

Université de Montréal

*Étude de la signalisation Sonic Hedgehog dans le
guidage des axones de la rétine lors de
l'établissement de la vision binoculaire*

par

Pierre Fabre

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de docteur
en biologie moléculaire

Juillet 2011

© Pierre Fabre, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

***Étude de la signalisation Sonic Hedgehog dans le
guidage des axones de la rétine lors de
l'établissement de la vision binoculaire***

Présentée par :
Pierre Fabre

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Doucet, président-rapporteur
Dr Frédéric Charron, directeur de recherche
Dr Michel Cayouette, membre du jury
Dr Jean-François Cloutier, examinateur externe
Dre Adriana Di Polo, représentante du doyen de la FES

Résumé

Chez les animaux à vision binoculaire, la vision tridimensionnelle permet la perception de la profondeur grâce à l'intégration de l'information visuelle en provenance des deux yeux. La première étape de cette intégration est rendue possible anatomiquement par la ségrégation des axones contralatéraux et ipsilatéraux des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) au niveau du chiasma optique. Les axones contralatéraux croisent la ligne médiane au chiasma en route du nerf optique vers le cerveau. À l'inverse, les axones ipsilatéraux s'écartent du chiasma et continuent dans le tractus optique ipsilatéral, en évitant la ligne médiane vers leurs cibles cérébrales. Les mécanismes moléculaires à la base de ce phénomène ne sont pas complètement compris. Les études présentées dans cette thèse montrent que *Boc*, le récepteur de Sonic Hedgehog (Shh) dans le guidage axonal, est enrichi dans les CGRs ipsilatérales de la rétine en développement. La présence de Shh sur la ligne médiane, et le mode d'expression complémentaire du récepteur nous ont conduit à émettre l'hypothèse que Shh pourrait repousser les axones ipsilatéraux au niveau du chiasma en activant le récepteur *Boc*. Conformément à cette hypothèse, nous avons constaté que seulement les CGR exprimant *Boc* se rétractent *in vitro* en réponse à Shh et que cette réponse est perdue dans les CGR mutantes pour *Boc*. *In vivo*, nous démontrons que *Boc* est requis pour la ségrégation normale des axones ipsilatéraux au niveau du chiasma optique et, inversement, que l'expression ectopique de *Boc* dans les CGR contralatérales empêche leurs axones de traverser le chiasma optique. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que Shh repousse les axones ipsilatéraux au niveau du chiasma optique

par son récepteur Boc. Cette première partie de notre travail identifie un nouveau couple ligand-récepteur requis pour la ségrégation des axones au niveau du chiasma optique.

Une interaction moléculaire impliquée dans cette ségrégation implique l'éphrine-B2 et ses récepteurs EphB (EphB1). Dans la deuxième partie de notre travail, nous montrons, *in vivo*, en utilisant des souris doubles et quadruples mutantes pour les récepteurs Boc, EphB1 ou les trois récepteurs EphB, que l'abrogation des deux voies de signalisation Shh et éphrine-B2 conduit à l'absence de projections ipsilatérales. Ceci indique que les deux signalisations agissent de façon indépendante dans des voies parallèles. De manière intéressante, ces souris mutantes ont été utilisées comme modèle génétique pour démontrer des défauts dans la perception de la profondeur de champs chez des animaux dépourvus de projections visuelles ipsilatérales. Ainsi, les travaux présentés dans cette thèse démontrent pour la première fois que la formation des projections rétiniennes ipsilatérales est essentielle à l'établissement de la vision binoculaire et dépend des voies induites par les récepteurs d'éphrine-B2 et Shh.

Mots-clés : Guidage axonal, chiasma optique, Shh, Boc, Éphrines, vision binoculaire

Abstract

In animals with binocular vision, three dimensional vision allows perception of depth through the integration of visual information from both eyes. The first step of this integration is possible anatomically with the segregation of contralateral and ipsilateral axons at the optic chiasm. Contralateral axons cross the chiasm midline as they progress from the optic nerve to the optic tract. In contrast, ipsilateral axons deviate from the chiasm and continue in the ipsilateral optic tract. The molecular mechanism underlying this phenomenon is not completely understood. The studies presented in this thesis show that the Sonic Hedgehog (Shh) receptor Boc is enriched in ipsilateral RGCs of the developing retina. Together with the presence of Shh at the midline, this complementary expression pattern led us to hypothesize that Shh might repel ipsilateral RGC axons at the chiasm. Consistent with this hypothesis, we found that only Boc positive RGC axons retract *in vitro* in response to Shh and that this response is lost in Boc mutant RGCs. *In vivo*, we show that Boc is required for the normal segregation of ipsilateral axons at the optic chiasm and, conversely, that Boc expression in contralateral RGCs prevents their axons from crossing the optic chiasm. Taken together, these results suggest that Shh repels ipsilateral RGC axons at the optic chiasm via its receptor Boc. This first part of this thesis identifies a novel receptor required for the segregation of axons at the optic chiasm.

The other couple ligand-receptor involved in this segregation is the Ephrin-B2/EphB signalling. In the second part of this thesis, I show that *in vivo*, the abrogation of both signalling pathways using quadruple knockout mice of the receptor Boc and three EphB receptors led to the absence of ipsilateral projections, indicating that Shh and

ephrinB2 signalling act independently in two parallel pathways. More importantly, these animals, used as a new genetic model to perform visual tests, had a diminished ability to perceive depth. Thus, this thesis demonstrates for the first time that the establishment of ipsilateral retinal projections, essential for accurate binocular vision and perception of depth, is made possible by the combination of EphB and Shh signalling.

Keywords : Axon guidance, Optic chiasm, Sonic hedgehog, Boc, Ephrins, Binocular vision

Table des matières

Liste des figures.....	x
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xv
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
Préambule.....	2
1. Développement du système nerveux	3
1.1 Développement embryonnaire et mise en place des structures neurales.....	3
1.2 Shh, un morphogène pour guider la différenciation des progéniteurs neuraux	6
2. La navigation de l'axone en développement	11
2.1 Le guidage axonal.....	11
2.2 Le cône de croissance.....	12
2.3 Les grandes classes de molécules de signalisation.....	18
2.4 Les morphogènes, une nouvelle classe de molécule de signalisation	26
3. Le développement du système visuel	34
3.1 La rétine.....	34
3.2 Le chiasma optique.....	36
3.3 Les cibles cérébrales des afférences rétiniennes.....	37
3.4 Le guidage axonal des CGR.....	39
3.4.1 L'émergence de l'axone de CGR, un processus orienté.....	39
3.4.2 Le guidage intra-rétinien	40
3.4.3 Le guidage au niveau du chiasma optique.....	42
3.5. L'établissement de la vision binoculaire	50
OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	53
CHAPITRE II: ARTICLE "SEGREGATION OF IPSILATERAL RETINAL GANGLION CELL AXONS AT THE OPTIC CHIASM REQUIRES THE SHH RECEPTOR BOC" ..	54
Contributions des auteurs	55
ACKNOWLEDGEMENTS	57
ABSTRACT	58
INTRODUCTION.....	59
MATERIALS AND METHODS	61

RESULTS.....	66
REFERENCES.....	88
SUPPLEMENTAL FIGURES.....	93
CHAPITRE III: ARTICLE “BINOCULAR VISION REQUIRES SEGREGATION OF IPSI LATERAL RETINAL GANGLION CELL AXONS AT THE OPTIC CHIASM”.....	96
ABSTRACT.....	99
INTRODUCTION.....	100
RESULTS.....	103
DISCUSSION.....	114
METHODS.....	119
ACKNOWLEDGEMENTS.....	124
REFERENCES.....	125
SUPPLEMENTAL FIGURES.....	127
CHAPITRE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	128
1. Boc et Shh, un couple de guidage ambivalent.....	129
2. Rôle d’un système à molécules de guidage multiples.....	132
3. Devenir des CGR ipsilatérales dans nos modèles : une reconversion contralatérale ?	133
4. La régulation de la variabilité des comportements des axones à choix binaire par la signalisation EphB, un phénomène dépendant du contexte.....	135
5. Vision binoculaire : le rôle fondamental du chiasma et des projections ipsilatérales	136
6. Molécules de guidage axonal ou molécules à usages multiples.....	140
7. Pertinence vis-à-vis des processus pathologiques.....	143
BIBLIOGRAPHIE.....	150
ANNEXE 1: Revue publiée dans Médecine / Sciences – Sonic hedgehog et Boc, une histoire de guidage axonale très attirante.....	164
ANNEXE 2: Article publié dans Neuron - VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1.....	168
Contribution des auteurs.....	169

ANNEXE 3: Revue publiée dans Médecine / Sciences - VEGF, un facteur responsable de la formation des vaisseaux sanguins au service de la connectique neuronale..... 182

Liste des figures

CHAPITRE I

Figure 1. 1. La neurulation.	5
Figure 1. 2. Fonction morphogénique de Shh dans la moelle épinière.	8
Figure 1. 3. Mécanismes de guidage axonal.	13
Figure 1. 4. Étapes moléculaire de la polymérisation d'actine.	16
Figure 1. 5. Structure du cône de croissance.	17
Figure 1. 6. Liste des principaux couples de ligands-récepteurs des voies classiques et morphogènes impliqués dans le guidage axonal.	20
Figure 1. 7. Les éphrines et les cartes rétinotopiques.	23
Figure 1. 8. Étapes du guidage des neurones commissuraux par Shh.	33
Figure 1. 9. Les cellules ganglionnaires de la rétine.	41
Figure 1. 10. Le guidage des axones de CGR au niveau du chiasma optique.	44
Figure 1. 11. Fibres ipsilatérales et chevauchement des champs visuels.	52

CHAPITRE II

Figure 2. 1. Shh specifically regulates axon and growth cone dynamics of Boc-expressing RGCs.	68
Figure 2. 2. Shh induces the rapid retraction of a subset of RGC axons.	69
Figure 2. 3. Shh specifically regulates axon and growth cone dynamics of Boc-expressing RGCs.	71
Figure 2. 4. Boc mutant mice have normal retinal cell fate.	75
Figure 2. 5. Normal segregation of ipsilateral axons at the optic chiasm requires Boc.	77
Figure 2. 6. Ectopic Boc expression in contralateral RGCs prevents their axons from crossing the optic chiasm.	79
Figure 2. 7. Summary of the Boc gain and loss of function phenotypes at the chiasm.	81
Figure 2. 8S. Cdon is evenly distributed in the developing retina.	93

Figure 2. 9S. Boc and EphB1 colocalize in RGC axons.	93
Figure 2. 10S. Characterisation of the axons growing out of retinal explants.....	94
Figure 2. 11S. ShhN induces dose dependant RGC axons retraction.....	95
Figure 2. 12S. Quantification of the collapse response shown in Fig. 3C-D.....	95

CHAPITRE III

Figure 3. 1. EphB1 and Boc are expressed in the same population of RGCs.	103
Figure 3. 2. Loss of ipsilateral projection in the <i>Boc;EphB</i> mutant mouse.....	107
Figure 3. 3. The visual cliff test analysis reveals the poor visual performance of <i>Boc</i>^{-/-}; <i>EphB1</i>^{-/-} and <i>Boc</i>^{-/-};<i>EphB1</i>^{-/-};<i>EphB2</i>^{-/-};<i>EphB3</i>^{-/-} mouse mutants.	111
Figure 3. 4S. Boc is not required for ephrin-B2 induced growth cone collapse.	127
Figure 3. 5S. Ectopic expression of a combination of Boc and EphB1 does not augment significantly the percentage of ipsilateral RGC axons.	127

CHAPITRE IV : DISCUSSION

Figure 4. 1. Illustrations des champs binoculaires de différentes espèces d'oiseaux.	140
Figure 4. 2. Les molécules de guidage axonal au service de nombreuses fonctions neuronaux et non neuronaux.	142

Liste des abréviations

AMPC	Adenosine monophosphate cyclique
BLBP	Brain lipid binding protein (protéine de liaison des lipides cérébraux)
BMP	Bone morphogenic protein (protéine morphogénique des os)
BOC	Brother of CDO (homologue de CDO)
CD44	Cluster of differentiation 44 (protéine de différentiation 44)
CDO	CAM-related down-regulated by oncogenes
CGL	Corps géniculé (ou genouillé) latéral
CGR	Cellules ganglionnaires de la rétine
DCC	Deleted in colorectal cancer (absent dans le cancer colorectal)
COS	Cellule d'origine CV-1, et porteuse de SV40
DiI	Perchlorate de dioctadecyl tetramethylindocarbocyanine
Domaines C, P et T	Domaines central, périphérique et transitionnel
EX	Jour embryonnaire X. X étant un chiffre.
EGF	Epidermal growth factor (facteur de croissance épidermique)
FYN	Feline yes related protein (protéine féline similaire à yes)
Frz	Frizzled
GDP	Guanine diphosphate
GFP	Green Fluorescent Protein (protéine fluorescente verte)
GLI	Glioma associated oncogene (oncogène associé au gliome)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTPases	Guanine triphosphatases

MN	Motoneurones
RC2	Radial glial Cell marker 2 (marqueur de cellule de la glie radiaire)
RE	Réticulum endoplasmique
RYK	Récepteur à tyrosine kinase
SANT	Smo antagonist (antagoniste de Smo)
Sema	Sémaphorine
SFK	Src family kinases (kinases de la famille Src)
Shh	Sonic Hedgehog (hérisson sonique)
ShhN	Partie N-terminale de Shh
Src	Rous sarcoma oncogene (oncogène du sarcome de Rous)
SSEA	Stage-specific embryonic antigen (antigène spécifique de stade embryonnaire)
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta (facteur de croissance de transformation)
VT	Quadrant ventro-temporal (de la rétine)
VTC	Croissant du VT
V1	Cortex visuel primaire
V2	Cortex visuel secondaire
WNT	Wingless integration site

*À mes Mamies, Odette Lemaire et Marcelle
Fabre*

À Marianne

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier celui qui a su voir en moi un futur docteur, mon directeur Frédéric Charron, et qui a tout fait pour que cela se réalise. Merci de m'avoir inculqué la persévérance, le souci du détail, et puis le plus beau, la passion pour la biologie! Pour m'avoir fait voyager à travers les neurones, à travers les gènes, et parfois même à travers le globe. Merci Fred pour ces 6 années de découvertes et d'aventures!

Steves Morin, pluriel et singulier, l'ambiance et l'endurance, je te remercie pour ton soutien depuis le premier jour. Pour tes encouragements, tes conseils avisés et ton instinct, je te suis redevable de plus d'une.

Merci à l'irremplaçable Julie Cardin! Au delà de ton soutien considérable dans mes projets, je n'ai jamais pu perdre le moral grâce à tes encouragements et tes sourires. Merci Ju!! Je remercie également Jessica Barthe pour sa grande organisation et pour avoir su prendre grand soin des centaines (milliers?) de souris sans lesquelles cette étude n'aurait pu voir le jour.

A tous les membres successifs du labo Charron, j'exprime toute ma gratitude. Martin merci pour ton immense patience et ton expertise cérébrale. Luisa que serai-je devenu sans ton extrême gentillesse et tes pâtisseries exquis. A Monique, Jess et Doum, Sébas, Todd, Fred Mille, Tyler, Léa, Jimmy, Wei-Ju, Nick, Karen, Typhaine, Emilie...Grazie mille!

Je tiens à souligner le très grand plaisir que j'ai eu de côtoyer et de travailler avec les deux excellents labos des Drs Kania et Cayouette. A mes presque co-directeur, Artur et Michel, un très grand merci pour avoir eu l'œil aiguisé sur chacune des mes diapos lors de ces nombreux club Neuro! A Christine, Dayana, Tzu-Jen, Nora, Amel, Pierre, LP, Francisco, Wendy, Marie-Claude, Chris, Jane...Merci! Et un merci spécial à Vas et Elena pour leur support très souvent apprécié, sans oublier tous les membres de l'association étudiante de l'IRCM avec qui j'ai partagé de si bons moments.

A tous ceux des labos satellites (DevBS) qui ont su m'éclairer à travers leurs discussions et leur aide. Et bien sur aux experts des plateformes et des services si précieux de l'IRCM, en particulier Dominic Fillion à la microscopie, et Nicole et Claudia à la

bibliothèque, je vous suis très reconnaissant. Un grand merci également à Anne Haché, Johanne Langevin, Virginie Leduc et Vivianne Jodoin pour toute l'aide administrative et logistique tout au long de ce doctorat.

Cette thèse a été le fruit de nombreuses collaborations. Je remercie donc tous mes partenaires scientifiques à plus ou moins longue distance: Tomomi Shimogori, Ed Ruthazer, Eric Beaumont, Christian Casanova, Matthieu Vanni, Reza Abbas Farishta, Carmen Ruiz de Almodovar et Peter Carmeliet.

Enfin un gros merci aux membres du comité de thèse. Les Drs Jean François Coté, Jean Vacher, Artur Kania et Don van Meyel qui m'ont suivi régulièrement tout au long du doctorat, et les membres du jury de cette thèse : les Drs Guy Doucet, Michel Cayouette, Jean-François Cloutier et Adrianna Di Polo. Merci pour votre intérêt et pour les nombreux conseils apportés pour l'amélioration de mon mémoire.

