth cones switch between *cis* and *trans* configuration or *cis* and *trans* configurations occur in parallel in the same growth cone, is still unclear.

As our findings in the retina, the results of our analysis in the central visual system were generally consistent with the findings of the past surveys describing the mRNA distribution of ephrinA5 in the 3 main targets of retinal ganglion cell axons: the thalamus, the pretectum, and the superior colliculus. Indeed, we showed that ephrinA5 protein is strongly expressed in these structures especially from E14.5 to E16.5 (Table 1), when the axons of the optic tracts reach their final destinations in the superior colliculus at E14 [30], and in the thalamic dorsal lateral geniculate nuclei at E16 [10]. This is in accordance with an implication of ephrinA5 in the topographic mapping of the visual connections especially in the superior colliculus [48-50]. It has to be noticed however, that ephrinA5 mRNA expression was described as soon as E12.5 in the developing superior colliculus [28,30], whereas we did not detect ephrinA5 protein in this structure earlier than E14.5. This suggests that ephrinA5 may be implicated in this topographic mapping only from E14.5, when the retinal connections reach the superior colliculus. On the contrary, in the thalamus and in the mesencephalic tegmentum, ephrinA5 protein level was elevated from E12.5 onwards. This expression seems to be too precocious to involve ephrinA5 in visual connection mapping and more probably may be implicated in the formation of other systems involving the thalamus, such as the thalamocortical system as discussed below, and the mesencephalic tegmentum, such as the rubrospinal system.

The general high ephrinA5 expression during embryogenesis, may highlight a role for ephrinA5 in the initial diffuse projection when retinal ganglion cells substantially overshoot their appropriate target by E16 along the antero-posterior axis of the superior colliculus [48] and at a lesser extent later on, when map remodelling occur during the first postnatal week.

EphrinA5 RNA is known to be expressed in a caudal (high) to rostral (low) gradient in the mouse superior colliculus [44,50,55]. This gradient is thought to be at the basis of the chemorepellent action of ephrinA5 on retinal ganglion cell's axons arising from the nasal part of the retina [50]. However, at the protein level, ephrinA5 expression was homogenous in the superior colliculus without any detectable expression gradient. As suggested by Greferath *et al.* [56] concerning EphA4 receptor expression in the striatum, this may be due to the fact that the antibody localizes ephrinA5 protein in both cell bodies and axons bundles, whereas RNAs are concentrated in the cell somas. Moreover, studies describing the EphA5 protein expression in the developing mouse [43] did not detect any protein gradient expression.

Among studies exploring the expression of EphA-receptors at the protein level in the developing mouse brain, some showed that the potential ephrinA5 receptors EphA4 and EphA5, are expressed in the central visual system: EphA4 protein is present in the thalamus and superior colliculus from E11 to P6; and in the pretectal nucleus from E15 to P6 [56]. EphA5 protein is expressed in the geniculate nucleus of the thalamus from E17 as well as in the pretectum and the superior colliculus from E9 to E17 [43]. Together with our present work, these findings suggest a concomitant expression of ephrinA5 with (1) EphA4 and EphA5 in the superior colliculus, (2) EphA4 in the thalamus and (3) EphA5 in the pretectum. Moreover, a detailed analysis of protein gradients inside these regions may help to understand their interactions and their chemorepulsive or chemoattractive actions. However, it is unlikely that the co-expression of ligand and receptor in the same region of the visual system is responsible of an attractive mechanism, since it has been extensively shown, using *in vitro* studies and double ephrinA2/ephrinA5 knockout mice [30,48-50], that the topographic map of the visual system is established by a chemorepellent activity of ephrinAs [50]. Nevertheless, it may be that ligands and receptors are present on the same cells, as it has been shown in the chick retinal ganglion cells, where ephrinA2, ephrinA5 and EphA5 mRNA are co-expressed [51]. In this case, the presence of ephrinA-ligand on the retinal ganglion cells could control the EphA-receptor function through a modulation of its intracellular signaling pathway [51] as discussed above.

