

Attention à ne pas franchir la ligne médiane ! Slit et Robo veillent

Les axones en croissance sont guidés par des molécules produites par les cellules de l'environnement dans lequel ils naviguent. Une grande partie de ces indices moléculaires agissent localement, à proximité immédiate du cône de croissance, l'extrémité distale de l'axone en cours d'élongation. Il s'agit le plus souvent de protéines d'adhérence, ancrées dans la matrice extracellulaire ou à la surface du plasmalemme. Ces dernières années, il a été démontré que les cônes de croissance sont également sensibles à des facteurs diffusibles produits par des cellules situées à distance de l'axone [1]. Ces facteurs peuvent attirer les axones (on parle de molécules attractives et de chimio-attraction) ou au contraire inhiber leur croissance et les éloigner des cellules productrices (on parle de molécules répulsives et de chimio-répulsion) [2].

Chez les vertébrés et les invertébrés, la ligne médiane ventrale du système nerveux central est une source majeure de molécules diffusibles chimiotropiques. Ainsi, dans le télencéphale des rongeurs, on sait que le septum libère des facteurs chimio-répulsifs pour les axones du bulbe olfactif [3]. Par ailleurs, chez les vertébrés, les cellules de la « plaque du plancher » contrôlent à distance la croissance des axones commissuraux, notamment par l'intermédiaire de la protéine nétrine-1 (*m/s* 1997, n° 2, p. 245). Chez la drosophile, les cellules gliales qui composent la ligne médiane ventrale jouent aussi un rôle de « garde-barrière » : de nombreux axones ne traversent jamais la ligne médiane, alors que les axones commissuraux la croisent, mais une seule fois (*figure 1A*) [1]. Plusieurs travaux récents indiquent que les protéines sécrétées, Slit, et leurs

récepteurs, Robo, sont impliqués dans la mise en place des connexions neuronales. Le gène *roundabout* (*Robo*) a été identifié chez la drosophile, à la suite d'une recherche de mutants présentant des anomalies de déviation de la ligne médiane ventrale [4]. Chez le mutant *Robo*^{-/-}, tous les axones croisent la ligne médiane et les axones commissuraux peuvent la traverser à de multiples reprises (*figure 1A*). Le gène *Robo* code pour une protéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines et ses homologues ont été clonés chez le nématode et les mammifères (*figure 1B*) [5, 6]. Chez ces derniers, deux gènes *Robo*, *Robo1* et *Robo2*, ont été caractérisés. Pendant le développement de l'embryon de drosophile, Robo est exprimé sur les cônes de croissance des axones qui ne croisent pas la ligne médiane, et sur les axones des neurones commissuraux mais seulement après qu'ils l'ont croisée (*figure 1A*). Ces observations suggèrent que Robo était le récepteur d'un facteur répulsif produit par les cellules de la ligne médiane.

Le gène *Slit*, identifié chez la drosophile il y a quinze années [7], apparaissait comme un ligand possible de Robo. En effet, *Slit* s'exprime au niveau de la ligne médiane ventrale, et sa mutation provoque des anomalies du développement larvaire, notamment du système nerveux central. *Slit* code pour une protéine de la matrice extracellulaire [8], constituée de domaines riches en leucines et de motifs EGF (*epidermal growth factor*) (*figure 1B*). Chez les mammifères, trois homologues de *Slit* (*Slit1*, *Slit2* et *Slit3*) ont été clonés [9-12]. L'expression de la protéine Slit2 humaine recombinante, dans des lignées cellulaires COS ou 293T [9], a permis de montrer, d'une part,

que Slit2 est sécrétée mais reste très fortement attachée à la surface des cellules qui l'expriment et, d'autre part, que la protéine Slit2 (d'un poids moléculaire de 210 kDa) est partiellement clivée en deux fragments de 150 kDa (Slit2N) et 60 kDa (Slit2C). Ce sont pour l'essentiel la protéine intacte et le fragment Slit2N qui se fixent sur les membranes, alors que Slit2C est plus diffusible. Le site de clivage, qui est conservé dans toutes les isoformes de Slit, se situe entre le cinquième et le sixième motif EGF (*figure 1B*).