A celle sans qui je n'aurai jamais fait de thèse dans ce merveilleux pays. Celle avec qui j'ai pu faire d'Endnote un jeu et décupler les références. Celle qui remontait mon moral dans les creux et me félicitait sans relâche dans les sommets. A ma femme Jan je voudrais dire qu'il n'y aura jamais assez de mercis pour elle qui m'a soutenu jours et nuits pendant ces six années, et qui a su mettre de la flamme chaque matin pour que ce soit réellement six années remplies de bonheur et d'aventures! Merci du fond du cœur!

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Préambule

La connexion d'un organe sensoriel au cerveau est une des composantes majeures de l'établissement des sens. En effet, le cerveau a besoin de recueillir les informations périphériques pour pouvoir apprécier son environnement. Une fois ces informations collectées, il doit procéder à leur intégration et leur interprétation. Cela est rendu possible par l'organisation complexe du système nerveux. Cette organisation complexe est le fruit d'une multitude d'étapes simples et séquentielles. Dans les pages qui suivent, nous mettrons l'accent sur la formation des connexions visuelles, en nous efforçant de décrire les mécanismes moléculaires régissant le câblage du système nerveux en développement. Ainsi, c'est en étudiant les composantes d'une voie moléculaire pléiotropique, la voie Sonic Hedgehog (Shh), qu'ont été découverts les aspects mécanistiques sous-jacents à l'intégration cérébrale d'une fonction sensorielle des plus abouties : la vision binoculaire.

1. Développement du système nerveux

1.1 Développement embryonnaire et mise en place des structures neurales.

Le développement du système nerveux est un processus hautement régulé qui commence dès les premiers jours embryonnaires et se poursuit jusqu'à l'âge adulte. Une fois le tissu nerveux individualisé, les progéniteurs neuronaux vont successivement se multiplier, migrer dans leur position finale, opérer leur différenciation terminale, procéder à leur câblage en se connectant avec leurs cibles pour enfin développer une activité synaptique fonctionnelle. Dans les paragraphes qui suivent nous allons décrire brièvement ces différentes étapes.

1.1.1 La neurulation, première étape de la morphogenèse neurale

Chez les chordés, incluant les mammifères, le système nerveux se distingue à partir de la neurulation (Kandel, Schwartz, & Jessell, 2000). Celle-ci débute par la formation de la plaque neurale, à partir du neuroectoderme, dans la partie dorsale de l'embryon. Ensuite, selon l'axe rostro-caudal de la ligne primitive, les cellules de cette plaque neurale naissante, d'abord cuboïdes, vont prendre la forme de colonne, produisant une invagination de ce tissu (Figure 1.1). Il se transforme ainsi en gouttière neurale, délimitée sur les bords par les bourrelets neuraux. Les bourrelets sont à l'origine des cellules des crêtes neurales, tandis que la gouttière continue de s'invaginer jusqu'à la formation du tube neural qui se détache alors du feuillet ectodermique sus-jacent. Ainsi, ce processus, qui se

déroule selon un axe médian antéro-postérieur, participe à la mise en place de la symétrie du système nerveux.

A l'origine de la mise en place de l'axe dorso-ventral du tube neural, et au centre de cette symétrie, se trouve la notochorde. Celle-ci, sous la forme d'un long câble longitudinal et cartilagineux, est sous-jacente au tube neural dont elle va assurer la régulation du devenir des progéniteurs neuraux. Pour ce faire, la notochorde sécrète la protéine Sonic Hedgehog (Shh), un facteur diffusible qui est capté par la plaque basale du tube neural. De cette manière, Shh contrôle dans les cellules les plus ventrales du tube l'induction de plusieurs facteurs dont la Nétrine mais aussi Shh lui-même. Ainsi, ce facteur sécrété, qui est exprimée essentiellement par la ligne médiane au cours du développement, jouera un rôle prépondérant dans l'établissement de la symétrie du corps de l'animal.

Cette symétrie axiale rostro-caudale est à l'origine d'un véritable dédoublement du corps, et dans le système nerveux, cela a pour effet de multiplier par deux les organes sensoriels comme les oreilles et les yeux. Ainsi, lorsque le gène codant pour Shh est absent ou muté, cela conduit à la perte de cette symétrie lors des étapes ultérieures du développement du système nerveux. Cela a donc de graves effets que l'on peut identifier facilement puisque l'embryon *Shh*^{-/-} devient cyclope (Chiang, et al., 1996).

1.1.2 Segmentation des vésicules neurales :

Le tube neural céphalique est à l'origine du cerveau, tandis que le tube neural médullaire donne naissance à la moelle épinière. La formation du cerveau se fait par étape (Kandel, et al., 2000).

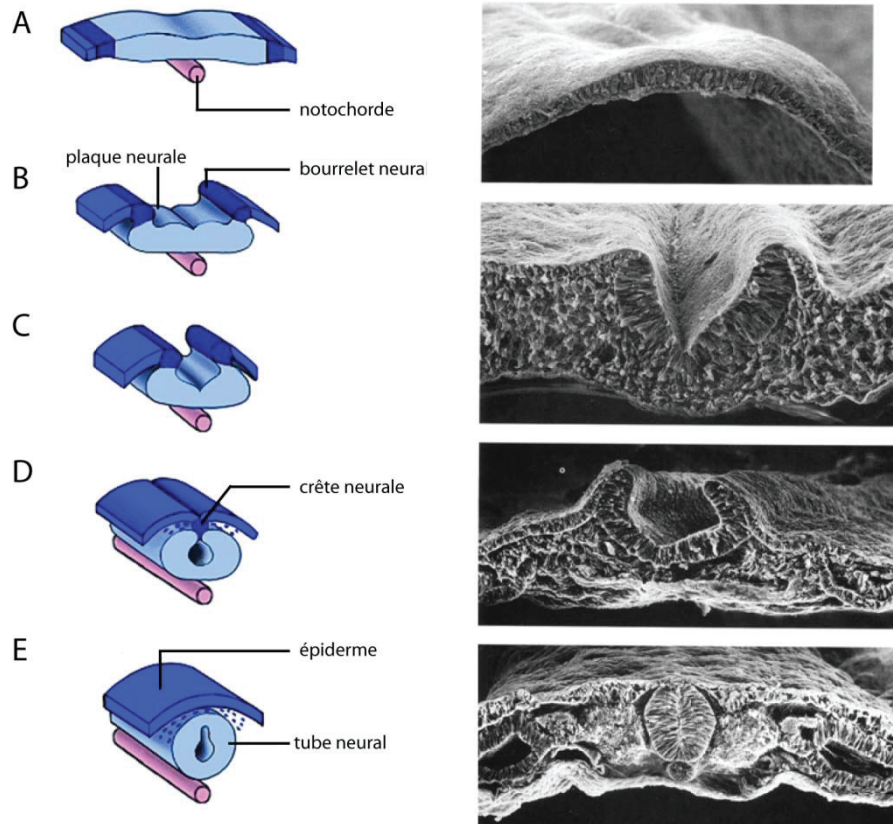


Figure 1. 1. La neurulation.

A. Stade de la plaque neurale, feuillet du neuroectoderme. B. Plissement au niveau de la ligne médiane de la plaque neurale par-dessus la notochorde pour former les bourrelets neuraux. C. Les bourrelets neuraux convergent pour fusionner, formant la gouttière neurale. Le tube neural fusionné (D) se dissocie de l'ectoderme sus-jacent (E). Les schémas sont une gracieuseté de Patricia Phelps, UCLA. Les photographies sont une gracieuseté de Kathryn Tosney, University of Miami (tirées de Gilbert, *Developmental Biology*, 8ème Edition, 2003, p376.)

D'abord, le tube neural se segmente en trois parties. Le prosencéphale, le plus rostral, à partir duquel s'individualise les vésicules optiques. Le mésencéphale, qui donne entre autres les collicules. Et, enfin, caudalement, le rhombencéphale duquel sont issus le cervelet et les structures du pont et du bulbe.

1.2 Shh, un morphogène pour guider la différenciation des progéniteurs neuraux

Un morphogène est classiquement défini comme une molécule de signalisation qui déclenche différentes réponses cellulaires en fonction de sa concentration (Wolpert, 1996). Ainsi, les morphogènes sont généralement des molécules sécrétées qui conduisent à l'organisation spatiale de groupes de cellules. En fonction de la distance par rapport à la source qui sécrète le morphogène, les cellules cibles 'liront' un signal différent. Par exemple, l'acide rétinoïque, en se liant à ses différents récepteurs nucléaires, va permettre d'activer les séquences régulatrices du gène *hoxb4* (Gould, Itasaki, & Krumlauf, 1998). Lors du développement du rhombencéphale, l'acide rétinoïque diffuse et va produire un gradient d'expression de *hoxb4*. La capacité d'un progéniteur à se différencier en un type cellulaire particulier dépend donc de la concentration absolue du morphogène. On connaît aujourd'hui de nombreux morphogènes qui régulent différents programmes de formation des tissus et des organes. Les principaux sont les membres de la superfamille TGF-beta, les Wnts, et Shh (Ashe & Briscoe, 2006).

1.2.1 Shh, un morphogène

Hedgehog (*Hh*) fut découvert en 1980 chez la drosophile, en raison de son rôle dans la morphogenèse de la larve (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Chez la drosophile, il n'existe qu'un seul gène (*Hh*). Chez les mammifères, on retrouve 3 orthologues de *Hh* qui ont été nommés : *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) et *Desert hedgehog* (*Dhh*).

Dans le système nerveux, seul *Shh* est exprimé. Des études *in vivo* de gain et de perte de fonction ont démontré que *Shh* est nécessaire et suffisant pour induire les cellules de la plaque basale, ainsi que tous les progéniteurs des domaines ventraux de la moelle épinière (Figure 1.2.) (Briscoe & Ericson, 2001; Ericson, Muhr, Jessell, & Edlund, 1995; Ericson, et al., 1997; Roelink, et al., 1994). Pour le démontrer, des explants de tube neural de poulet ont été traités avec différentes concentrations de *Shh*. En absence de *Shh*, aucun type cellulaire de la moelle ventrale n'était spécifié. A l'inverse, en présence de très hautes concentrations de *Shh*, les explants commencent à exprimer HNF3-beta, un marqueur des cellules de la plaque basale. Enfin, à des concentrations moindres, les progéniteurs se différencient en motoneurones et, à des concentrations encore plus basses, en interneurones de type V1 et V2 (Figure 1.2.) (Ericson, et al., 1997). Dans leur ensemble, ces données ont permis de mettre à jour le rôle morphogénique de *Shh*. Un autre aspect, crucial pour exercer cet effet, est son mode de sécrétion et de diffusion.

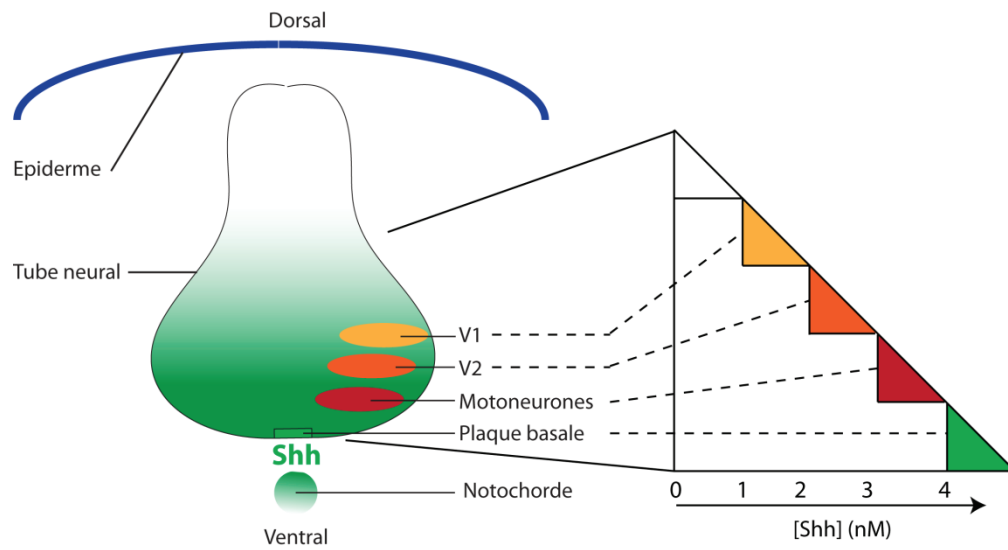


Figure 1. 2. Fonction morphogénique de Shh dans la moelle épinière.

À gauche, une coupe transverse de moelle épinière en développement sur laquelle est représentée l'expression de Shh (en vert) par la notochorde et la plaque basale. On note l'établissement d'un gradient ventro-dorsal de Shh. Celui-ci est responsable de la différenciation des motoneurones (rouge) et des interneurones de type V1 (orange foncé) et V2 (orange clair). A droite est présenté un schéma illustrant la correspondance entre la localisation dans la moelle épinière ventrale et les doses de Shh perçues par les différents progéniteurs. (Adapté d'après (Jessell, 2000))

1.2.2 Structure et diffusion de Shh

Shh code pour une protéine sécrétée qui est produite sous la forme d'un précurseur protéique de 45KDa. Cette forme subit ensuite une autoprotéolyse catalysée par la partie C-terminale pour générer deux peptides, N-terminal (19KDa) et C-terminal (25KDa) (Bumcrot, Takada, & McMahon, 1995). A ce jour, toutes les activités décrites de Shh sont attribuées au fragment N-terminal. Celui-ci est subséquemment modifié par clivage, puis par l'ajout de groupements cholestérol et palmityl dans le réticulum endoplasmique (Jeong & McMahon, 2002; Pepinsky, et al., 1998; Porter, Ekker, et al., 1996; Porter, Young, & Beachy, 1996). Ces modifications lui confèrent des propriétés à la fois hydrophiles, par son domaine protéique, et hydrophobes par ses groupements palmityl et cholestérol. Ces modifications lipidiques sont nécessaires pour sa multimérisation, son ancrage aux membranes cellulaires, et sa localisation dans les radeaux lipidiques. Elles peuvent ainsi influencer la portée de diffusion de Shh et l'efficacité de la réception du signal (Grover, Valadez, Bowman, & Cooper, 2011; Lewis, et al., 2001; Li, Zhang, Litingtung, & Chiang, 2006; Porter, Young, et al., 1996). De telles modifications d'un morphogène sont également observées pour les ligands de la famille Wnt (Willert, et al., 2003).

1.2.3 La ventralisation du système nerveux

Shh induit différentes classes de neurones dans le tube ventral et contrôle le développement des ganglions de la base (Hynes et al., 1995 ; Chiang et al., 1996; Ye et al., 1998). En effet, des expériences ont démontré qu'un traitement avec un anticorps anti-Shh (5E1) bloquant son action sur des explants de tube neural diencéphalique empêchait l'apparition des neurones dopaminergiques (Ye et al., 1998). De plus, chez des souris

chimériques comprenant un mélange de cellules KO pour Smoothened (*Smo*^{-/-}) et de type sauvage, les cellules *Smo*^{-/-} ne se différenciaient pas en cellules de plaque basale, ni en progéniteurs de type V1, V2 ou en motoneurones, indiquant qu'une signalisation Shh est directement nécessaire dans les cellules ventrales pour la spécification de tous les progéniteurs ventraux de la moelle épinière (Wijgerde, McMahon, Rule, & McMahon, 2002). Cela donne une preuve que Shh agit comme un facteur de ventralisation de la moelle épinière. Toutefois, l'action de Shh ne s'arrête pas là. En effet, la présence de Shh est aussi décisive dans la ventralisation du cerveau embryonnaire rostral. Ainsi, dans les vésicules télencéphaliques, qui occupent la partie la plus rostrale du tube neural, la surexpression de *Shh* ou de *Smo*, ou l'incubation d'explants en présence de Shh ont montré que la voie Shh est responsable de la différenciation des progéniteurs issus des éminences ganglionnaires médiales et latérales. Une fois différenciés, ces progéniteurs migrent et forment diverses populations d'interneurones peuplant les hémisphères cérébraux. Finalement, Shh s'est avéré un facteur clef pour la ventralisation dans l'œil à des stades très précoces (Lupo, et al., 2005). En effet, la spécification ventrale des structures de l'œil est perturbée chez le poisson-zèbre dont le gène *Smo* est muté. C'est également le cas chez des souris mutantes pour *Shh*, dans lesquelles la formation de la vésicule optique est fortement affectée (Chiang, et al., 1996; Mui, Kim, Lemke, & Bertuzzi, 2005). Une fois produits en nombres suffisants et différenciés, les neurones émettent leurs projections axonales pour se connecter avec leurs cibles.