Cortex and thalamocortical projections

We detected ephrinA5 protein in the developing cortex from E12.5 to E18.5 with an expression pattern becoming more complex as cortical layers were forming. We found a particularly strong signal at E16.5 in the primitive primary somatosensory cortex (S1), when thalamic axons

reach the subplate zone. This is consistent with the presence of ephrinA5 mRNA in the subplate and cortical plate of S1 at this stage [22-24,27]. Indeed, ephrinA5 is thought to interact with and repulse ventrobasal thalamic terminal arbors expressing EphA4, and to be responsible for the precise topographic mapping of thalamic afferents into S1 [24]. Moreover, we showed a strong ephrinA5 protein expression in other regions of the developing cortex, especially in the parietal, frontal and insular cortices at E16.5, suggesting that ephrinA5 may be involved in the refinement of other thalamocortical projections and probably through an interaction with 3 potential receptors: EphA3, EphA4 and/or EphA5 that have been detected in these regions during mouse embryogenesis. Indeed, EphA3 protein is expressed in the cortical plate and cortical intermediate zone from E12 to P0, especially in thalamocortical axons [40]. EphA4 protein is expressed from E11 to P6 in the developing cortex [56], and EphA5 protein is present in the intermediate zone and cortical plate [43] whereas its transcript is expressed in the dorsal and medial thalamus that connect to the developing cortex [57], suggesting an expression of EphA5 protein in the thalamocortical projections.

Thalamus and corticothalamic projections

Previous studies showed different patterns of ephrinA5 mRNA expression, depending of the thalamic nuclei and the stage observed: at E13.5, Bolz *et al.* [27] described a weak mRNA expression in the ventricular zone of the dorsal thalamus at the caudal level with no detectable expression in the mid- or rostral levels of the dorsal thalamus. Feldheim *et al.* [10] described ephrinA5 mRNA expression from E14.5, in the dorsal and ventral lateral geniculate nuclei in a ventral, lateral and anterior (high) to dorsal, medial and posterior (low) gradient. Between E16.5 and E18.5, nuclei of the lateral part of the dorsal thalamus [27] and ventral nuclei [29] both exhibit ephrinA5 mRNA. Our results partially match with these previous studies, as we showed here that ephrinA5 protein was strongly expressed in the thalamus in a ventral and rostral (high) to dorsal and caudal (low) gradient especially from E12.5 to E16.5. Interestingly, we observed that this gradient inverted from E16.5, when cortical axons connect the thalamus [58]. This is consistent with an implication of ephrinA5 in the corticothalamic projection establishment as proposed by Torii and Levitt [59] who hypothesized that the corticothalamic projections are directed by ephrinA-EphA signalling and more precisely that axons from sensory cortex find a precise target in the thalamus by responding to local levels of ephrinA5. In this region, ephrinA5 may interact with EphA4 protein, described in the thalamus from E13.5 to postnatal stages [56] to ensure the formation of terminal corticothalamic arbors.

Mesostriatal system

EphrinA5 protein was strongly expressed in the main target structure of the ventral mesencephalic axons: the lateral ganglionic eminence and later in development, the striatum. As described for mRNA levels [19,21], this expression was high from E12.5 to E16.5 and then diminished later in development. We observed a graduated ephrinA5 protein expression in a ventral and rostral (high) to a dorsal and caudal (low) gradient that was not spatially concordant with the ephrinA5 RNA expression, described as not graded in developing striatum [60,19,21]. As we discussed in a previous work, it is likely that the presence of this ephrinA5 protein expression gradient helps mesencephalic neuron subpopulations to differentially connect the dorsal and ventral parts of the striatum during development [21].

No ephrinA5 protein was detected in the ventral mesencephalon from E12.5 to P0, suggesting that this protein was present exclusively at the target site of the mesostriatal projections, when the mesencephalic axons reach the LGE [61]. This strongly suggests that ephrinA5 may be involved in the refinement of mesencephalic arbors in the striatum especially by interacting with EphA5, expressed in the LGE between E13 and E17 [43] and in the ventral mesencephalon in the dopaminergic mesencephalic cells projecting to the LGE [21]. Finally, the implication of ephrinA5 in the mesencephalic projections onto the striatum is in accordance with previous work showing that disruption of EphA/ephrinA interactions resulted in the mistargeting of a fraction of mesencephalic dopaminergic projections [62].