Les groupes de Corey Goodman (UC Berkeley CA, USA), Marc Tessier-Lavigne (UC San Francisco CA, USA) et Yi Rao (Washington University, Saint-Louis MO, USA), viennent de montrer que Slit est un ligand de Robo [9, 12, 13]. Chez la drosophile, en l'absence de Slit, tous les axones poussent en direction de la ligne médiane ventrale et ne la quittent plus (*figure 1A*). De plus, l'expression ectopique de Slit dans les muscles de lignées de mouches transgéniques, empêche les axones des motoneurons de les innover [13]. Dans la moelle épinière des rongeurs, les gènes *Slit* sont exprimés par la « plaque du plancher », et la protéine Slit2 est répulsive pour les axones moteurs [9]. Ces données indiquent que les protéines Slit sont chimio-répulsives. Nous avons étudié l'expression des gènes *Slit* et *Robo* dans le télencéphale embryonnaire du rat, et montré que *Robo1* et *Robo2*, ainsi que *Slit1* et *Slit2*, sont le plus souvent exprimés de manière complémentaire [14]. L'analyse de l'expression de ces molécules dans l'hippocampe et le système olfactif est particulièrement intéressante. Dans le télencéphale, *Slit2* est fortement exprimé dans le septum et le

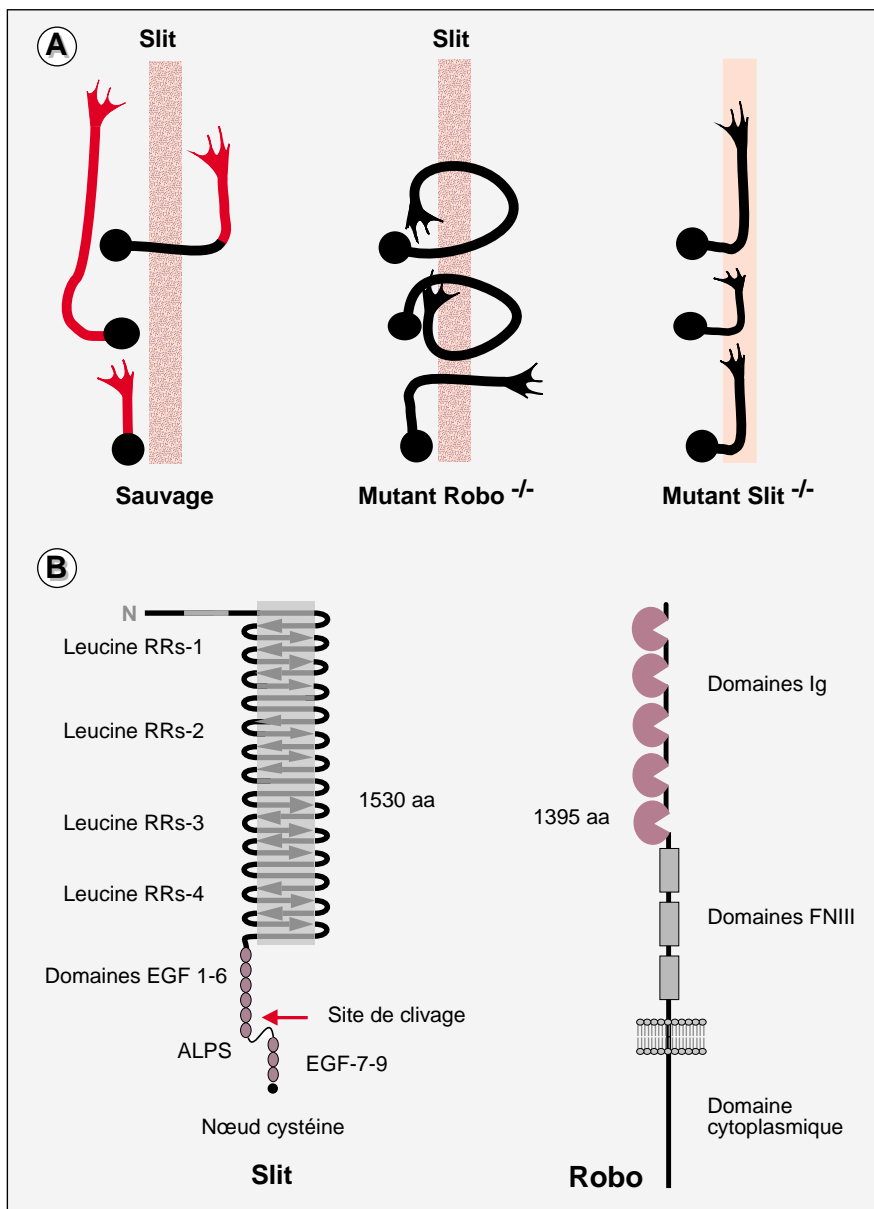


Figure 1. **Slit et Robo chez la drosophile.** **A.** Chez l'embryon de drosophile sauvage, Robo est exprimé (en rouge) sur les axones qui ne traversent pas la ligne médiane, ou sur les axones qui la traversent, mais seulement après l'avoir croisée. Chez le mutant Robo^{-/-}, tous les axones croisent la ligne médiane, souvent plusieurs fois. Slit (en bistre) est exprimé au niveau de la ligne médiane. Chez le mutant Slit^{-/-}, tous les axones poussent vers la ligne médiane et ne la quittent plus. **B.** Structures des protéines Slit et Robo.