2. La navigation de l'axone en développement

2.1 Le guidage axonal

Le guidage axonal est un processus qui permet à un neurone nouvellement produit d'envoyer son axone vers sa cible. Celle-ci peut-être un autre neurone, une cellule musculaire ou même une cellule endocrine (hypophyse). L'axone, lors de sa pousse, qui peut s'allonger sur quelques micromètres jusqu'à plusieurs mètres (ex : baleine bleue (Smith, 2009)), va devoir suivre une trajectoire bien précise. Pour cela, la structure terminale lors de son élongation, le cône de croissance, va lui permettre d'intégrer des signaux de natures attractives et répulsives. Ces signaux peuvent être solubles et diffusibles, ou bien fixes. Santiago Ramon y Cajal émit très tôt l'hypothèse neurotrophique selon laquelle les axones sont guidés par leur cibles au moyen d'un stimulus neurotrophique orienté, à la manière du processus chimiotactique, décrit peu avant par Buchner et Metchnikoff (Ramon y Cajal, 1893). Un peu plus tard, Paul Weiss émettra une théorie soutenant le guidage de contact, selon laquelle les neurones poussent en s'attachant à un substrat. Les premières preuves fonctionnelles de tels processus ont été obtenues *in vitro* au début des années 80 (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). Ainsi, Lumsden et Davies (1983, 1986) ont disséqué des explants de ganglions de Gasser contenant des neurones sensoriels de souris embryonnaires, et ce avant que leurs axones aient atteint leurs tissus cibles, les vibrisses. Lorsque ces ganglions étaient placés en explants dans le milieu de culture à proximité d'une variété de tissus cibles potentiels (bourgeon de membres antérieurs ou territoire des vibrisses), les axones neuronaux trijumeaux s'étendaient uniquement vers le tissu des vibrisses. Ainsi, ces observations permirent de mettre en

évidence la sécrétion de substances chimiotactiques, spécifiquement produites par l'épithélium de la base des vibrisses (Lumsden & Davies, 1983). Toutefois, ce n'est qu'après la découverte et l'isolation d'un premier facteur de guidage chimioattractif, la nétrine (du sanscrit « celui qui guide »), que le domaine d'étude du guidage moléculaire des axones a réellement pris son essor (Kennedy, Serafini, de la Torre, & Tessier-Lavigne, 1994; Serafini, et al., 1994). Ce facteur fut identifié en établissant un essai de guidage *in vitro* similaire à celui décrit par Lumsden et Davies. Des explants de moelle épinière dorsale furent placés aux abords d'explants de plaque basale, ce qui permit d'observer dans ce cas une croissance préférentielle des axones issus des explants de moelle dorsale en direction des explants de plaque basale (Tessier-Lavigne, Placzek, Lumsden, Dodd, & Jessell, 1988). Actuellement, on distingue quatre types de signaux impliqués dans le guidage axonal (Figure 1.3), le guidage par contact, qui peut être attractif (comme la laminine) ou répulsif (comme la ténascine), et le guidage par chimiotactisme de longue portée, attractif ou répulsif. Pour que ces signaux soient détectés, le neurone a besoin de l'extrémité distale de l'axone, le cône de croissance, au niveau duquel des récepteurs de guidage peuvent transmettre ces signaux à des effecteurs intracellulaires qui entraînent des remaniements de son cytosquelette pour le réorienter.

2.2 Le cône de croissance

Le cône de croissance est une structure du neurone en développement qui a été décrite il y a plus d'un siècle par Ramon y Cajal (Ramon y Cajal, 1893). Situé à l'extrémité de l'axone, c'est à ce niveau que la signalisation induit l'activation des effecteurs des remaniements directionnels. Ainsi, on retrouve à la surface membranaire de celui-ci les

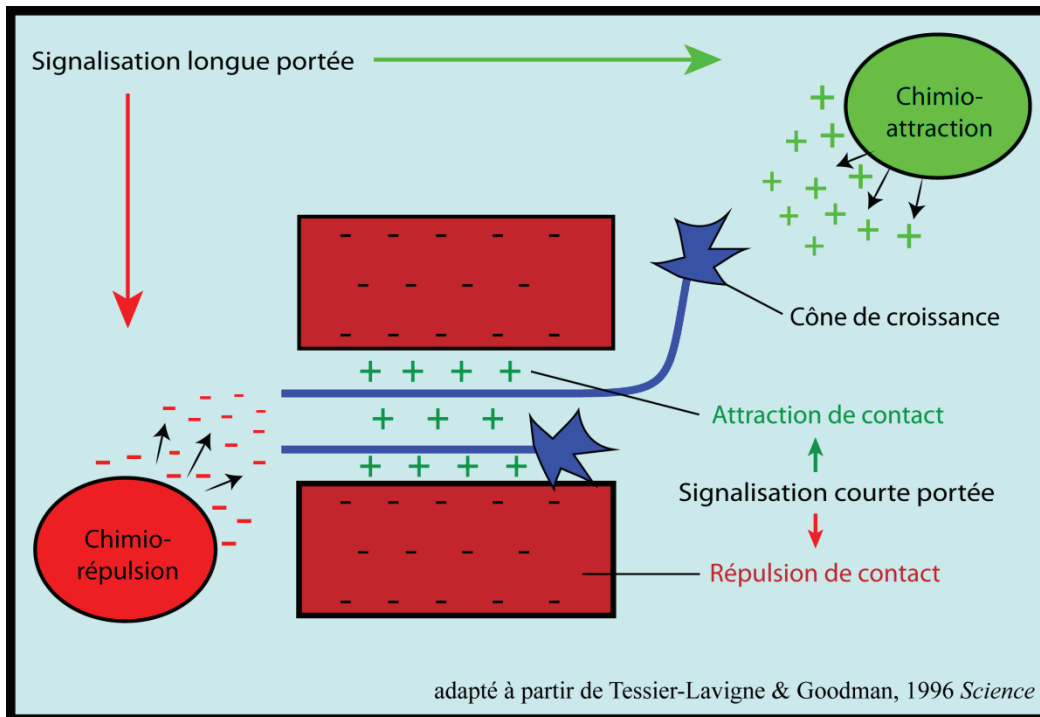


Figure 1. 3. Mécanismes de guidage axonal.

Ce schéma illustre les quatre types de guidage axonal. La répulsion de contact, l'attraction de contact, la chimioattraction et la chimiorépulsion. Adapté d'après (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996).

récepteurs spécifiques des signaux de guidage, et au niveau intracellulaire les protéines des voies de signalisation qui vont permettre le remodelage du cytosquelette.

2.2.1 Structure générale

In vitro, on peut observer que le cône de croissance a une forme aplatie, mais *in vivo*, le cône de croissance doit pouvoir se faufiler à travers un réseau dense composé de cellules et de matrice extracellulaire et prendra plutôt une forme allongée, parfois même en ‘torpille’ tel que le décrivait Santiago Ramon y Cajal. Pour cette raison, son cytosquelette doit être très malléable pour lui permettre d’avancer.

Le cône de croissance est composé d’un cytosquelette bien organisé et extrêmement dynamique qui comprend un réseau dense de microtubules dans sa partie proximale, et des filaments d’actine polymérisée dans sa partie distale (Figure 1.4) (Bouquet & Nothias, 2007).

2.2.2 Un cytosquelette dynamique

Le cône de croissance s’oriente en fonction des remaniements de son cytosquelette qui soutient ses différentes structures. Les microtubules assurent la stabilité et l’élongation de l’axone dans le prolongement de la trajectoire dictée par le cône de croissance, tandis que l’actine se comporte comme un « polymère actif » sensible aux variations moléculaires. On distingue ainsi trois domaines : central (C), périphérique (P) et transitionnel (T). Dans le domaine P, on observe des structures riches en filaments d’actine: les filopodes, qui forment les arches distaux du cône de croissance, et entre ces arches une fine membrane appelée lamellipode (Figure 1.5A).

Le filopode est une saillie de membrane dans laquelle les filaments d'actine s'agencent en faisceaux, confiné au domaine P du cône de croissance. Cet agencement de l'actine est mis en place par des protéines associées à l'actine telles que la fascine, la formine ou le complexe Arp2/3, et leur orientation est contrôlée par les extrémités barbelées (Figure 1.4). En effet, la polymérisation de l'actine est un processus instable, les oligomères de filaments d'actine sont rapidement désassemblés en monomères d'actine. Ainsi, l'élongation des filopodes est le résultat d'un déséquilibre entre polymérisation de l'actine à l'extrémité + du filament et le flot d'actine rétrograde à la base de celui-ci. Et inversement lors de la rétraction du filopode. De plus, les filopodes peuvent s'orienter latéralement à la suite de tractions asymétriques des différents filaments qui le composent, et peuvent également renforcer leur stabilité par la fusion de plusieurs filopodes lors de ces mouvements latéraux (Steketee & Tosney, 2002).

Les lamellipodes vont assurer la continuité du suivi de ces forces de traction exercées par les filopodes. Ils sont composés eux aussi de réseaux de filaments d'actine, mais dont l'organisation est entrecroisée (Figure 1.5). Ces structures se retrouvent jusque dans le domaine T du cône de croissance. Dans cette zone, les filaments d'actine s'infléchissent sous l'action de la myosine, ce qui échafaude des arcs de filaments d'actine (Lowery & Van Vactor, 2009). Ces arcs, en association avec le flot d'actine rétrograde, permettent de limiter la pénétration des microtubules dans le domaine P (Bouquet & Nothias, 2007). Finalement, c'est dans le domaine C que se déroule la polymérisation des microtubules. Ainsi, lorsque le cône de croissance s'allonge, cette structure reste effilée, permettant une polymérisation soutenue des microtubules, tandis que lors des pauses de

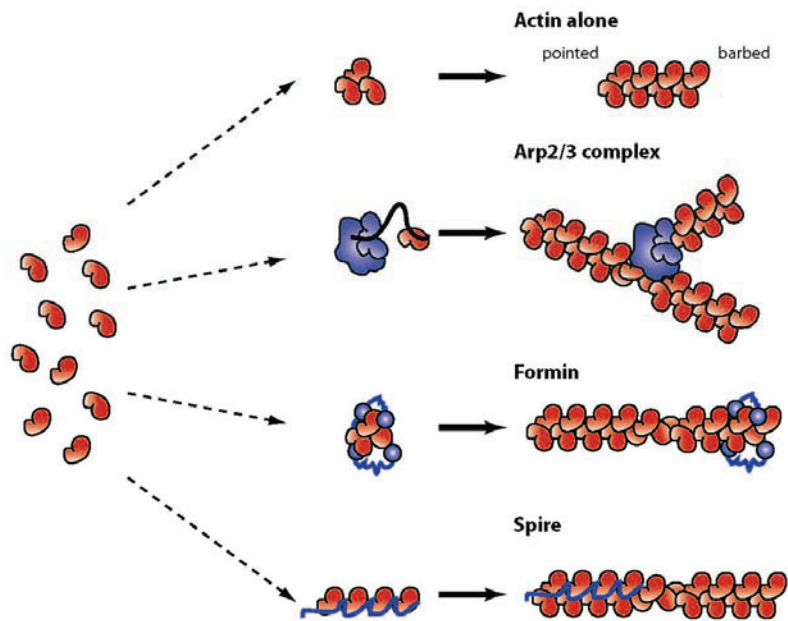


Figure 1. 4. Étapes moléculaire de la polymérisation d'actine.

Ce schéma illustre l'importance des facteurs de nucléation (Arp2/3, Formine et Spire) dans la consolidation des filaments d'actine. Les monomères d'actine (actine globulaire (actine G)) sont à la source de la formation des filaments d'actine (actine filamenteuse (actine-F)). Sans la présence de protéines pour stabiliser l'actine, la formation d'oligomères d'actine revient vers un équilibre en se dépolymérisant spontanément. L'élongation stable des filaments d'actine est permise grâce à la présence de facteurs de nucléations qui vont lier les monomères d'actine. Trois formes sont représentées ici: Arp2/3 est responsable du branchement des filaments. Formine et Spire supportent la formation de filaments linéaires que l'on retrouve dans les filopodes. Avec l'autorisation de Manishha Patel (Patel, 2011).

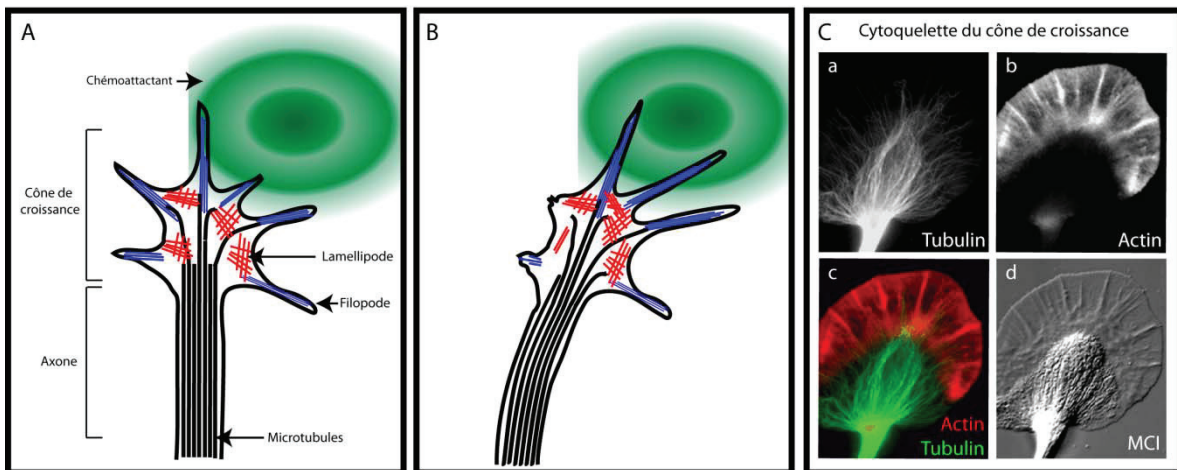


Figure 1. 5. Structure du cône de croissance.

Schémas représentant un cône de croissance et la partie distale de son axone lors du remaniement de son cytosquelette à la suite de l'intégration d'un signal de guidage attractif. **A.** Cône de croissance chevauchant un gradient de molécule chimioattractante (cercles concentriques verts). **B.** Cône de croissance ayant procédé au remodelage de son cytosquelette: les filaments d'actines des filopodes (bleu) et des lamellipodes (rouge) ont été asymétriquement stabilisés du côté de la source de chimioattractant. Les microtubules se sont allongés dans le nouvel espace défini par le squelette d'actine. Schéma adapté d'après Barry J. Dickson (2002). **C.** Photos d'un cône de croissance d'aplysie vue en microscopie à fluorescence (a-c) et en microscopie à contraste interférentiel (MCI) (d). (a) Microtubules marquées avec un anti-beta-tubuline. (b) Filaments d'actine visualisés avec de la phalloïdine couplée à de la rhodamine. (c) Superposition de (a) et (b). Photographies utilisées avec l'aimable autorisation de Paul Forscher, Copyright © 1999, Paul Forscher & Lab, Yale University MCDB, New Haven.

croissance, ou lors du processus de rétraction, cette zone gonfle et la polymérisation des microtubules est inhibée. La présence de quelques microtubules est toutefois observée dans la partie proximale de certains filopodes, tel qu'illustré sur la Figure 1.5.

La régulation de l'orientation du cône de croissance passe par la stabilisation de la polymérisation de l'actine. Lors du guidage axonal, les principaux régulateurs de cette dynamique sont les petites GTPases de la famille Rho. Ainsi, Rho, Rac et Cdc42 agissent comme des interrupteurs moléculaires en oscillant d'un état activé, lié au GTP, à un état inactif, lié au GDP. Une fois activées, ces GTPases peuvent induire les différents remaniements du cytosquelette : polymérisation de l'actine, contractilité des couples actine-myosine et enfin réorganisation des microtubules. Généralement, les effets de croissance permissifs résultent de l'activation de Cdc42 et Rac, tandis que les effets répulsifs sont une conséquence de l'activation de Rho (Bouquet & Nothias, 2007).

Finalement, la progression du cône de croissance dans la bonne direction nécessite la présence d'une machinerie cellulaire capable de répondre aux signaux de l'environnement via l'activation de récepteurs transmembranaires spécifiques.

2.3 Les grandes classes de molécules de signalisation

Quatre classes de molécules ont été caractérisées, pendant les années 90, pour leur rôle dans le guidage des axones. Les nétrines, les slits, les éphrines et les sémaphorines (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996).

2.3.1 Les nétrines.

C'est en 1990 qu'une étude conduite chez le nématode a identifié le premier gène codant pour une nétrine, *unc6*, pour son rôle dans le guidage axonal circonférentiel (Hedgecock, Culotti, & Hall, 1990). Peu de temps après, 2 protéines ont été purifiées chez le poulet pour leur activité de chimioattraction sur des axones de neurones commissuraux (Kennedy, et al., 1994; Serafini, et al., 1994). Ces protéines ont été identifiées en utilisant une stratégie classique utilisée pour la mise en évidence du rôle du facteur de croissance nerveux (Levi-Montalcini, 1987). Cette stratégie consiste à définir une activité biologique, élaborer un essai permettant d'évaluer cette activité, et enfin à tester dans cet essai des fractions purifiées biochimiquement. C'est ainsi qu'on a découvertes les nétrines 1 et 2, les homologues de UNC6. Chez les vertébrés, on retrouve 4 formes de nétrines sécrétées (nétrines 1 à 4) et 2 formes liées à la membrane par l'intermédiaire d'un groupement GPI (nétrines G1 et G2). D'une masse moléculaire de 70KDa, elles partagent des homologies avec les domaines V et VI de la partie N-terminale de la laminine, qui leur confèrent des propriétés d'adhésion, la laminine liant via ce domaine d'autres protéines telles que l'héparine (Serafini, et al., 1994).