Conclusions

In the present study we provide the first detailed description of ephrinA5 protein distribution in the embryonic developing mouse brain. We found that ephrinA5 is strongly expressed from E12.5 to E16.5, in the olfactory bulb, the cortex, the striatum, the thalamus, and the colliculi, suggesting its implication in topographic mapping of olfactory, retinotectal, thalamocortical, corticothalamic and mesostriatal systems. These new data may help to characterise the molecular basis of pathfinding of these systems, during development. Moreover, given the importance of developmental processes in brain repair, these results may open new tracks in the improvement of pathway restoration following cell transplantation in the damaged brain.

Methods

Animals

Housing of the animals and all animal experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry (decree 87849) and the European Communities Council

Directive (86/609/EEC). All efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering.

Embryonic and postnatal C57Bl/6 wild type mice of different developmental stages (E12.5, E14.5, E16.5, E18.5, P0) were used in this study. E0.5 was defined as the plug date, and P0 as the date of birth. Moreover, E16.5 embryonic eA5KO mice were used to test the anti-ephrinA5 antibody specificity. These mice were kindly provided by Dr. P. Vanderhaeghen (Belgium).

Genotyping of eA5KO mice

Mice genomic DNA was extracted from 5 mm-long tail fragments. The tissue was digested in an alkaline lysis solution (25 mM NaOH, 0.2 mM Na₂-EDTA, pH = 12) at 94°C for 1 h. The lysate containing the genomic DNA was then neutralized by the addition of 40 mM Tris-HCl, pH5.

Amplification was performed using the PCR Accu-Prime Taq DNA Polymerase System (Invitrogen) according to the protocol provided by the manufacturer. Sense primer for ephrin-A5 is 5'-TCC AGC TGT GCA GTT CTC CAA AAC A-3'. Antisense primers for the detection of ephrin-A5 wild type and mutant alleles are respectively 5'-ATT CCA AGA GGG GTG ACT ACC ACA TT-3' and 5'-AGC CCA GAA AGC GAA GGA GCA AAG C-3'. They were designed to generate PCR fragments of 397 and 513 bp respectively. After an initial step of DNA denaturation at 94°C for 5 min, amplification was carried out for 30 cycles at 94°C for 1 min, 46.5°C for 1 min and 72°C for 1 min. A final step of 5 min at 72°C was performed.

After separation by electrophoresis on 2% agarose gels, the size of the PCR products obtained allowed us to distinguish between the wild-type ephrin-A5(+/+) animals (one PCR product at 397 bp) from mutated animals, homozygous ephrin-A5 (-/-) (one PCR product at 513 bp) and heterozygous ephrin-A5 (+/-) (two PCR products at 397 and 513 bp).

Antibodies

Primary antibody directed against the C-terminal domain of ephrinA5 has been reported before [21]. This is a polyclonal goat anti-ephrinA5 antibody (sc-6075, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) that recognizes a 19 amino acid epitope that falls in the last 50 amino acids of the human ephrinA5 protein. This antibody was used at a dilution of 1:100. Secondary biotinylated rabbit anti-goat antibody was purchased from Vector (Burlingame, CA) and used at a dilution of 1:200.

Specificity of this antibody was checked comparing immunohistochemistry in wild type and homozygous ephrinA5KO mice.

Immunohistochemistry

Pregnant wild type and eA5KO mice were cervically dissected at different developmental stages. Embryonic (E12.5, E14.5, E16.5, E18.5) and newborn (P0) wild type brains were dissected out and E16.5 wild type embryo heads containing the eyes were taken. Homozygous E16.5 eA5KO embryo brains were taken to check the specificity of the anti-ephrinA5 antibody. These tissues were fixed in 4% PFA overnight and cryoprotected with 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) for 48 h at 4°C, excepted for the E16.5 embryo heads that were dehydrated in alcohol and butanol after fixation. Two brains of each developmental stage were then frozen in cold isopentane and cut on a cryostat into sagittal and coronal 20 µm-thick sections. Sections were stored at -80°C until immunohistochemistry processing. Dehydration of heads, consisting of successive baths of twice 1 hr each in 70°, 95°, 100°alcohol, butanol and butanol/paraffin (v/v), were embedded in paraffin and cut on a microtome into horizontal 10 µm-thick sections. Before immunohistochemistry, paraffin sections were deparaffinized in toluene solution three time for 5 min and rehydrated twice in successive alcohol baths of 100°, 90°, 70°, 30°and distilled water for 5 min each.