cortex entorhinal, et son récepteur Robo dans le *gyrus dentatus* et le bulbe olfactif. La co-culture d'explants de bulbe olfactif et de *gyrus dentatus*, avec des agrégats de cellules COS exprimant la protéine Slit2 humaine, a permis de montrer que cette molécule est chimio-répulsive pour les

axones olfactifs et hippocampiques. De plus, la protéine Slit2 recombinante, fixée sur des extraits membranaires de cellules COS transfectées, entraîne la rétraction des cônes de croissance olfactifs. Slit2 pourrait donc être identique au facteur répulsif des axones du bulbe olfactif, pro-

duit par le septum, identifié il y a quelques années par Adrian Pini [3, 12] (figure 2). Ces résultats montrent que la fonction répulsive de Slit2 est conservée dans la phylogenèse, et que des neurones de diverses régions du système nerveux répondent de façon semblable à Slit2.

Un autre travail du groupe de Tessier-Lavigne montre que les protéines Slit peuvent stimuler la formation de branches axonales collatérales [15]. En effet, pendant le développement, les axones sensoriels des ganglions rachidiens présentent deux phases de croissance: pendant la première, ils se dirigent vers la moelle épinière puis bifurquent et poussent à sa surface, le long de l'axe antéro-postérieur. Ce n'est que plus tardivement que ces afférences envahissent la moelle par bourgeonnement de collatérales axonales [15]. Une protéine, stimulant la formation de branches collatérales par les axones des ganglions rachidiens, a pu être purifiée à partir d'extraits protéiques de cerveaux de veau, par des techniques biochimiques classiques. Le microséquençage de la protéine responsable de cet effet a montré qu'il s'agissait de Slit2N. Ce résultat surprenant montre que Slit2 est probablement une molécule bifonctionnelle.

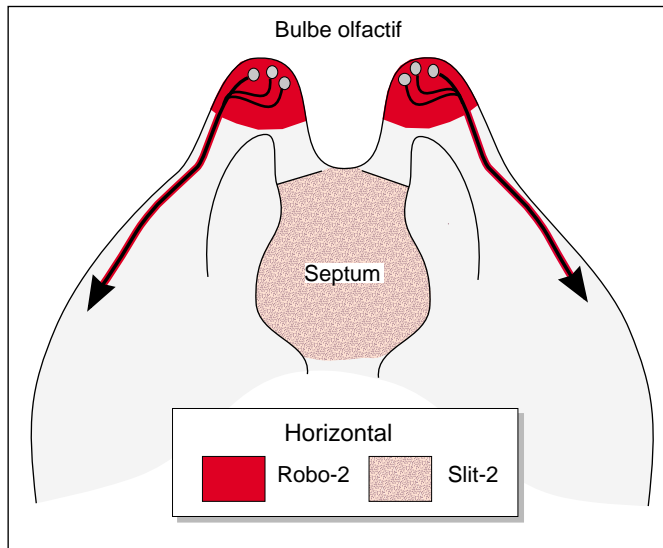
Enfin, il faut souligner que l'expression des gènes *Slit* persiste dans certains neurones du cerveau adulte [11], suggérant que la fonction de ces molécules ne se limite pas au guidage axonal.

Alain Chédotal

Inserm U. 106, CHU Pitié-Salpêtrière, Bâtiment Pédiatrie, 47, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France.

1. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996; 274: 1123-33.
2. Bloch-Gallego E, Sotelo C. Chimio-attraction ou chimio-répulsion axonale: rôle des nétrines et des sémaphorines. *Med Sci* 1998; 14: 44-52.
3. Pini A. Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system. *Science* 1993; 261: 34-98.

Figure 2. Slit2 et Robo2 chez le rat. Chez le rat de 14 jours embryonnaires, Slit2 (en bistre) est exprimée au niveau de la ligne médiane du télencéphale, par le septum, et son récepteur Robo2 (en rouge) est détecté dans les cellules mitrales du bulbe olfactif. Les axones des cellules mitrales forment le tractus olfactif latéral (TOL) qui ne traverse jamais la ligne médiane ventrale. Slit2 est répulsive pour ces axones et contribuerait à les éloigner du septum.



4. Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS. Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 1993; 10: 409-26.

5. Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, et al. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 1998; 92: 205-15.

6. Zallen JA, Yi BA, Bargmann CI. The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. elegans*. *Cell* 1998; 92: 217-27.

7. Nusslein-Volhard C, Wiechhaus E, Kluding H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux Arch Dev Biol* 1984; 193: 267-83.

8. Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S. Slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* 1990; 4: 2169-87.

9. Brose K, Bland KS, Wang KH, et al. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 1999; 96: 795-806.

10. Holmes GP, Negus K, Burridge L, et al. Distinct but overlapping expression patterns of two vertebrate Slit homologs implies functional roles in CNS development and organogenesis. *Mech Dev* 1998; 79: 57-72.

11. Itoh A, Miyabayashi T, Ohno M, Sakano S. Cloning and expression of three mammalian homologues of *Drosophila* Slit suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system. *Mol Brain Res* 1998; 62: 175-86.

12. Li HS, Chen JH, Wu W, et al. Vertebrate Slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axon. *Cell* 1999; 96: 807-18.

13. Kidd T, Bland KS, Goodman CS. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 1999; 96: 785-94.

14. Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Marillat V, et al. Slit-2 mediated repulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 1999; 22: 463-73.

15. Wang KH, Brose K, Arnott D, et al. Biochemical purification of a mammalian Slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 1999; 96: 771-84.



Enseignement organisé dans le cadre de la Faculté de Médecine Paris-Sud, et de l'Université Paris XI.

- **Début** : 3 novembre 1999
- **Enseignement de 2 ans à temps plein**, destiné aux jeunes oncologues diplômés, titulaires par ailleurs d'un DEA ou équivalent, et désireux de recevoir un enseignement de haut niveau en recherche clinique en oncologie. Ouvert aux spécialistes, Docteurs en médecine, Oncologues médicaux et pédiatres, Chirurgiens, Radiothérapeutes, Radiologues, Pathologistes, Biologistes, Statisticiens, etc., et aux Docteurs en Pharmacie.
- **De toutes nationalités**, mais une très bonne connaissance du français et de l'anglais est indispensable. Cours en Français, certains exposés et mémoires pourront être présentés en Anglais.
- **Une formation approfondie** dans le domaine de la recherche clinique en oncologie est offerte, comportant un enseignement théorique, et des stages cliniques ou de laboratoire.
- > **Fonctions effectives avec responsabilités pendant 2 ans à plein temps**, dans sa spécialité d'origine, et 6 mois au minimum dans une autre, à l'institut Gustave-ROUSSY. Option : 1 année sur les 2 consacrée à un travail personnel dans un laboratoire de recherche de l'IGR.
- > **Enseignement théorique, obligatoire et commun à tous, de 340 heures en 2 ans. Il comporte : 8 modules de 5 jours** (cours, discussions de dossiers, de documents ou de techniques, avec forte participation des élèves), les uns généraux, les autres spécialisés : 1 enseignement de statistiques, épidémiologie et santé publique réparti sur les 2 ans ; 1 séminaire de 2 à 3 h tous les 15 jours sur un sujet limité.
- > **Travail personnel de recherche clinique ou biologique** aboutissant en 2 ans à la rédaction et la soutenance de 1 ou 2 mémoires.
- > **Formation individualisée**, reposant sur un encadrement très proche : tuteur, directeur de stage et de mémoire.
- **L'attribution du Diplôme** fait suite à une évaluation finale portant sur les notes des examens suivant chaque module, l'évaluation des mémoires, l'avis du « tuteur » de chaque étudiant et celui des responsables de ses stages.
- **Les promotions sont limitées à 15 élèves chaque année.**
- **Les candidats pourront éventuellement bénéficier d'une bourse ou d'un salaire** de 2000 Euros par mois pour leur première année (# 2350 \$ US). Ils sont invités à se procurer une bourse pour la 2^e année.

Renseignements et dossier de candidature à demander à Mme Anne-Marie RIVIÈRE par courrier ou E-mail : arivière@igr.fr.
Candidatures par écrit avant le 1^{er} avril 1999, adressées au Professeur Jean LEMERLE, Directeur du D.U.E.R.C.C. (E-mail : lemerle@igr.fr.)
ou au Professeur Martin SCHLUMBERGER, Directeur des Études
(E-mail : schlumbg@igr.fr) - INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY, 94805 VILLEJUIF (France)