La nétrine-1, la plus étudiée, possède chez les vertébrés plusieurs récepteurs dont DCC et son paralogue néogénine, ainsi que 4 protéines UNC5 (A-D) (Figure 1.6). Elle est responsable d'effets attractifs et répulsifs. Tandis que son effet attractif requiert le récepteur DCC, son activité répulsive requiert l'expression d'une forme de UNC5 (Moore, Tessier-Lavigne, & Kennedy, 2007). Ainsi, retenons que la nétrine est une molécule chimioattractive pour les axones commissuraux. En effet, dans la moelle épinière en dév-

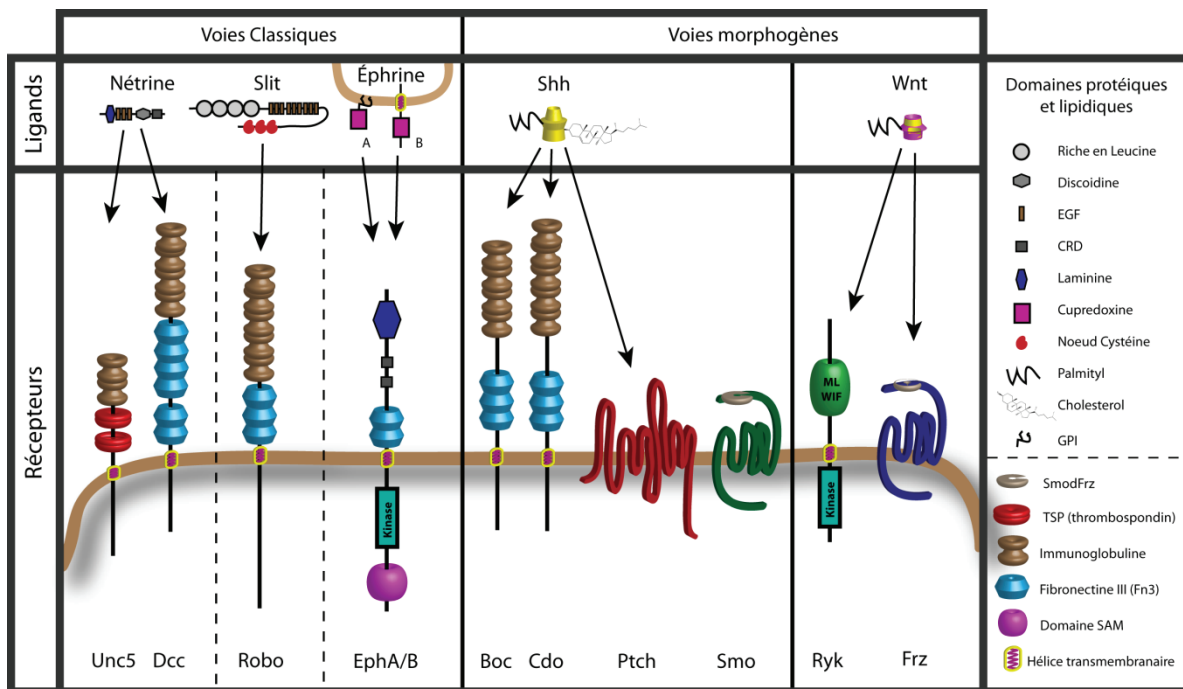


Figure 1. 6. Liste des principaux couples de ligands-récepteurs des voies classiques et morphogènes impliqués dans le guidage axonal.

A gauche les voies classiques, au centre la voie Shh et à droite la voie Wnt. Dans l'encadré la légende des différents domaines protéiques et lipidiques (adapté à partir de (Kolodkin & Tessier-Lavigne, 2011)).

eloppement, où la nétrine-1 est sécrétée par la plaque basale, elle exerce un effet attractif sur les axones des neurones commissuraux, dont les corps cellulaires sont localisés dans la partie dorsale (Kennedy, et al., 1994). Cet effet a été mis en évidence lors de l'étude des mutants pour la *nétrine-1* ou pour son récepteur DCC (Fazeli, et al., 1997; Serafini, et al., 1996).

2.3.2 Les éphrines :

Il existe deux grandes classes d'éphrines. Les éphrines de type A et de type B. Les ligands sont appelés éphrines et les récepteurs sont appelés Eph (Kullander & Klein, 2002). Contrairement aux nétrines, les ligands de cette famille de molécule sont liés à la membrane plasmique (Flanagan & Vanderhaeghen, 1998). Ainsi, ils sont responsables de guidage de contact (Figure 1.3). Tandis que les ligands de type A sont ancrés à la membrane par un groupement GPI, les ligands de type B sont des protéines transmembranaires comportant une queue cytoplasmique. Comme la plupart des autres molécules de guidage, les éphrines peuvent fonctionner comme attractants ou répulsifs (Cheng, Nakamoto, Bergemann, & Flanagan, 1995; Drescher, et al., 1995; McLaughlin, Hindges, Yates, & O'Leary, 2003). Par contre, elles ont cela de particulier que la signalisation peut se faire dans les deux sens, c'est-à-dire du ligand vers le récepteur, mais aussi du récepteur vers le ligand, puisque ceux-ci sont aussi ancrés à la membrane. On appelle cette dernière signalisation inverse.

Leur rôle a été particulièrement bien décrit dans le système visuel lors de l'établissement des cartes rétinitopiques, et pour la ségrégation des axones au niveau du chiasma optique. Dans le premier cas, des études chez le poulet et le xénope ont révélé une

intrigante distribution des éphrines de type B et de leurs récepteurs dans la rétine et le tectum optique (Cheng, et al., 1995). Les zones qui expriment fortement les *éphrines-B* (rétine dorsale) se projettent vers les régions qui expriment fortement le récepteur *EphB* (tectum latéral) (Figure 1.7) ce qui laissa supposer une correspondance d'interactions attractives (Birgbauer, Cowan, Sretavan, & Henkemeyer, 2000). Pour démontrer le rôle de la voie éphrine dans la formation de ces cartes topographiques les études ont eu recours à l'utilisation de traceur lipophile, en particulier le DiI, pour réaliser des marquages antérogrades et rétrogrades. Des cristaux de DiI ont été placés sur la rétine. Là le DiI s'intègre dans la membrane des CGR et diffuse passivement dans le tissu fixé jusqu'à l'extrémité terminale de l'axone de CGR. Il est alors possible d'observer les connexions rétino-tectales. Ainsi, quand la fonction des récepteurs EphB est inhibée dans la rétine, on peut observer une latéralisation de leurs connexions au niveau du tectum optique, accompagnée d'erreurs de branchements (Birgbauer, et al., 2000; Hindges, McLaughlin, Genoud, Henkemeyer, & O'Leary, 2002; McLaughlin, et al., 2003).

Plus récemment, le rôle répulsif des éphrines-B a été démontré dans le guidage des axones de motoneurones à l'entrée des membres. A ce niveau, les axones doivent décider de tourner dorsalement ou ventralement. Or, les *éphrines-B* sont exprimées dans la partie dorsale du membre et les axones de motoneurones à projection ventrale expriment à leur surface les récepteurs *EphB1*, *EphB2* et *EphB3*, suggérant un rôle répulsif pour les éphrines-B à ce niveau (Luria, Krawchuk, Jessell, Laufer, & Kania, 2008). L'inactivation de la fonction des récepteurs a été conduite chez le poulet (par électroporation d'ARN interférents) et la souris (triple mutants *EphB1;EphB2;EphB3*) et dans les deux cas cette

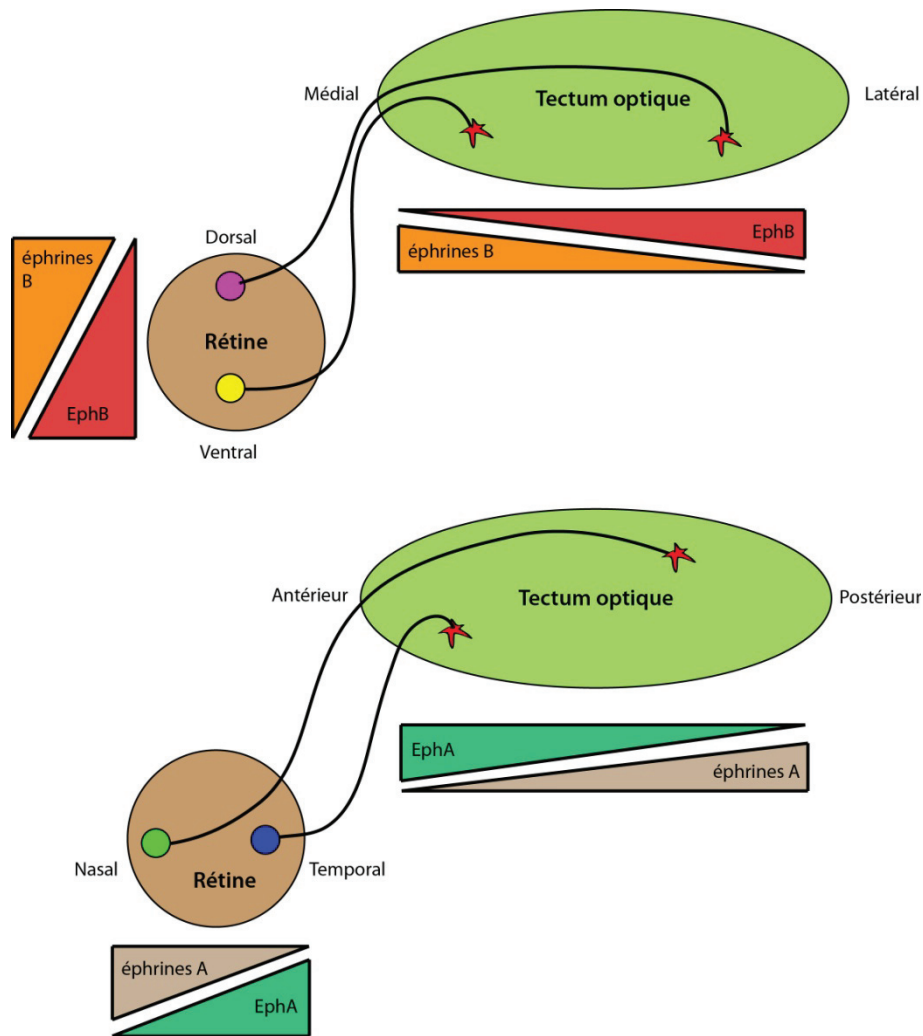


Figure 1. 7. Les éphrines et les cartes rétinotopiques.

Les connexions des cartes rétinotopiques dans le tectum optique sont établies grâce à des niveaux élevés de récepteurs EphBs dans les CGRs de la rétine ventrale. Ces axones rétiniens projettent vers les régions médiales du tectum qui expriment de hauts niveaux de ligands éphrine-B, ce qui suggère un signal attractif transmis par les interactions EphB / éphrine-B. En revanche, des niveaux élevés de EphA et éphrine-A sont exprimés en gradient opposés le long de l'axe antéro-postérieur. Les CGRs de la rétine nasale exprimant des niveaux élevés de EphA envoient leurs axones vers la partie la plus postérieure du tectum, une zone à faible niveau d'éphrine-A, suggérant dans ce cas une signalisation répulsive du couple éphrine-A/EphA

inactivation a révélé des défauts de guidage des motoneurones, projetant alors de façon erronée, dans la partie dorsale du membre, confirmant l'effet répulsif des ligands éphrine-B dans ce système (Luria, et al., 2008).

L'étude des voies activées par les Eph et les éphrines est complexe du fait de la signalisation inverse et des travaux approfondis à ce niveau seront requis pour comprendre les subtilités de fonctionnement de ces voies dans les différents systèmes.

2.3.3 Les slits

Les gènes *slits* sont au nombre de 3 (*Slit1-3*) chez les mammifères. Ils codent pour des protéines sécrétées de la matrice extracellulaire. Contrairement aux facteurs décrits plus haut, les slits sont des protéines très volumineuses de 200KDa qui se composent de domaines riches en leucine connectés par des ponts disulfures, suivis de 7 à 9 répétitions de domaines EGF, d'un module laminine de type-G (« Laminine G-Like »), et de nœuds cystéine (Figure 1.6). Des études génétiques et biochimiques conduites chez la drosophile ont permis de démontrer que les récepteurs des slits sont les protéines robo (1-3) (Kidd, et al., 1998). Chez la drosophile comme chez les mammifères, des mutations dans les gènes *robo* sont à l'origine de sévères défauts de croisement de la ligne médiane (Kidd, et al., 1998; Plump, et al., 2002; Sabatier, et al., 2004). De plus, certaines études indiquent que les slits pourraient également lier des glycosaminoglycanes (heparane sulfate) de la matrice extracellulaire et que cette liaison est essentielle pour permettre un guidage approprié dans le cerveau (Inatani, Irie, Plump, Tessier-Lavigne, & Yamaguchi, 2003).

2.3.4 Les sémaphorines.

Les sémaphorines (Sema) composent une grande famille de molécules (20 formes différentes chez les mammifères) dont certains membres sont sécrétés (comme les nétrines) et d'autres transmembranaires (comme les éphrines). Elles ont été classées en sept sous-familles, les formes 2 (drosophile et *C.elegans*) et 3 (mammifères) étant les seules formes solubles. La plupart fonctionnent comme des molécules répulsives, comme cela a été montré aussi bien dans des essais *in vitro* qu'à la lumière d'analyses génétiques *in vivo* (Koncina, Roth, Gonthier, & Bagnard, 2007). Par exemple, l'activité répulsive de la Sema3A, une forme sécrétée de Sema, a été identifiée en traitant des axones de neurones de ganglion rachidien. En effet, la Sema3A induit un collapsus rapide et une rétraction des cônes de croissance de ces axones (Luo, Raible, & Raper, 1993). Certaines sémaphorines peuvent aussi promouvoir la croissance des axones, comme c'est le cas de la Sema3F pour les axones du bulbe olfactif (Cloutier, et al., 2004).

Plusieurs familles de récepteurs sont responsables de la transmission des signaux de guidage des Sema. Parmi eux on retrouve les neuropilines (Nrp1 et Nrp2), les plexines, les IgCAM (L1, NrCAM) et les récepteurs du VEGF (Koncina, et al., 2007). La plupart des effets connus à ce jour impliquent la présence de couples hétérophiliques de récepteurs, et selon la combinaison, l'effet peut balancer entre l'attraction et la répulsion (Chauvet, et al., 2007).

Il existe une pléthore de molécules de guidage appartenant à ces 4 voies classiques. Cependant, au cours de la dernière décennie, de nombreuses autres voies moléculaires ont été caractérisées.

2. 4 Les morphogènes, une nouvelle classe de molécule de signalisation

Au cours du développement, il n'est pas rare de voir une même molécule avoir plusieurs fonctions. Ainsi, la protéine Notch est impliquée très tôt dans le développement en agissant sur les cellules souches, puis plus tard pour la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, ou même pour la communication entre l'endocarde et le myocarde.

Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette introduction, les morphogènes sont une famille de molécules qui régulent, dès les premières étapes du développement embryonnaire, la formation des axes, des tissus et des organes, agissant sur la prolifération et la mort cellulaire programmée, et dictant le destin cellulaire des multiples sous-types de progéniteurs qui constituent chaque organe du corps. Les gènes impliqués dans ces mécanismes ont pour la plupart été identifiés chez la drosophile, notamment grâce aux travaux de Nüsslein-Volhard et Wieschaus (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Jusqu'à récemment, les morphogènes et les molécules de guidage ont été considérés comme fonctionnellement distincts (Osterfield, Kirschner, & Flanagan, 2003). Désormais, il semble que certains morphogènes dont l'expression est précoce peuvent ensuite servir de signaux de guidage axonal. Sonic hedgehog (Shh), ainsi que des membres de la famille des Wnts et des BMPs, sont trois exemples de molécules qui agissent précocement comme morphogènes pour déterminer le devenir de neurones et, plus tard, comme facteurs de guidage axonal pour guider les trajectoires des axones des neurones en développement.

2.4.1 Les Wnt et le guidage axonal

Parmi les morphogènes, les Wnt sont ceux dont la fonction de guidage axonal est la plus documentée (Kolodkin & Tessier-Lavigne, 2011). Ces rôles peuvent être attractifs ou

répulsifs, dépendamment des systèmes ou des organismes. Ainsi, chez la drosophile, Wnt5 induit la répulsion des axones de la commissure postérieure par son récepteur Derailed (un récepteur à un seul domaine transmembranaire à activité tyrosine kinase, et homologue de Ryk) (Yoshikawa, McKinnon, Kokel, & Thomas, 2003), tandis que chez la souris, les axones commissuraux sont attirés vers le côté antérieur de la moelle épinière suivant un gradient de Wnt4 par le récepteur à 7 domaines transmembranaires Frizzled (Fz) 3 (Lyuksyutova, et al., 2003).