Immunohistochemistry was performed as previously described in Deschamps *et al*, [21]. Briefly, the sections were rehydrated in 0.1 M potassium phosphate buffered saline (KPBS) (0.9% NaCl, 0.08 M K₂HPO₄, 0.02 M KH₂PO₄), and then post-fixed with 4% PFA for 2 h at room temperature (RT). After several washes with 0.1 M KPBS, sections were incubated with a blocking solution (5% rabbit serum, 0.25% Triton-X100 in 0.1 M KPBS) for 3 h at RT to saturate non-specific sites. The anti-ephrinA5 antibody was then applied on sections overnight at 4°C. After several washes with 0.1 M KPBS, the sections were incubated with the secondary biotinylated antibody for 1 h 30 at RT. After extensive washing with 0.1 M KPBS, ephrinA5 expression was visualized with neutravidin™ fluorescein conjugate (Molecular Probes, Eugene, USA), diluted at 1/200 in blocking solution, for 45 min at RT. Following several washes with 0.1 M KPBS, slides were covered with mowiol anti-fade mounting medium [63,64].

Immunostaining analysis

Sections were observed and photographed with a microscope (Olympus BX60F5) and camera setting (SPOT32, Diagnostic instruments, inc). Image brightness and contrast were adjusted with Adobe Photoshop in the same conditions for all pictures. Brain structures were identified using brain mouse atlases [65,66].

Abbreviations

Am: amygdala; Aq: Sylvius aqueduct; Aq ne: Sylvius aqueduct neuroepithelium; Bst: bed nucleus of stria terminalis; c: caudal; CA1, 3: hippocampal area CA1, 3 (Ammon's Horn); CB: cerebellum; CBv: cerebellar vermis; Cc: cingulate cortex; CP: cortical plate; d: dorsal; DG: dentate gyrus; dThal: dorsal thalamus; ec: external capsule; eA5KO: ephrinA5 knock-out; fn: fastigial nucleus; Fr: frontal cortex; GCL: granule cell layer; H: hippocampus; Hypothal: hypothalamus; IC: inferior colliculus; In: insular cortex; IS: isthmus; isdz: isthmus differentiating zone; KPBS: potassium phosphate buffered saline; l: lateral; LGE: lateral ganglionic eminence; LGE dz: lateral ganglionic eminence differentiating zone; lms: lateral migratory stream; lot: lateral olfactory tract; LV: lateral ventricle; m: medial; MCL: mitral cell layer; MeT: mesencephalic tegmentum; MGE: medial ganglionic eminence; MGE dz: medial ganglionic differentiating zone; MZ: marginal zone; n: nasal; nAcb: nucleus accumbens; nCx: neocortex; OB: olfactory bulb; Oc: occipital cortex; on: olfactory nerve; opn: optic nerve; OT: olfactory tubercle; OV: olfactory ventricle; Par: parietal cortex; PB: phosphate buffer; PBS: phosphate buffered saline; PFA: paraformaldehyde; Pir: piriform cortex; poa: preoptic area; Preoptic dz: preoptic differentiating zone; PRh: perirhinal cortex; PT: pretectum; r: rostral; RGCs: retinal ganglion cells; Rs: retrosplenial cortex; RT: room temperature; SC: superior colliculus; csc: commissure of superior colliculus; SP: subplate; Spt: septum; St: striatum sta: subthalamic area; svz: subventricular zone; svzo: olfactory subventricular zone; S1: primary somatosensory cortex; t: temporal; Thal: thalamus; v: ventral; vb: vitreous body VM: ventral mesencephalon; vThal: ventral thalamus; V3: third ventricle; V3 ne: neuroepithelium of the third ventricle; V4: fourth ventricle; V4 ne: neuroepithelium of the fourth ventricle; wt: wild type

Acknowledgements

This work was supported by the French Ministry of Research, the CNRS, the University of Poitiers, Région Poitou-Charentes, Fondation pour la Recherche sur le Cerveau and Fondation de France. Authors certify to have no conflict of interest.

Author details

¹Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, CNRS, 40 avenue du Recteur Pineau, F-86022, France. ²GreVic EA3808, Université de Poitiers, CNRS, 40 avenue du Recteur Pineau, F-86022, France.