Dans le système visuel, ce sont des études chez le poulet qui ont démontré que Wnt3 est exprimée selon un gradient médio-latéral dans le tectum optique, qui est l'équivalent du collicule chez les mammifères (Schmitt, et al., 2006). Par ailleurs, les CGR expriment à la fois les récepteurs Fz5 et Ryk. Bien que Fz5 semble être exprimé de façon uniforme dans les CGR, Ryk, quand à lui, est exprimé fortement dans la partie ventrale, et s'estompe dans un gradient ventro-dorsal, de façon similaire aux gradients d'EphB qui ont été décrits précédemment (Figure 1.7). Toutefois, dans ce système, des études *in vitro* ont montré que Wnt3 agit comme un répulsif pour les axones des CGR, ce qui a été corroboré par le phénotype de mutants *Ryk* qui est opposé à celui des mutants *EphB*.

Enfin, au niveau du corps calleux, une étude a démontré que Wnt5a possédait également une activité chimioréplulsive en activant le récepteur Ryk (Keeble, et al., 2006). Dans cette étude, c'est en analysant les souris mutantes pour le récepteur Ryk que les auteurs ont observé non pas un défaut à traverser le corps calleux, mais plutôt une incapacité de ces axones à rejoindre leur cible du côté contralatéral du cerveau. L'activité répulsive de Wnt5a a, quant à elle, pu être identifiée aux moyens de culture d'explants de neurones corticaux. L'ensemble de ces travaux pointent ainsi vers un système dans lequel une même

famille de molécule, plus connue pour ses effets morphogène (Zecca, Basler, & Struhl, 1996), peut favoriser des effets de guidage axonal par l'utilisation de récepteurs spécifiques à cette fonction comme Ryk (Osterfield, et al., 2003).

2.4.2 Les BMP et les TGF- β

Les BMP font partie de la superfamille des TGF- β et agissent sur la différenciation des cellules en induisant la dimérisation de récepteurs des BMP. Cela induit la phosphorylation de leurs médiateurs intracellulaires, les Smads, qui activent le remaniement de l'expression des gènes après translocation dans le noyau (Macias-Silva, Hoodless, Tang, Buchwald, & Wrana, 1998; Verschueren & Huylebroeck, 1999). Dans la moelle épinière, les BMP (et d'autres membres de leur famille) sont exprimés par la plaque dorsale du tube neural (Basler, Edlund, Jessell, & Yamada, 1993; Liem, Tremml, & Jessell, 1997; Liem, Tremml, Roelink, & Jessell, 1995). En terme de guidage, c'est chez *C.elegans* qu'une mutation dans *Unc-129* a permis d'identifier des TGF- β comme ayant un rôle dans le guidage des axones pionniers des motoneurones, un défaut qui phénotypait celui des mutants des orthologues de nétrines et DCC chez cette espèce (Colavita, Krishna, Zheng, Padgett, & Culotti, 1998).

Peu de temps après, il a été démontré que la plaque dorsale de la moelle épinière et la sécrétion dans celle-ci de BMP produisait une action répulsive déterminante pour l'orientation des axones commissuraux dans la première partie de leur trajectoire (Augsburger, Schuchardt, Hoskins, Dodd, & Butler, 1999). En particulier, ces auteurs ont constaté que l'inactivation de BMP7 conduit *in vivo* à des défauts de guidage des axones commissuraux (Augsburger et al., 1999, Butler et Dodd, 2003).

2.4.3 La voie de signalisation Sonic Hedgehog

Nous avons vu plus haut que Shh a d'abord été découvert en tant que morphogène. Cependant, ce facteur joue aussi un rôle dans de multiples processus cellulaires, que ce soit au cours du développement ou chez l'adulte. Pendant le développement, les fonctions de Shh s'exercent à plusieurs niveaux, dans le contrôle de la différenciation cellulaire le long du tube neural, mais aussi dans le développement des dents ou la formation des membres. Ce facteur est aussi important pour la survie de progéniteurs du tube neural (Charrier, Lapointe, Le Douarin, & Teillet, 2001) et pour la régulation de la prolifération, comme c'est le cas pour les progéniteurs neuraux de la rétine (Zhang & Yang, 2001) ou les cellules granulaires du cervelet (Izzi, et al., 2011; Wechsler-Reya & Scott, 1999). Toutes ces études ont permis de mieux comprendre des composantes de régulation de la signalisation Shh, que ce soit de la production du signal (Shh), de sa réception, ainsi que des effecteurs intracellulaires.

Son implication récente dans les processus de guidage axonal nous renvoie rapidement à l'étude des composantes moléculaires puisque Shh est à la fois à l'origine d'effets attractifs et répulsifs (Bourikas, et al., 2005; Charron, Stein, Jeong, McMahon, & Tessier-Lavigne, 2003; Kolpak, Zhang, & Bao, 2005; Trousse, Marti, Gruss, Torres, & Bovolenta, 2001).

2.4.3.1 Les composantes de la voie Shh

Nous avons décrit plus haut le ligand Shh ainsi que son mode de production. Pour activer la voie de signalisation, Shh se lie à Ptch-1, un récepteur à douze domaines transmembranaires (Fuse, et al., 1999; Marigo, Davey, Zuo, Cunningham, & Tabin, 1996; Stone, et al., 1996). Cette interaction permet de lever l'inhibition de Ptch-1 sur Smo, un médiateur à sept domaines transmembranaires (Murone, Rosenthal, & de Sauvage, 1999). Cela induit l'activation d'une cascade intracellulaire qui requiert les homologues de Costal-2, la protéine kinase Fused et son suppresseur SuFu (Pham, et al., 1995). Enfin, cette activation de la voie conduit ultimement à l'activation des Gli, des facteurs de transcription à doigt de zinc, qui peuvent alors être relocalisés au noyau où ils déclenchent l'expression de gènes cibles (Ding, et al., 1999; Pearse, Collier, Scott, & Tabin, 1999). Cette cascade a été décrite sur la base de preuves génétiques et biochimiques mettant en jeu l'effet morphogène et transcriptionnel de Shh (Sasaki, Nishizaki, Hui, Nakafuku, & Kondoh, 1999; C. W. Wilson & Chuang, 2010). Plus récemment, on a mis en évidence l'existence de corécepteurs pour Ptch-1. Ainsi, Boc, Cdo et Gas1 sont requis pour permettre la liaison de Shh à un complexe de récepteur qui permettra ainsi la transmission du signal, que ce soit pour des effets de différenciation ou de prolifération de Shh (Allen, et al., 2011; Izzi, et al., 2011; Tenzen, et al., 2006). Gas1 est une protéine de surface ancrée à la membrane par un groupement GPI. Boc et Cdo sont deux protéines à un seul domaine transmembranaire de type IgG-CAM, homologues l'une de l'autre. Leur domaine extracellulaire a de fortes homologies structurelles avec les récepteurs de guidage Robo et DCC (Figure 1.6).

2.4.3.2 Rôle de *Shh* dans le guidage des axones de la moelle épinière

C'est dans la moelle épinière que les premières preuves formelles du rôle de *Shh* dans le guidage axonal ont été rapportées (Charron, et al., 2003). En inactivant génétiquement la *nétrine-1*, il y a de fortes perturbations du guidage des axones commissuraux. Cependant, il est toujours possible d'observer des axones croisant la ligne médiane chez les mutants de *nétrine-1* ou de son récepteur DCC (*Nétrine-1*^{-/-} ou *DCC*^{-/-}) (Fazeli, et al., 1997; Serafini, et al., 1996), suggérant la présence d'au moins un autre facteur responsable du guidage de ces axones. En analysant des embryons mutants (*Gli2*^{-/-}) dont la plaque basale ne se développait pas, il a été démontré qu'il y avait alors absence totale d'attraction des axones commissuraux (Charron, et al., 2003). Ainsi, le facteur devait répondre à deux critères : i) être exprimé par la plaque basale et ii) être sécrété. Un excellent candidat répondant à ces critères était *Shh*. En cultivant des explants de moelle épinière dorsale, les auteurs ont observé l'attraction des axones commissuraux en direction d'agrégats de cellules COS exprimant *Shh*. Cet effet s'est avéré spécifique puisqu'il pouvait être bloqué par la cyclopamine, un inhibiteur de *Smo*, le médiateur du signal de la voie *Shh*. De plus, l'addition de *Shh* à l'aide d'une micropipette dans des cultures de neurones commissuraux isolés a provoqué l'attraction de leurs axones, indiquant que l'effet de *Shh* observé dans les cultures d'explants n'est pas dû à une respécification du destin des progéniteurs, mais plutôt à une action directe de *Shh* sur les cônes de croissances des axones commissuraux. Enfin, en inactivant *Smo* dans les neurones commissuraux, les auteurs ont pu observer des défauts de guidage des axones dans la partie ventrale de la moelle épinière.

En plus de son activité chimioattractive, Shh possède une activité chimioréulsive sur les axones commissuraux, après leur traversée de la plaque basale, alors qu'ils tournent en direction rostrale et croissent le long de l'axe longitudinal (Figure 1.8) (Bourikas, et al., 2005). Ceci a été démontré en réalisant des cribles d'hybridations soustractives qui ont permis d'identifier *Hip* comme étant un récepteur exprimé durant la période à laquelle les axones commissuraux tournent rostralement. De plus, en faisant une étude de perte de fonction par électroporation d'ARN interférant *in ovo*, les auteurs ont apporté la preuve que *Hip* est bien le récepteur impliqué dans cet effet. Enfin, les auteurs ont rapporté que, contrairement à tout ce qui a été décrit pour la signalisation induite par Shh, cet effet n'implique pas le médiateur Smo, puisqu'il n'était pas affecté lorsque les explants de moelle épinière de poulet étaient traités avec un inhibiteur de Smo, la cyclopamine (Bourikas, et al., 2005).

2.4.3.3 Rôle de *Shh* dans le guidage des axones de la rétine.

Des expériences *in vitro* ont montré que l'ajout de ShhN dans un bain de culture contenant des axones de CGR induisait une rétraction de ces axones (Kolpak, et al., 2005; Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008; Trousse, et al., 2001). De plus, la démonstration *in vivo*, par surexpression de *Shh* en utilisant un vecteur viral chez le poulet, indique que les axones de CGR sont déviés de la zone d'expression de Shh. Ensemble, ces données suggèrent que Shh est chimiorépulsif pour les axones de CGRs. Au niveau du chiasma, les axones de CGR suivent un trajet très défini, croisant la ligne médiane dans un tunnel qui sera par la suite délimité par des cellules gliales. A ce niveau, plusieurs molécules de guidage répulsif, des slits et des sémaphorines (voir section 3.4.3.3), ont été impliquées

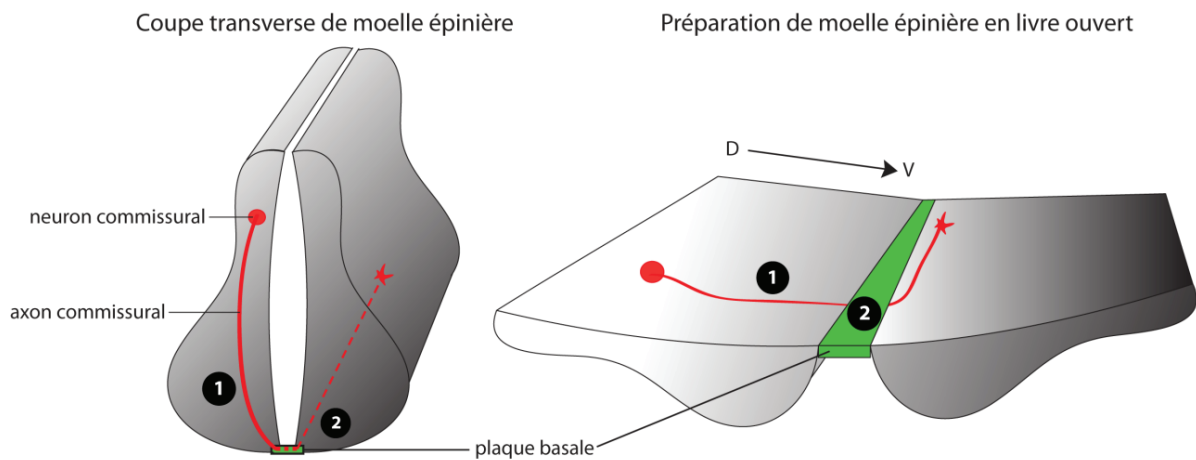


Figure 1. 8. Étapes du guidage des neurones commissuraux par Shh.

(1) Le neurone commissural (rouge), dont le corps cellulaire est situé dans la partie dorsale de la moelle, envoie son axone vers le gradient ventro-dorsal de Shh exprimé par la plaque basale (vert). (2) Une fois la plaque basale traversée, l'axone commissural tourne vers le côté antérieur et est alors repoussé par un gradient décroissant caudo-rostral de Shh.

dans la délimitation des frontières du chiasma optique. Si le rôle répulsif de Shh peut s'expliquer au niveau du chiasma pour une action similaire, c'est-à-dire de canalisation des axones de CGR pour qu'ils croisent de façon précise dans ce tunnel restreint, il est plus difficile à expliquer lors de la croissance des axones de CGR au niveau de la rétine où *Shh* est exprimé par les CGRs elles-mêmes. Un effet de dose a été proposé, suggérant même qu'à faibles doses Shh pourrait être attractif (Kolpak, et al., 2005). Toutefois, plus de preuves seront nécessaires pour expliquer ce masquage de l'effet répulsif au niveau de la rétine, le mécanisme pouvant être similaire à celui observé dans la moelle épinière où Shh est d'abord attractif avant de repousser les axones commissuraux (Bourikas, et al., 2005; Charron, et al., 2003).

La dernière décennie a ainsi vu la démonstration du rôle des morphogènes, molécules à fortes propriétés positionnelles, dans l'établissement de gradients qui sont requis pour définir les trajectoires axonales de nombreux types de connexions nerveuses.

Ainsi, des composantes de la signalisation Shh devront être étudiées plus en détails pour mieux comprendre leurs rôles dans la formation du système visuel.

3. Le développement du système visuel

3.1 La rétine

La rétine commence à se développer à partir d'une extension de la plaque neurale antérieure (diencéphale) qui se sépare latéralement pour former la vésicule optique. Cette vésicule optique s'invagine sur elle-même pour former la bicouche de la cupule optique. Cette cupule se compose d'une couche externe (l'épithélium pigmenté) et une

couche interne (la rétine). C'est dans cette dernière que les progéniteurs vont se diviser pour produire les sept types de cellules de la rétine : les cellules ganglionnaires (CGR), les horizontales, les bipolaires, les amacrines, les cônes, les bâtonnets et enfin les cellules gliales de Müller (Cepko, Austin, Yang, Alexiades, & Ezzeddine, 1996). Ces différents types cellulaires vont se positionner sur trois différentes couches. Une couche interne (appelée couche des ganglionnaires ou CG), faisant face à l'humeur vitrée, abrite les CGR et certaines amacrines. Une couche externe (appelée couche nucléaire externe, ou CNE) qui contient les photorécepteurs, cônes et bâtonnets. Enfin une couche intermédiaire (ou couche nucléaire intermédiaire, CNI) qui abrite les amacrines, les horizontales, les bipolaires et les corps cellulaires des cellules de Müller. À maturité, la lumière est captée par les photorécepteurs qui relayent le message photonique après l'avoir transformé en signal nerveux sous la forme de potentiels d'action. Cette information sera alors envoyée aux CGR via les cellules de la couche intermédiaire qui ont pour rôle de répartir et de découpler le signal. Les CGRs, porteuses de l'information visuelle ont pour fonction de transmettre cette information aux cibles cérébrales. Cet acheminement ne se fait pas sans détour, puisque la majorité des CGR de l'œil droit envoient leur axone vers le cerveau gauche, et vice versa. Ce croisement des axones se fait au niveau du chiasma optique. Ce n'est qu'après cette étape que les axones des CGR atteignent leurs différentes cibles dans le cerveau.

3.2 Le chiasma optique

Le chiasma optique est le carrefour central du système visuel. C'est à ce niveau que décussent la plupart des axones en provenance de la rétine. Très tôt lors du développement de cette structure, on retrouve des neurones, dont le corps cellulaire est positionné caudalement par rapport au chiasma et qui expriment des marqueurs de neurones immatures tels que CD44 et SSEA (voir Figure 1.9) (Marcus, Blazeski, Godement, & Mason, 1995). On retrouve aussi au niveau du chiasma des cellules de la glie radiaire, dont les corps cellulaires se trouvent à la base du troisième ventricule. De ces cellules, qui expriment des marqueurs tels que RC2 et BLBP, s'étendent de longs et fins prolongements qui envahissent la ligne médiane du chiasma, et ce, durant toute la période de croissance des axones de CGR traversant cette structure (Marcus, et al., 1995; Williams, et al., 2003). L'ensemble de ces prolongements neuronaux et gliaux forme une véritable ossature pour le passage des axones de CGR.

Chez la souris, des études génétiques ont démontré le rôle de plusieurs gènes dans la formation de cette structure. En se basant sur des études d'expression par hybridation *in situ*, on observe que *Shh*, qui est présent ventralement tout au long de la ligne médiane de l'embryon, voit son expression régresser à l'endroit même où les axones rétiniens vont croiser la ligne médiane, et ce, une journée avant l'arrivée des premiers axones. C'est le seul endroit où l'expression de *Shh* est absente le long de l'axe antéropostérieur, à ce stade du développement. Parallèlement, l'expression de *Pax2* est observée précisément dans l'espace laissé libre par *Shh*. Ainsi, lorsque le gène *Pax2* est inactivé génétiquement, l'interruption d'expression de *Shh* ne se produit pas (Torres, Gomez-Pardo, & Gruss, 1996). Ces défauts de différenciation des cellules du chiasma affectent le croisement des

axones de CGR qui sont alors repoussés par la ligne médiane chez le mutant *Pax2* (Torres, et al., 1996; Trousse, et al., 2001).

Chez les animaux dont les champs visuels des deux yeux ne se chevauchent pas, toutes les projections rétiniennes croisent au niveau du chiasma, tandis que pour les espèces à vision binoculaire, une partie des axones ne croise pas. C'est au niveau du chiasma optique que s'opère cette ségrégation entre les projections contralatérales, axones qui croisent, et les projections ipsilatérales, ceux qui ne croisent pas (Godement, Salaun, & Imbert, 1984; Godement, Wang, & Mason, 1994; O'Leary, Gerfen, & Cowan, 1983). Les mécanismes mis en jeu pour générer cette ségrégation différentielle sont détaillés dans la section 3.4.3.

3.3 Les cibles cérébrales des afférences rétiniennes

3.3.1 Le corps géniculé latéral (CGL)

Chez l'homme, ce noyau, situé dans le thalamus, est le principal relai des informations visuelles. C'est ici que les axones des CGR font synapse et, selon qu'elles sont ipsilatérales ou contralatérales, ces projections vont cibler des zones bien distinctes de ce noyau. Cette séparation donne lieu à une visuotopie, c'est-à-dire que l'information visuelle correspondant à des champs visuels distincts va être intégrée dans des régions du CGL bien distinctes (Kandel, et al., 2000). Cette information spatiale sera alors retransmise fidèlement vers le cortex visuel, et en particulier la zone du cortex visuel primaire (V1). Cependant, il est important de noter que, chez l'homme, seulement un cinquième des connexions pré-synaptiques du CGL proviennent de la rétine. D'autres afférences viennent

s'intégrer dans ce noyau, dont certaines sont des rétroactions, et d'autres proviennent du cortex.

3.3.2 Le collicule supérieur

Le collicule supérieur est l'équivalent chez les mammifères du tectum optique (plus étudié chez le poulet, xénope). Il se situe dans le mésencéphale et reçoit de nombreuses afférences rétiniennes lors du développement (Lund, 1964, 1969). Son rôle est de coordonner les informations visuelles, somatiques et auditives afin d'ajuster les mouvements du corps lors de la réception d'un stimulus (Kandel, et al., 2000). S'il est lésé, cela entraîne une perte des réflexes d'orientation de la tête lors d'un stimulus visuel (Kostyk & Grobstein, 1982; Milner, Lines, & Migdal, 1984). Chez le rongeur, le collicule supérieur reçoit une partie significative des fibres de CGR, et des lésions de celui-ci sont à l'origine de perturbation dans la structure du tractus optique (Schneider, 1973). Lors du développement, c'est dans cette zone que les premiers axones de CGR viennent se brancher.

3.3.3 Le cortex visuel

Le cortex visuel est situé dans la partie arrière du cerveau. C'est le cortex visuel primaire (V1) qui reçoit les informations en provenance du CGL (Van Essen, Anderson, & Felleman, 1992). Ainsi cette zone ne reçoit pas d'afférences directes de la rétine, et c'est à ce niveau que s'effectue une partie du traitement de l'information, et en particulier l'activation de circuits binoculaires (Gordon & Stryker, 1996; Van Essen, et al., 1992). Cette intégration de la binocularité génère à ce niveau une activité qui peut être détectée, notamment grâce à des techniques modernes d'imagerie optique des signaux intrinsèques

(Vanni, Provost, Casanova, & Lesage, 2010). Cela est réalisable chez l'animal en raison de la situation périphérique de V1. Ainsi, en présentant un stimulus visuel à l'animal, il est possible, en stimulant avec différentes longueurs d'ondes le cortex, de révéler les différents états de l'hémoglobine, permettant ainsi d'obtenir une mesure des fluctuations de l'irrigation cérébrale dans le cortex V1, ce qui reflète l'activation des groupes de neurones dans ces régions.

V1 constitue principalement un relai vers le cortex visuel secondaire (V2) (Callaway, 1998). Les mêmes types de fonctions sont traitées par V2. Enfin, il existe des centres d'intégration tertiaire ou associative (V3, V4, V5) qui permettent le raffinement de la vision, et servent à établir la reconnaissance des objets, des formes et des couleurs, ainsi que leur localisation dans l'espace.

3.4 Le guidage axonal des CGR

« En étudiant l'évolution de la rétine et celle des centres nerveux, nous nous sommes posé très souvent cette question : quelles sont les causes mécaniques de l'accroissement des fibres nerveuses et du pouvoir merveilleux qu'ont les expansions nerveuses venant d'éléments éloignés de se mettre en contact, sans erreurs ni détours, avec certains corpuscules nerveux, mésodermiques ou épithéliaux? » Santiago Ramon y Cajal. La Cellule (1893)

3.4.1 L'émergence de l'axone de CGR, un processus orienté.

Une fois la cellule ganglionnaire générée, elle migre au sein de sa couche qui est située dans la partie basale de la rétine, faisant face à l'humeur vitrée (Figure 1.9). *In vivo*, l'émergence de l'axone se fait aussi vers cette lumière, du côté basal de la CGR (Figure 1.9). Une étude récente a démontré que la laminine, une molécule sécrétée par la matrice

extracellulaire et localisée du côté basal des CGR, oriente ce choix en instruisant la stabilisation préférentielle d'un des neurites émergeant de la CGR (Randlett, Poggi, Zolessi, & Harris, 2011). Par la suite, l'axone de CGR suivra cette bandelette de laminine tout le long de son élongation dans la rétine.

3.4.2 Le guidage intra-rétinien

Les axones de CGR poussent ainsi dans la partie la plus interne de la rétine, sur un substrat de laminine. Tous ces axones se dirigent ensuite vers la sortie du nerf optique. Pour parcourir ce chemin, plusieurs molécules les guident. L'une d'elles est chimioréulsive, *Slit2*, qui est exprimée par les CGR. Il a été démontré que, chez les souris mutantes pour *Slit-2*, les axones de CGR divergent avant le nerf optique et envahissent les couches externes de la rétine (Thompson, Camand, Barker, & Erskine, 2006). Une étude plus récente a aussi rapporté que ce phénotype est retrouvé également chez les mutants *Robo2*, identifiant ainsi le récepteur responsable de cet effet de défaut de guidage intra-rétinien (Thompson, Andrews, Parnavelas, & Erskine, 2009). Ce guidage répulsif permet aux axones de CGR de rester confinés dans la partie la plus interne de la rétine pour pouvoir rejoindre l'entrée du nerf optique sans détours. Pour rejoindre ce point, Ramon y Cajal avait prédit qu'un facteur chimioattractif délivré par le disque optique (sortie du nerf optique) était responsable d'attirer les axones de CGR. Cette action chimioattractive a été identifiée cent ans plus tard et implique le ligand *nétrine-1*, exprimé au niveau du disque, et son récepteur DCC, exprimé par les axones de CGR (Deiner, et al., 1997). Cette étude a démontré que les souris mutantes pour ce ligand ou ce récepteur ont de sévères hypoplasies

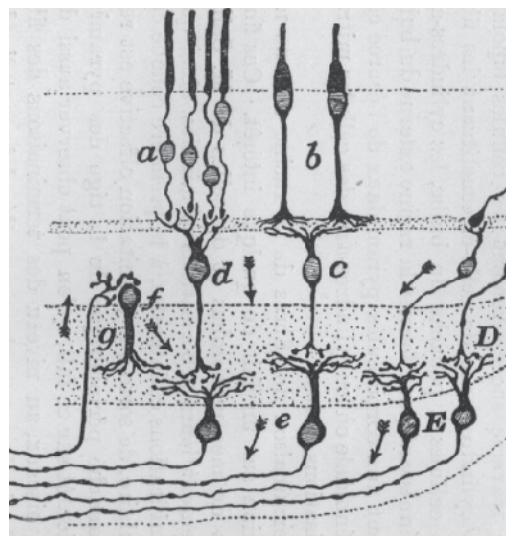


Figure 1. 9. Les cellules ganglionnaires de la rétine.

Dessin de Ramon y Cajal illustrant l'orientation prise par les axones de CGR (E,e) vers la partie vitrée de la rétine. Les flèches indiquent la direction que prennent les axones naissants pendant les premières étapes du développement.

du nerf optique, conséquence d'un manque d'attraction par la nétrine-1. Enfin, plusieurs membres de la famille des CAMs, favorisant la fasciculation des axones de CGR, sont requis pour rejoindre le disque de façon appropriée, tel que démontré chez le poulet après inhibition de l'activité de *NrCAM*, un des membres de la famille (Zelina, Avci, Thelen, & Pollerberg, 2005).

3.4.3 Le guidage au niveau du chiasma optique

Pendant le développement, chez la plupart des mammifères, la majorité des axones de CGR traversent le chiasma optique (Petros, Rebsam, & Mason, 2008). Cette traversée est une étape clef dans le guidage axonal des CGR. Chez les animaux possédant une vision binoculaire, on remarque que plus il y a chevauchement des champs de vision des deux yeux, et plus il y a de fibres qui demeurent ipsilatérales, c'est-à-dire qu'au lieu de croiser au niveau du chiasma, sont repoussées au cours du développement (Godement, Salaun, & Mason, 1990; Godement, et al., 1994; Herrera, et al., 2003). Un modèle animal intéressant pour étudier ce phénomène est le xénope. En effet, au stade têtard, alors qu'il possède une vision monoculaire, toutes les CGRs projettent leur axone du côté controlatéral au niveau du chiasma. Cependant durant le processus de métamorphose, il y a réorientation de la position des yeux, ce qui munit le crapaud adulte d'une vision binoculaire. Il a ainsi été démontré qu'à ce stade, une partie des CGRs orientent leurs axones du côté ipsilatéral (Mann & Holt, 2001).

3.4.3.1 La ségrégation séquentielle des CGRs pendant la formation du chiasma

Habituellement, on distingue trois phases dans le guidage des axones des CGR au niveau du chiasma chez la souris. Durant la première phase (E12 à E13.5), les premiers

axones, provenant de CGR dont les corps cellulaires sont situés dans la partie dorso-centrale de la rétine, projettent aussi bien du côté contralatéral que du côté ipsilatéral (Colello & Guillery, 1990; Godement, Vanselow, Thanos, & Bonhoeffer, 1987; Marcus, et al., 1995). Durant cette étape, les axones projetant ipsilatéralement ne pénètrent pas dans le chiasma lui-même. En effet, ils divergent avant d'arriver à ce niveau. Cependant, ces projections ipsilatérales ne sont que transitoires et seront perdues chez l'adulte. Les aspects moléculaires déterminant ce guidage des axones pionniers de la rétine sont encore mal connus (Petros, et al., 2008). Durant la deuxième phase (E14 à E17), les axones en provenance des CGR localisées dans la partie ventro-temporale de la rétine (VT) entrent dans le chiasma, puis font un véritable demi-tour pour rejoindre le tractus optique ipsilatéral (Godement, et al., 1994). A contrario, les axones des CGR localisées dans les autres régions de la rétine traversent la ligne médiane du chiasma et poursuivent dans le tractus optique contralatéral. Finalement, durant la dernière phase (E17 jusqu'à la naissance), pendant laquelle c'est au tour des CGR localisées dans les parties périphériques de la rétine d'envoyer leurs axones, on observe que, quelle que soit l'origine des CGR, toutes projettent contralatéralement (Drager, 1985).

3.4.3.2 La mécanistique de ségrégation des fibres ipsilatérales

Au chiasma, c'est un véritable tri entre deux populations d'axones qui est réalisé (Marcus, et al., 1995) (Figure 1.10). Trois mécanismes principaux, non exclusifs, ont été proposés pour expliquer cette ségrégation des fibres ipsilatérales et contralatérales. Tout d'abord, une ségrégation mécanique et stochastique, lors de laquelle les axones qui se situent dans la partie la plus latérale du nerf optique seront plus susceptibles de poursuivre

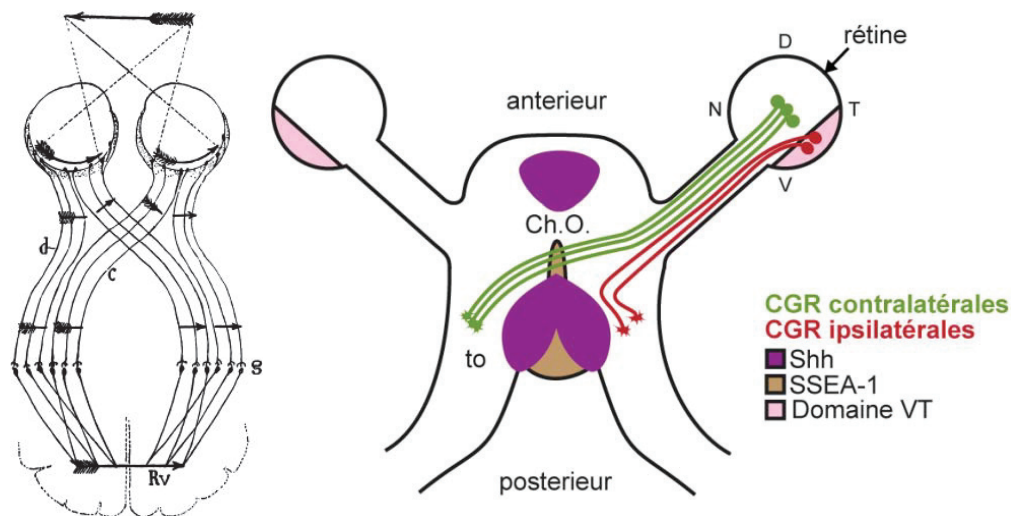


Figure 1. 10. Le guidage des axones de CGR au niveau du chiasma optique.

A gauche : Dessin de Santiago Ramon y Cajal (1882) illustrant la représentation d'un objet perçu par les deux yeux, et l'intégration des informations après ségrégation au niveau du chiasma optique des fibres de CGR. A droite : Schéma d'un chiasma de souris mettant l'accent sur les deux populations de CGR et sur la position de leurs corps cellulaires dans la rétine. Les corps cellulaires des CGR ipsilatérales sont dans la partie ventro-temporale de la rétine tandis que pour les CGR contralatérales ceux-ci sont localisés dans toutes les régions de la rétine. (Adapté de (P. J. Fabre, Shimogori, & Charron, 2010))

latéralement plutôt que de pénétrer dans le centre du chiasma pour croiser (Lambot, Depasse, Noel, & Vanderhaeghen, 2005). Un tel mécanisme pourrait expliquer le comportement des axones ipsilatéraux pionniers lors de la première phase de développement du chiasma. Un deuxième mécanisme implique la capacité des axones à fasciculer. Ainsi, il a été démontré que l'expression de molécules axonales d'adhésion spécifiques aux projections ipsilatérales et contralatérales (telles que Tag1 et NrCAM, respectivement) permettait aux axones de rester liés les uns aux autres en suivant la trajectoire des axones pionniers (Williams, et al., 2006). Chez l'homme, même si cela n'a pas encore été prouvé empiriquement, il a été proposé que, puisque la majorité de la ségrégation est effective avant l'entrée du chiasma, alors le tri soit une combinaison de ces deux premiers mécanismes. Finalement, la plupart des études sur le sujet ont documenté que, lors de la seconde phase du développement du chiasma, les axones ipsilatéraux de CGR, dont les corps cellulaires sont localisés, chez la souris, dans le quadrant ventro-temporal (VT) de la rétine, sont repoussés au chiasma par des molécules répulsives (Mason, Marcus, & Wang, 1996; Nakagawa, et al., 2000; Petros, Bryson, & Mason, 2010; Plump, et al., 2002; Sakai & Halloran, 2006; Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008; L. C. Wang, Dani, Godement, Marcus, & Mason, 1995; L. C. Wang, Rachel, Marcus, & Mason, 1996; Williams, et al., 2003) (Figure 1.10).