Authors' contributions

CD carried out the immunoassays and the image captures, helped in western-blot assays and genotyping procedures, participated to the analyses and interpretations of data, and wrote the manuscript. MM and GP carried out western-blot assays. TJ carried out genotyping procedures. MJ and AG contributed to the conception and design of the data, and revised critically the manuscript. LP designed and coordinated the study, wrote the manuscript, and participated to the analyses and interpretations of data. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 5 May 2010 Accepted: 25 August 2010

Published: 25 August 2010

References

1. Flanagan JG, Vanderhaeghen P: **The ephrins and Eph receptors in neural development.** *Annu Rev Neurosci* 1998, **21**:309-345.
2. O'Leary DD, Wilkinson DG: **Eph receptors and ephrins in neural development.** *Current Opinion in Neurobiology* 1999, **9**:65-73.
3. Wilkinson DG: **Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly.** *Int Rev Cytol* 2000, **196**:177-244.
4. Kullander K, Klein RS: **Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**:475-86.
5. Pasquale EB: **Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:462-475.
6. Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, Li C, Barton WA, Jeffrey PD, Vearing C, Geleick D, Feldheim DA, Boyd AW, Henkemeyer M, Nikolov DB: **Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling.** *Nat Neurosci* 2004, **7**:501-509.
7. Pasquale EB: **Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear.** *Nat Neurosci* 2004, **7**:417-418.
8. Cheng HJ, Nakamoto M, Bergemann AD, Flanagan JG: **Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map.** *Cell* 1995, **82**:371-381.
9. Zhang JH, Cerretti DP, Yu T, Flanagan JG, Zhou R: **Detection of ligands in regions anatomically connected to neurons expressing the Eph receptor Bsk: potential roles in neuron-target interaction.** *J Neurosci* 1996, **16**:7182-7192.
10. Feldheim DA, Kim YI, Bergemann AD, Frisen J, Barbacid M, Flanagan JG: **Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain.** *Neuron* 1998, **21**:1303-1313.
11. Carvalho RF, Beutler M, Marler KJ, Knöll B, Becker-Barroso E, Heintzmann R, Ng T, Drescher U: **Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5.** *Nat Neurosci* 2006, **9**:322-330.
12. Ota R, Burgaya F, Frisen J, Soriano E, Martinez A: **Ephrin-A5 modulates the topographic mapping and connectivity of commissural axons in murine hippocampus.** *Neuroscience* 2006, **141**:109-121.
13. Eberhart J, Swartz ME, Koblar SA, Pasquale EB, Tanaka H, Krull CE: **Expression of EphA4, ephrin-A2 and ephrin-A5 during axon outgrowth to the hindlimb indicates potential roles in pathfinding.** *Dev Neurosci* 2000, **22**:237-250.
14. Eberhart J, Barr J, O'Connell S, Flagg A, Swartz ME, Cramer KS, Tosney KW, Pasquale EB, Krull CE: **Ephrin-A5 exerts positive or inhibitory effects on distinct subsets of EphA4-positive motor neurons.** *J Neurosci* 2004, **24**:1070-1078.
15. Miller K, Kolk SM, Donoghue MJ: **EphA7-ephrin-A5 signaling in mouse somatosensory cortex: developmental restriction of molecular domains and postnatal maintenance of functional compartments.** *J Comp Neurol* 2006, **496**:627-642.
16. Cheng HJ, Flanagan JG: **Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases.** *Cell* 1994, **79**:157-168.
17. Knöll B, Isenmann S, Kilic E, Walkenhorst J, Engel S, Wehinger J, Bähr M, Drescher U: **A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons.** *Development* 2001, **128**:895-906.
18. Cutforth T, Moring L, Mendelsohn M, Nemes A, Shah NM, Kim MM, Frisen J, Axel R: **Axonal ephrin-As and odorant receptors: coordinate determination of the olfactory sensory map.** *Cell* 2003, **114**:311-322.
19. Passante L, Gaspard N, Degraeve M, Frisen J, Kullander K, De Maertelaer V, Vanderhaeghen P: **Temporal regulation of ephrin/Eph signalling is required for the spatial patterning of the mammalian striatum.** *Development* 2008, **135**:3281-3290.
20. Cooper MA, Kobayashi K, Zhou R: **Ephrin-A5 regulates the formation of the ascending midbrain dopaminergic pathways.** *Dev Neurobiol* 2009, **69**:36-46.
21. Deschamps C, Faideau M, Jaber M, Gaillard A, Prestoz L: **Expression of ephrinA5 during development and potential involvement in the guidance of the mesostriatal pathway.** *Exp Neurol* 2009, **219**:466-80.
22. Castellani V, Yue Y, Gao PP, Bolz J: **Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits.** *J Neurosci* 1998, **18**:4663-4672.
23. Gao PP, Yue Y, Zhang JH, Cerretti DP, Levitt P, Zhou R: **Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrin-A5: implications in the development of thalamocortical projections.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:5329-5334.
24. Vanderhaeghen P, Lu Q, Prakash N, Frisen J, Walsh CA, Frostig RD, Flanagan JG: **A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex.** *Nat Neurosci* 2000, **3**:358-365.
25. Mann F, Peuckert C, Dehner F, Zhou R, Bolz J: **Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections.** *Development* 2002, **129**:3945-3955.
26. Dufour A, Seibt J, Passante L, Depaepe V, Ciossek T, Frisen J, Kullander K, Flanagan JG, Polleux F, Vanderhaeghen P: **Area specificity and topography of thalamocortical projections are controlled by ephrin/Eph genes.** *Neuron* 2003, **39**:453-465.
27. Bolz J, Uziel D, Mühlfriedel S, Güllmar A, Peuckert C, Zarbais K, Wurst W, Torii M, Levitt P: **Multiple roles of ephrins during the formation of thalamocortical projections: maps and more.** *J Neurobiol* 2004, **59**:82-94.
28. Donoghue LJ, Lewis RM, Merlie JP, Sanes JR: **The Eph kinase ligand AL-1 is expressed by rostral muscles and inhibits outgrowth from caudal neurons.** *Mol Cell Neurosci* 1996, **8**:185-198.

29. Uziel D, Garcez P, Lent R, Peuckert C, Niehage R, Weth F, Bolz J: **Connecting thalamus and cortex: The role of ephrins.** *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006, **288**:135-142.
30. Frisen J, Yates PA, McLaughlin T, Friedman GC, O'Leary DD, Barbacid M: **Ephrin-A5(AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system.** *Neuron* 1998, **20**:235-243.
31. Ellsworth CA, Lyckman AW, Feldheim DA, Flanagan JG, Sur M: **Ephrin-A2 and -A5 influence patterning of normal and novel retinal projections to the thalamus: conserved mapping mechanisms in visual and auditory thalamic targets.** *J Comp Neurol* 2005, **488**:140-151.
32. Knöll B, Drescher U: **Ephrin-As as receptors in topographic projections.** *Trends Neurosci* 2002, **25**:145-149.
33. Pfeiffenberger C, Tamada J, Feldheim DA: **Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system.** *J Neurosci* 2006, **26**:12873-12884.
34. Peuckert C, Wacker E, Rapus J, Levitt P, Bolz J: **Adaptive changes in gene expression patterns in the somatosensory cortex after deletion of ephrinA5.** *Mol Cell Neurosci* 2008, **39**:21-31.
35. St John JA, Pasquale EB, Key B: **EphA receptors and ephrin-A ligands exhibit highly regulated spatial and temporal expression patterns in the developing olfactory system.** *Brain Res Dev Brain Res* 2002, **138**:1-14.
36. Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Monbaerts P: **Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system.** *J Neurosci* 2002, **22**:3033-3043.
37. Hoffpauir BK, Marrs GS, Mathers PH, Spiro GA: **Does the brain connect before the periphery can direct? A comparison of three sensory systems in mice.** *Brain Res* 2009, **1277**:115-29.
38. Blanchart A, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L: **Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb.** *J Comp Neurol* 2006, **496**:529-543.
39. Hinds JW, Ruffett TL: **Mitral cell development in the mouse olfactory bulb: reorientation of the perikaryon and maturation of the axon initial segment.** *J Comp Neurol* 1973, **151**:281-306.
40. Kudo C, Ajioka I, Hirata Y, Nakajima K: **Expression profiles of EphA3 at both the RNA and protein level in the developing mammalian forebrain.** *J Comp Neurol* 2005, **487**:255-269.
41. St John JA, Key B: **EphB2 and two of its ligands have dynamic protein expression patterns in the developing olfactory system.** *Brain Res Dev Brain Res* 2001, **126**:43-56.
42. St John JA, Tisay KT, Caras IW, Key B: **Expression of EphA5 during development of the olfactory nerve pathway in rat.** *J Comp Neurol* 2000, **416**:540-550.
43. Cooper MA, Crockett DP, Nowakowski RS, Gale NW, Zhou R: **Distribution of EphA5 receptor protein in the developing and adult mouse nervous system.** *J Comp Neurol* 2009, **514**:310-328.
44. Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Lösinger J, Noda M, Bonhoeffer F: **In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases.** *Cell* 1995, **82**:359-370.
45. Schwob JP, Price JL: **The development of axonal connections in the central olfactory system of rats.** *J Comp Neurol* 1984, **223**:177-202.
46. Caras IW: **A link between axon guidance and axon fasciculation suggested by studies of the tyrosine kinase receptor EphA5/REK7 and its ligand ephrin-A5/AL-1.** *Cell Tissue Res* 1997, **290**:261-264.
47. Mombaerts P: **Axonal wiring in the mouse olfactory system.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, **22**:713-737.