3.4.3.3 Caractérisation moléculaire du guidage des CGR au chiasma optique

Des études *in vitro* ont tout d'abord montré qu'en utilisant des cultures d'explants de rétine placés aux abords d'amas de cellules du chiasma, il se produisait une réduction de la pousse des axones du côté où se trouvent les cellules chiasmatisques (L. C. Wang, et al.,

1996). Dans ces expériences, les explants de chiasma se trouvaient dans du collagène et ne faisaient pas de contact avec les axones des CGR. Cela indiqua que non seulement les cellules du chiasma produisaient des facteurs répulsifs pour les axones de CGR, mais aussi que ces facteurs étaient sécrétés. De plus, pour que ces molécules puissent jouer un rôle dans la ségrégation des axones de CGR, il faut que l'activité répulsive soit spécifique des axones ipsilatéraux (L. C. Wang, et al., 1995). La première preuve de l'existence d'une molécule ayant un effet de guidage répulsif sur les axones ipsilatéraux fut apportée peu de temps après grâce à des expériences réalisées chez la grenouille (Nakagawa, et al., 2000). Dans ce système, l'apparition des fibres ipsilatérales ne se fait que durant la métamorphose. C'est aussi à ce moment que débute l'expression du ligand éphrine-B2 au niveau du chiasma. Ainsi, les auteurs remarquèrent qu'à la suite de l'expression ectopique d'*éphrine-B2* au chiasma, ils pouvaient observer la génération ectopique de fibres ipsilatérales (Nakagawa, et al., 2000). De plus, des études chez la souris ont par ailleurs révélé que, durant la deuxième phase de croissance des axones de CGR (E14-E17), le traitement d'explants de rétine avec l'éphrine-B2 induisait une forte diminution de la longueur des axones des CGR, particulièrement prononcée pour les CGR originaires du VT (Williams, et al., 2003). Enfin, cette même étude a identifié le récepteur EphB1 comme étant principalement responsable de cette répulsion. En effet, on a montré que, non seulement *EphB1* était spécifiquement exprimé dans le VT des rétines pendant la période E14-E17, mais aussi que l'inactivation génétique d'*EphB1* entraînait la perte de la moitié des fibres ipsilatérales. L'identification de cette signalisation dans le guidage répulsif des axones de CGR nous aide à mieux comprendre comment est organisée la ségrégation des fibres ipsilatérales au chiasma. Toutefois, cela ne permet pas d'expliquer comment les axones

issus d'explants sont repoussés par la sécrétion de facteurs diffusibles, tel qu'observé dans les expériences de Wang et collègues (L. C. Wang, et al., 1996). Plus récemment, l'expression de molécules de guidage sécrétées a été démontrée au niveau du chiasma. C'est le cas des slits et des sémaphorines (Erskine, et al., 2011; Plump, et al., 2002; Sakai & Halloran, 2006; Thompson, et al., 2006). De plus, l'ajout de slit-2 ou de sémaphorines *in vitro* induit le collapsus des cônes de croissance des CGR, un effet répulsif menant à la rétraction de l'axone. Cependant, des preuves génétiques ont écarté un rôle de ces signaux dans la ségrégation différentielle des CGR au niveau du chiasma. D'une part les récepteurs pour ces molécules sont exprimés tant par les axones ipsilatéraux que contralatéraux, et, de plus, l'inactivation des slit-2 ou des sema ne perturbait pas le ratio de fibres ipsilatérales (Plump, et al., 2002). Ainsi, puisqu'il reste des fibres ipsilatérales lorsque la signalisation EphB est inactivée, le facteur mis en jeu pour induire un effet répulsif sur les fibres ipsilatérales de CGR reste à découvrir. Un candidat idéal pour induire cet effet pourrait être Shh, puisque celui-ci est effectivement sécrété et que sa présence au chiasma est finement régulée, son expression diminuant à l'endroit du passage des axones de CGR, mais reste présente dans les régions environnantes (Torres, et al., 1996; Trousse, et al., 2001).

3.4.3.4 Régulation transcriptionnelle du guidage axonal ipsilatéral

En amont de la régulation de l'expression des récepteurs et des ligands qui coordonnent la spécificité du guidage axonal des CGR on retrouve plusieurs facteurs de transcription qui jouent des rôles déterminants dans l'établissement de ces connexions visuelles (Erskine & Herrera, 2007; Hatini, Tao, & Lai, 1994; Herrera, et al., 2003; Pak, Hindges, Lim, Pfaff, & O'Leary, 2004). Ainsi, pour permettre l'expression simultanée des machineries de guidage répulsif dans les axones des CGR ipsilatéraux, et la répression dans

ces mêmes CGR des facteurs qui poussent les axones contralatéraux à traverser le chiasma, il est important qu'un programme transcriptionnel soit déclenché. Dans la moelle épinière, c'est sous le contrôle de codes d'expression combinatoires qu'est défini le choix des projections des motoneurones vers leurs muscles cibles (Kania, Johnson, & Jessell, 2000). Il a même été démontré que des membres de la famille des facteurs de transcription à homeobox de type LIM agissaient en amont de l'expression des récepteurs de type Eph (Kania & Jessell, 2003). Ainsi, ces facteurs de transcription se sont révélés d'excellents candidats, puisque certains d'entre eux, *Isl1* et *Isl2*, sont exprimés par les CGR (A. Brown, et al., 2000). Les paragraphes ci-dessous dressent une liste non exhaustive de facteurs de transcription qui ont été identifiés chez la souris pour leur rôle dans la ségrégation des fibres ipsilatérales.

5.1 Isl2 contrôle le devenir contralatéral en réprimant un programme de facteurs ipsilatéraux.

Les études sur ces facteurs de transcription ont pu démontrer l'existence d'un programme responsable de la régulation de la spécification des CGR. Ainsi, *Isl2* était spécifiquement enrichi, non pas dans les CGR ipsilatérales, mais au contraire dans les CGR contralatérales, comme le montre l'exclusion des CGR exprimant *EphB1* (Pak, Hindges, Lim, Pfaff, & O'Leary, 2004). Il a été démontré par le groupe de Denis O'Leary qu'*Isl2* réprimait un programme de spécification des CGR ipsilatérales. Ainsi, son inactivation conduit à une augmentation du nombre de CGR ipsilatérales, faisant de ce facteur de transcription un important régulateur de la latéralité au niveau du chiasma.

5.2 *FoxD1, un marqueur spécifique de la rétine ventro-temporale*

Pour permettre de coordonner l'expression de la machinerie ipsilatérale, il faut cependant que le facteur de transcription qui régule l'activation des composantes en aval soit exprimé spécifiquement dans le quadrant ventro-temporal, dans lequel sont situés les corps cellulaires des CGR. C'est ainsi qu'a pu être identifié BF-2, aussi appelé FoxD1, dans la spécification des CGR, en raison de son motif d'expression différentiel dans la rétine en développement (Hatini, Tao, & Lai, 1994). Étonnement, l'inactivation de *FoxD1* perturbe de façon générale le guidage au chiasma, entraînant d'une part une perte des CGR ipsilatérales originaire du VT et d'autre part, un déroutement des axones contralatéraux vers le côté ipsilatéral (Herrera, et al., 2004). Ce phénotype étant le plus prononcé, les souris mutantes pour *FoxD1* ont plus de fibres ipsilatérales que les souris de type sauvage.

5.3 *Zic2, le chef d'orchestre des fibres ipsilatérales*

C'est en fait un facteur de transcription à doigt de zinc, *Zic2*, qui a été identifié comme régulateur en chef de la spécification des fibres ipsilatérales. Les travaux réalisés par le groupe de Carol Mason ont montré que *Zic2* est exprimé de façon transitoire dans la rétine, du début à la fin de la fenêtre de temps lors de laquelle sont générées les CGR ipsilatérales (E14 à E17), qu'il est fortement enrichi dans les CGR ipsilatérales du VTC, et enfin qu'il est requis pour la génération des projections ipsilatérales (Herrera, et al., 2003). D'autres études ont ensuite démontré que l'expression ectopique de *Zic2* est suffisante pour générer près de 50% des fibres ipsilatérales (Garcia-Frigola, et al., 2008), et confère une sensibilité accrue des CGR au ligand éphrine-B2 (Lee, Petros, & Mason, 2008).

3.5. L'établissement de la vision binoculaire

La stéréopsie peut être définie par la perception de la distance ou de la profondeur de champ relative de deux stimuli présentés dans le champs visuel (Bérubé, 1991). C'est encore une fois à Ramon y Cajal que l'on doit les première observations anatomiques en relation avec un rôle de guidage (Ramon y Cajal, 1893). Dans ses croquis du chiasma optique (Figure 1.11) de différentes espèces animales, il mettait l'emphase sur la corrélation qui existe entre la quantité de fibres rétiniennes ipsilatérales et le degré de chevauchement des champs visuels.

En effet, bien que l'intégration de l'information visuelle en provenance des deux yeux se fasse dans le cortex visuel, une étape importante pour découpler les informations relatives aux différents champs visuels se fait au niveau de la décussation majeure du système visuel : le chiasma optique. Une autre décussation a toutefois un rôle important dans le partage des informations sensorielles, c'est le corps calleux (Mitchell & Blakemore, 1970). Des études, visant à déterminer laquelle des structures joue un rôle prépondérant pour faire converger les informations binoculaires, ont été réalisées chez le chat au début des années 80 (Lepore, Ptito, & Lassonde, 1986; Ptito, Lepore, & Guillemot, 1991; Timney & Lansdown, 1989). En réalisant des chirurgies lors desquelles le chiasma ou le corps calleux étaient sectionnés au niveau de la ligne médiane, les auteurs ont remarqué que, tandis que la section du chiasma était à l'origine de sévères défauts de vision, les sections du corps calleux n'avaient que peu d'effet sur celle-ci. Puisque la perception de profondeur et la vision tridimensionnelle nécessitent la stéréopsie, et que celle-ci est dépendante de la binocularité, alors les auteurs ont étudié également ce phénomène chez des chats ayant subi

diverses transections. Ici encore, seule la chirurgie réalisée au niveau du chiasma optique était responsable d'une perte de la stéréopsie chez les chats (Lepore, et al., 1986).

L'ensemble de ces travaux ont ainsi permis de déterminer que le chiasma était important pour la vision, et que lors de transections de celui-ci, la vision binoculaire était affectée. Puisque de telles sections conduisent à l'inactivation de toutes les fibres contralatérales, et potentiellement de certaines fibres ipsilatérales, ces études semblent indiquer que les fibres contralatérales sont requises pour ce type de vision. Cependant, le rôle des fibres ipsilatérales dans ce processus n'a pas été démontré et encore aujourd'hui, il n'est pas évident, malgré leur importance anatomique, qu'elles soient réellement nécessaires à permettre la convergence des images issues des deux yeux. La question du rôle des fibres ipsilatérales dans l'établissement de la vision binoculaire est donc restée en suspens depuis lors.

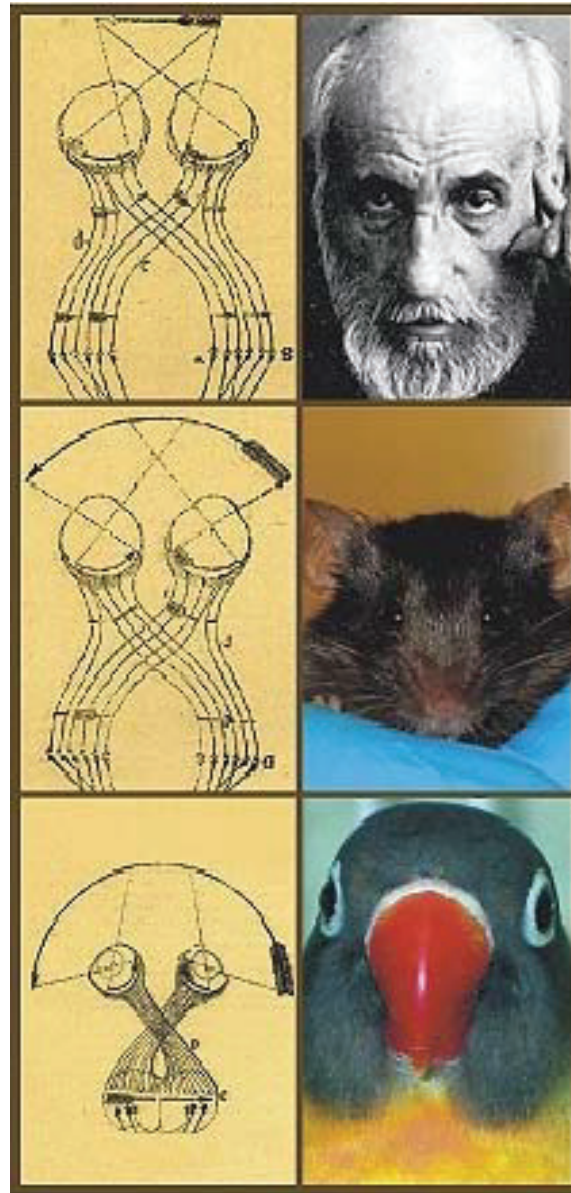


Figure 1. 11. Fibres ipsilatérales et chevauchement des champs visuels.

Illustration de couverture de la revue scientifique *Cell*. Dans les trois espèces animales représentées, on constate, grâce aux schémas de Ramon y Cajal (à gauche) que plus les yeux sont alignés l'un avec l'autre, et plus il y a de fibres qui projettent du côté ipsilatéral du cerveau. Cette couverture a été publiée dans le volume 114(5) de la revue *Cell*, Copyright Elsevier (2003).

OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'objectif premier de cette thèse était de déterminer le rôle que joue la signalisation induite par Shh dans le guidage des axones de la rétine. Un facteur clef responsable de la ségrégation des axones ipsilatéraux au niveau du chiasme étant encore inconnu, les données portant sur l'expression de Shh et son action sur les CGR en font un excellent acteur potentiel de ce processus. Pour y répondre, nous nous sommes fixé pour objectif de déterminer l'identité du ou des récepteurs à l'origine des effets répulsifs de Shh sur les axones de CGR. Le deuxième objectif de cette thèse était de déterminer le rôle d'autres facteurs répulsifs dans le guidage des projections ipsilatérales au niveau du chiasma optique. Enfin, nous venons de voir que le chiasma optique joue un rôle clef dans la mise en place de la vision binoculaire et de la perception de profondeur de champs. La première partie de nos travaux nous ayant amené à caractériser une nouvelle lignée de souris déficientes en axones de CGR ipsilatérales, nous nous sommes alors demandé quel était l'importance du processus de ségrégation des axones ipsilatéraux des CGR dans l'établissement de la vision binoculaire.

CHAPITRE II

ARTICLE:

**“SEGREGATION OF IPSILATERAL RETINAL
GANGLION CELL AXONS AT THE OPTIC CHIASM
REQUIRES THE SHH RECEPTOR BOC”**

Contributions des auteurs

Dans cet article j'ai déterminé les patrons d'expressions, conçu les expériences, les ai réalisées et analysées. J'ai mis au point plusieurs techniques dont l'imagerie en temps réel et les traçages d'axones antérograde. Enfin j'ai participé à l'écriture du manuscrit. La Dr. Shimogori a réalisé les électroporations qui ont servi aux résultats présentés dans la Figure 3.6 de l'article. Le Dr. Charron a supervisé le projet, participé à la conception des expériences, l'analyse des résultats et l'écriture de l'article.

Journal of Neuroscience (2010)30:266-75.

Journal Section: Development/Plasticity/Repair

Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc.

Abbreviated title: *Boc mediates ipsilateral RGC axon segregation*

Pierre J. Fabre^{1,2}, Tomomi Shimogori³ and Frédéric Charron^{1,2,4*}

¹Molecular Biology of Neural Development, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), 110 Pine Ave West, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7

²Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-Shi, Saitama 351-0198, Japan

⁴Department of Anatomy and Cell Biology, Department of Biology, Division of Experimental Medicine and Program in Neuroengineering, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Keywords: Axon guidance, Sonic hedgehog, Boc, retinal ganglion cell, optic chiasm, ipsilateral

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to S. Brown, M. Cayouette, C. Jolicoeur, A. Kania, M. Lévesque, S.K. McConnell, S. Morin, A. Okada, E. Ruthazer, J. Sandink and D. Van Meyel for providing advice and/or reagents. We thank J. Barthe, J. Cardin, A. Daigneault, and S. Morin for expert technical assistance and J. Pham for schematics. The 4D7 and 2H3 antibodies were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa. We thank M. Cayouette, A. Kania, and P. T. Yam for critical comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Peter Lougheed Medical Research Foundation, the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), and the Canada Foundation for Innovation (CFI).

ABSTRACT

The pattern of contralaterally- and ipsilaterally-projecting retinal ganglion cell (RGC) axons at the optic chiasm is essential for the establishment of binocular vision. Contralateral axons cross the chiasm midline as they progress from the optic nerve to the optic tract. In contrast, ipsilateral axons deviate from the chiasm and continue in the ipsilateral optic tract, avoiding the chiasm midline. The molecular mechanism underlying this phenomenon is not completely understood. Here we show that the Sonic Hedgehog (Shh) receptor Boc is enriched in ipsilateral RGCs of the developing retina. Together with the presence of Shh at the midline, this complementary expression pattern led us to hypothesize that Shh might repel ipsilateral RGC axons at the chiasm. Consistent with this hypothesis, we found that only Boc positive RGC axons retract *in vitro* in response to Shh and that this response is lost in Boc mutant RGCs. *In vivo*, we show that Boc is required for the normal segregation of ipsilateral axons at the optic chiasm and, conversely, that Boc expression in contralateral RGCs prevents their axons from crossing the optic chiasm. Taken together, these results suggest that Shh repels ipsilateral RGC axons at the optic chiasm via its receptor Boc. This work identifies a novel molecular pathway required for the segregation of axons at the optic chiasm.