48. O'Leary DD, McLaughlin T: **Mechanisms of retinotopic map development: Ephs, ephrins, and spontaneous correlated retinal activity.** *Prog Brain Res* 2005, **147**:43-65.
49. McLaughlin T, O'Leary DD: **Molecular gradients and development of retinotopic maps.** *Annu Rev Neurosci* 2005, **28**:327-355.
50. Lemke G, Reber M: **Retinotectal mapping: new insights from molecular genetics.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, **21**:551-580.
51. Hornberger MR, Dütting D, Ciossek T, Yamada T, Handwerker C, Lang S, Weth F, Huf J, Wessel R, Logan C, Tanaka H, Drescher U: **Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons.** *Neuron* 1999, **22**:731-742.
52. Marcus RC, Gale NW, Morrison ME, Mason CA, Yancopoulos GD: **Eph family receptors and their ligands distribute in opposing gradients in the developing mouse retina.** *Dev Biol* 1996, **180**:786-789.
53. Brown A, Yates PA, Burrolo P, Ortuno D, Vaidya A, Jessell TM, Pfaff SL, O'Leary DDM, Lemke G: **Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling.** *Cell* 2000, **102**:77-88.
54. Scicolone G, Ortalli AL, Carri NG: **Key roles of Ephs and ephrins in retinotectal topographic map formation.** *Brain Res Bull* 2009, **79**:227-247.
55. Monschau B, Kremoser C, Ohta K, Tanaka H, Kaneko T, Yamada T, Handwerker C, Hornberger MR, Lösinger J, Pasquale EB, Siever DA, Verderame MF, Müller BK, Bonhoeffer F, Drescher U: **Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons.** *EMBO J* 1997, **16**:1258-1267.
56. Greferath U, Cauty AJ, Messenger J, Murphy M: **Developmental expression of EphA4-tyrosine kinase receptor in the mouse brain and spinal cord.** *Gene Expr Patterns* 2002, **2**:267-274.
57. Mackarehstschian K, Lau CK, Caras I, MacConnell SK: **Regional differences in the developing cerebral cortex revealed by ephrin-A5 expression.** *Cereb Cortex* 1999, **9**:601-610.
58. Auladell C, Pérez-Sust P, Supèr H, Soriano E: **The early development of thalamocortical and corticothalamic projections in the mouse.** *Anat Embryol* 2000, **201**:169-179.
59. Torii M, Levitt P: **Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism.** *Neuron* 2005, **48**:563-575.
60. Janis LS, Cassidy RM, Kromer LF: **Ephrin-A binding and EphA receptor expression delineate the matrix compartment of the striatum.** *J Neurosci* 1999, **19**:4962-4971.
61. Gates M, Coupe V, Torres E, Fricker-Gates R, Dunnett S: **Spatially and temporally restricted chemoattractive and chemorepulsive cues direct the formation of the nigro-striatal circuit.** *Eur J Neurosci* 2004, **19**:831-844.
62. Sieber B, Kuzmin A, Canals J, Danielsson A, Paratcha G, Arenas E, Alberch J, Ogren S, Ibanez C: **Disruption of EphA/ephrin-A signaling in the nigrostriatal system reduces dopaminergic innervation and dissociates behavioral responses to amphetamine and cocaine.** *Mol Cell Neurosci* 2004, **26**:418-428.
63. Osborn M, Weber K: **Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structures.** *Methods Cell Biol* 1982, **24**:97-132.
64. Baschong W, Suetterlin R, Laeng RH: **Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM).** *J Histochem Cytochem* 2001, **49**:1565-1572.
65. Jacobowitz DM, Abbott LC: *Chemoarchitectonic atlas of the developing mouse brain* CRC Press Inc 1998.
66. Schambra UB: *Atlas of the prenatal mouse brain* Heidelberg: Springer Press 2008.

doi:10.1186/1471-2202-11-105

Cite this article as: Deschamps et al.: EphrinA5 protein distribution in the developing mouse brain. *BMC Neuroscience* 2010 11:105.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Étude de l'expression de la molécule de guidage éphrine-A5 dans le système nerveux central de souris au cours du développement : implication dans la mise en place de la voie mésostriatale

Le fonctionnement du système nerveux dépend de la mise en place d'un réseau complexe de connexions neuronales au cours du développement embryonnaire et postnatal. Comprendre comment ces réseaux neuronaux s'établissent est un axe majeur de la neurobiologie du développement. Au-delà de son importance fondamentale, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires du guidage axonal représente un enjeu capital pour appréhender les situations pathologiques consécutives à des troubles lésionnels ou dégénératifs du système nerveux, compte tenu de l'importance des mécanismes développementaux dans la réparation des circuits neuronaux adultes. Au sein de l'équipe Physiopathologie des Troubles Neurodégénératifs et Adaptatifs de l'unité CNRS UMR 6187, le Pr. Afsaneh Gaillard a récemment réussi à reconstruire la voie nigrostriée dans un modèle murin de la maladie de Parkinson, par greffe de cellules embryonnaires issues du mésencéphale ventral. Afin d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu, nous nous sommes attachés à étudier les mécanismes de guidage axonal des neurones dopaminergiques issus du mésencéphale ventral vers leur région cible, le striatum, pendant l'embryogenèse chez la souris. De précédentes études ont suggéré l'implication du couple de molécules de guidage éphrine-A5/EphA5 en se basant sur l'expression de leurs ARNm respectivement mis en évidence dans le striatum et dans le mésencéphale ventral. Cependant, aucune implication fonctionnelle n'a été démontrée. Ainsi, nous sommes-nous tout d'abord attachés à décrire, *in vivo*, l'expression de la protéine éphrine-A5 par immunohistochimie dans le système nerveux central de la souris au cours du développement, avant d'émettre l'hypothèse de l'implication de l'interaction éphrine-A5/EphA5 dans la mise en place de la voie mésostriatale. Nous avons notamment détecté à proximité des axones dopaminergiques, pendant l'embryogenèse et le développement post-natal, l'expression de la protéine éphrine-A5 dans le thalamus, dans le télencéphale ventral selon un gradient décroissant rostro-caudal et ventro-dorsal, et dans le striatum. Nous avons montré, *in vitro* par immunocytochimie et *in vivo* par immunohistochimie, qu'une proportion de neurones dopaminergiques exprime la protéine réceptrice EphA5. De plus, nous avons observé, par *stripe assay*, que la protéine purifiée éphrine-A5 exerce un effet répulsif sur la majorité des projections dopaminergiques. Chez l'embryon dont le gène codant pour éphrine-A5 a été invalidé, nous avons mis en évidence, par western blot, une diminution de l'expression de la tyrosine hydroxylase, marqueur des neurones catécholaminergiques, dans le mésencéphale ventral. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les éphrines-A, et plus particulièrement éphrine-A5, participent au guidage axonal et à la mise en place topographique des connexions dopaminergiques mésostriatales. Ce travail nous a amenés à proposer un nouveau modèle de guidage axonal des connexions dopaminergiques mésostriatales chez la souris, dans lequel l'interaction répulsive éphrine-A5/EphA5 participerait au maintien de la trajectoire rostro-ventrale de la voie mésostriatale et à la distribution topographique des projections dans le striatum.

Mots clés : éphrine-A5 ; guidage axonal ; développement ; système dopaminergique mésostriatal ; thérapie cellulaire ; maladie de Parkinson ; immunohistochimie ; *stripe assay* ; culture cellulaire et tissulaire ; western blot

Doctorat de l'Université de Poitiers – Discipline : Neurosciences

Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires
CNRS UMR 6187 & Université de Poitiers
Pôle Biologie Santé
1, rue Georges Bonnet
86022 Poitiers Cedex