INTRODUCTION

At the optic chiasm, the majority of RGC axons cross the midline and continue their progression toward the brain in the contralateral optic tract. However, in animal species with binocular vision, a subpopulation of RGC axons do not cross the midline and, instead, avoid the chiasm to follow the ipsilateral optic tract (Erskine & Herrera, 2007; Petros, et al., 2008). RGCs which project ipsilaterally are located in the ventro-temporal (VT) part of the retina and the guidance of their axons at the optic chiasm is regulated by pathfinding cues expressed by the midline radial glial cells and by cells of the ventral diencephalon surrounding the chiasm. A crucial midline cue is Ephrin-B2, which repels ipsilaterally-projecting axons expressing the Ephrin receptor EphB1 (Nakagawa, et al., 2000; Williams, et al., 2003). The combined inactivation of all gradients of EphB receptors in the retina of the EphB1;EphB2;EphB3 triple mutant indicates that EphB receptors account for the formation of about 50% of the ipsilateral projections in the mouse (Williams, et al., 2003). Importantly, the residual 50% of the ipsilateral projections in these mutants still correctly originates from the VT retina, suggesting that other factors are still present to guide these ipsilateral RGC axons. These and other experiments (Garcia-Frigola, Carreres, Vegar, Mason, & Herrera, 2008) have led to the hypothesis that ipsilateral RGC axons from the VT retina are also guided by EphB-independent mechanisms at the chiasm.

The secreted protein Shh is a morphogen which can also function as an axon guidance molecule (Charron, et al., 2003; Charron & Tessier-Lavigne, 2005). Shh is expressed in the diencephalic ventral midline (Marcus, et al., 1999; Torres, et al., 1996; Trousse, et al., 2001; Wallace & Raff, 1999) and it has been suggested to act as a repellent to guide RGC axons through the optic chiasm (Trousse, et al., 2001). More recently, *in vivo*

experiments that inhibit the Shh signaling mediator Smoothed (Smo) in the developing mouse visual system suggested that Shh controls the pathfinding of contralaterally-projecting RGC axons in a cell-autonomous way (Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008). However, contralaterally- and ipsilaterally-projecting RGCs both express components of the Shh signaling pathway, and these experiments did not assess whether ipsilaterally-projecting RGC axons are normally guided at the chiasm under these conditions. Therefore, whether Shh guides ipsilateral projections remains unknown. Furthermore, the identity of the Shh receptor involved in the guidance of RGC axons has not been determined.

To address these two questions, we have taken advantage of our previous finding that Boc is a Shh receptor required for the guidance of commissural axons by Shh (Okada, et al., 2006). We show that Boc is enriched in ipsilateral RGCs of the developing retina and that, *in vitro*, Boc is required for RGC axons to respond to Shh. *In vivo*, Boc is required for the normal segregation of ipsilateral axons at the optic chiasm and its expression in contralateral RGCs prevents their axons from crossing the optic chiasm. Taken together, these results suggest that Shh repels ipsilateral RGC axons at the optic chiasm via its receptor Boc. This work identifies a novel molecular pathway required for the segregation of axons at the optic chiasm.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Timed pregnant Sprague Dawley rats were obtained from Charles River Canada (St-Constant, Québec, Canada). C57Bl/6J mice were maintained in a specific pathogen-free (SPF) animal facility (IRCM, Montréal, Québec, Canada). *Boc^{+lacZ}* and *Cdon^{+lacZ}* mice were kindly provided by A. Okada and S.K. McConnell (Okada, et al., 2006) and were maintained on a C57Bl/6J background. Embryonic day 0 (E0) was defined as midnight of the night before a plug was found. All animal work was performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care Guidelines.

Reagents

Recombinant purified human ShhN (C24II; R&D systems, Minneapolis, USA) was used at 10 nM, a concentration which induces efficient RGC axon retraction (Fig. 3.11S). Smoothened antagonist (SANT-1) was purchased from Calbiochem and used at a final concentration of 137 nM (Chen, Taipale, Young, Maiti, & Beachy, 2002).

Retinal explant cultures

Eight-chamber culture slides (BD Falcon) were coated with 10 µg/ml poly-L-lysine (Sigma) for two hours at room temperature, washed three times with water and then coated overnight at 37°C with 6 µg/ml laminin (Invitrogen) in PBS. Retinas were dissected from E17.5-E18.5 rat embryos, or from E15.5-E17.5 mouse embryos. Each retina was cut into approximately 50 explants (average size of 300 µm). Explants were then transferred to the culture slides and cultured in serum-free medium (Neurobasal and DMEM/F12), supplemented with B27 (Invitrogen) and N2 (Invitrogen). Retinal explants were then

maintained at 37°C, 7.5% CO₂. Eighteen to twenty-two hours after being plated, 10 nM ShhN was added and live imaging was performed. Explants were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature for subsequent immunostaining.

Microscopy

Fluorescence and brightfield images were acquired with Leica DM6000 and DM4000 microscopes. Colocalization and *in utero* electroporation experiments were imaged with a Zeiss LSM 710 confocal microscope. Live cell imaging was performed on a Leica DMIRE2 inverted microscope equipped with a heated environmental chamber (37°C) and a MS-2000 XYZ automated stage (ASI, Eugene, OR). Time-lapse phase contrast images were acquired every 5 minutes using a 10X fluotar or 20X fluotar LD objective. All images were collected with an Orca ER CCD camera (Hamamatsu) using Volocity version 4.3 (Improvision, Waltham, MA).

Immunohistochemistry and histology

Immunohistochemistry was performed on 12 µm thick cryosections. Primary antibodies used were against: Boc (R&D), neurofilament heavy chain 2H3 (Developmental Studies Hybridoma Bank), Tag1 4D7 (Developmental Studies Hybridoma Bank), Zic2 (a gift from S. Brown (Brown, Kottmann, & Brown, 2003)), EphB1 (Santa Cruz), Brn3b (Santa Cruz), L1 (Millipore), Cdon (R&D), and GFP (Abcam). We also generated a rabbit anti-Boc antibody directed against the cytoplasmic tail of mouse Boc. Immunofluorescence images were visualized using secondary antibodies conjugated to Alexa 488 or Alexa 568 (Molecular Probes) and DAPI (Sigma). For DAB substrate immunostainings, sections were pre-treated with 2% peroxide for 20 minutes to block endogenous peroxydase. The signal

was detected using biotinylated secondary antibodies, ABC Vectastain Elite kit (Vector) and DAB substrate kit (Vector). Boc and Cdon expression was also detected in embryos heterozygous for the lacZ allele using X-gal histochemistry (Okada, et al., 2006). Histological analysis was performed on 12 μm thick cryosections stained with hematoxylin and eosin.

Analysis of Boc mutant retina

The number of cells expressing RGC specific markers was scored by averaging the number of positive cells in the VT retina from three E15 mouse retinal sections obtained from at least 3 embryos. The retinal areas quantified comprise a region of 200 μm in the VT retina, measured from the ciliary body. For the quantification of the cell number in the GCL and developing INL, we counted the cells within the respective layers of the VT area as observed by hematoxylin/eosin staining. For the developing INL, cells were distinguished based on their morphology and their specific location in the most basal part of the neuroblast layer.

Analysis of axonal retraction and growth cone collapse

For the analysis of axonal retraction using time-lapse imaging, only single axons that had grown over 200 μm outside of the retinal explants were analyzed because we have shown using different markers that these long axons are all RGC axons. Axons that contacted a cell or another axon were excluded from the analysis. For growth cone collapse assays, growth cones were fixed 20 minutes after ShhN addition, by adding an equal volume of 8% PFA to the medium containing the retinal explants, at room temperature for 15 min. RGCs were immunostained for Boc and with phalloidin (to label the growth cone).

The length of axons, the level of fluorescence and the area of growth cones were measured using Volocity.

Anterograde DiI Labeling

Anterograde labeling of RGC axons was performed on fixed tissue using DiI as described previously (Plump, et al., 2002). After DiI labeling, whole heads were sectioned at 30 μm . The sections were washed for 3 min in PBS and incubated for 10 min in DAPI at room temperature. The sections were then mounted in PBS and images taken immediately. For measurement of the relative ipsilateral projections, the area occupied by the optic nerve was selected and total DiI fluorescence was measured in this area. All images were acquired under conditions where the pixels were not saturated. The data for each animal is an average of four consecutive frontal sections of the optic tracts just caudal to the optic chiasm. Measurements were taken blind to the genotype.

In utero electroporation

In utero electroporation was performed essentially as described (Garcia-Frigola, Carreres, Vegar, & Herrera, 2007). To co-electroporate Boc and YFP, DNA solutions were prepared with equal amounts of YFP-expression plasmid (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and pCAGGS-mouse Boc expression plasmid (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Only the YFP plasmid was electroporated in the control conditions. The DNA solution was injected into the eye at E13.5 (*in utero*) and electroporated with 5 pulses (38V, 50 ms). Three days after electroporation (E16.5), the embryos were collected, their head were dissected and fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde. Heads were then frozen and sectioned horizontally. Subsequent immunohistochemistry was performed to enhance YFP signal using a chicken anti-GFP

antibody (Abcam).

Statistical Analysis

Data were analyzed and graphs generated using Prism 4 statistical software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). All error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistical significance was determined using two-tailed Student t-test.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

RESULTS

Ipsilateral RGCs express the Shh receptor Boc.

We have previously shown that guidance of commissural axons by Shh requires the Shh receptor Boc (Okada, et al., 2006). Because RGC axons also respond to Shh (Kolpak, et al., 2005; Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008; Trousse, et al., 2001), we hypothesized that this response might also occur via Boc, so we first assessed whether RGCs express Boc.

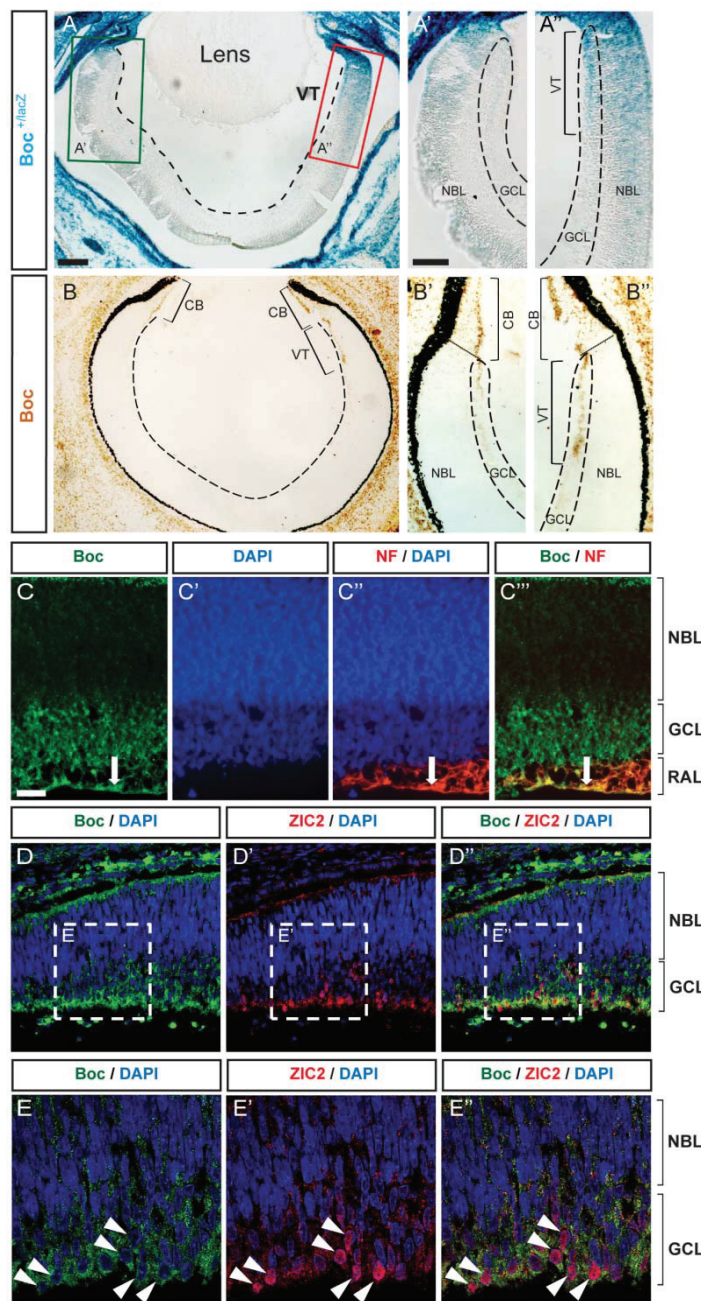
We characterized Boc expression using our mice harboring a lacZ reporter gene targeted to the Boc locus (*boc*^{lacZ/+} mice) (Okada, et al., 2006). Using beta-galactosidase activity histochemistry on sections of developing retina from embryonic day 15.5 (E15.5) mouse embryos, we detected a strong enrichment of Boc expression in the ventro-temporal (VT) crescent of the retina (Fig. 3.1A). This expression was present in the ganglion cell layer (GCL) and the neuroblast layer (NBL) of the retina, suggesting expression in both retinal ganglion cells (RGC) and retinal progenitors, respectively (Fig. 3.1A'-A''). We also detected Boc expression in the ciliary bodies (CB), which are neurogenic niches located at the periphery of the retina. Cdon, another Shh receptor closely related to Boc (Okada, et al., 2006), is also expressed in RGCs but, in contrast to Boc, the Cdon-positive cells were distributed throughout the entire retina and did not show VT enrichment (Fig. 3.8S).

We next assessed Boc protein expression by immunohistochemistry. In agreement with the reporter gene analysis, we found that Boc protein is highly enriched in the VT crescent of the retina (Fig. 3.1B-B''). Boc protein appears to be preferentially located in the GCL of the retina, suggesting that it is mostly present in RGCs. Using later stage rat E17.5

retina sections, we confirmed that Boc is strongly expressed in the GCL, where RGC somas are located, and in the RGC axon layer (RAL), where RGC axons are located (Fig. 3.1C). The axonal localization of Boc was further confirmed by co-localization with neurofilament (NF), a specific marker of RGC axonal projections in the retina (Fig. 3.1C’'). Together, these results indicate that Boc is expressed by VT RGCs.

Contrary to other RGCs of the retina, the majority of RGCs of the VT crescent do not cross the optic chiasm and, instead, project ipsilaterally (Petros, et al., 2008). Hence, the highly restricted expression of Boc to RGCs of the VT crescent suggested that Boc might be expressed in RGCs that project ipsilaterally. To test this, we performed co-localization studies of Boc and Zic2, a nuclear marker of ipsilateral RGCs (Herrera, et al., 2003). We observed an enrichment of Zic2 in the VT retina and a strong co-localization with Boc positive cells (Fig. 3.1D-E). EphB1, a receptor expressed by ipsilateral RGCs and important for their repulsion away from the optic chiasm (Williams, et al., 2003), also colocalized with Boc, both in RGC soma and axons (Fig. 3.9S). Taken together, these results indicate that Boc is enriched in VT RGCs and that ipsilateral RGCs express Boc.

Shh causes the retraction of RGC axons *in vitro* (Kolpak, et al., 2005; Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008; Trousse, et al., 2001) and it is present in the chiasmatic zone (Marcus, et al., 1999; Torres, et al., 1996; Trousse, et al., 2001; Wallace & Raff, 1999). Based on this data and on our finding that Boc is expressed in ipsilateral RGCs, we hypothesized that Boc might function as a Shh receptor which prevents these axons from crossing the optic chiasm. We thus investigated whether Shh could control the behavior of ipsilateral RGC axons.



membranous expression of Boc in the GCL (**E-E''**). CB, ciliary body; GCL, ganglion cell layer; NBL, neuroblast layer; RAL, RGCs axons layer; VT, ventro-temporal retina. Scale bars: **A**, 100 μ m; **A'-A''**, 50 μ m; **C-C'''**, 20 μ m.

Figure 2. 1. Shh specifically regulates axon and growth cone dynamics of Boc-expressing RGCs.

Boc is preferentially expressed in ipsilateral RGCs. **A-B''**, Boc expression detected by (**A-A''**) β -gal histochemistry in Boc^{+lacZ} mice and (**B-B''**) immunohistochemistry with an antibody against Boc (goat anti-Boc) in E15 horizontal section of the mouse retina. Both methods show a strong enrichment of Boc in the ventro-temporal (VT) retina as shown in **A''** and **B''**. **C-C'''**, Boc (green, rabbit anti-Boc antibody) is expressed by RGC cell bodies in the ganglion cell layer (GCL) and is present in the retinal axon layer (RAL) of the VT. Boc colocalizes with neurofilament (NF) on the axons of RGCs in the RAL (arrow; **C-C'''**) (Horizontal sections of E17 rat retina). **D-D''**, Zic2 positive cells (red) colocalize with Boc (green, goat anti-Boc antibody) in the VT crescent of E15 mouse retina (horizontal sections). Higher magnification of the boxed regions from **D-D''** shows the nuclear localization of Zic2 surrounded by

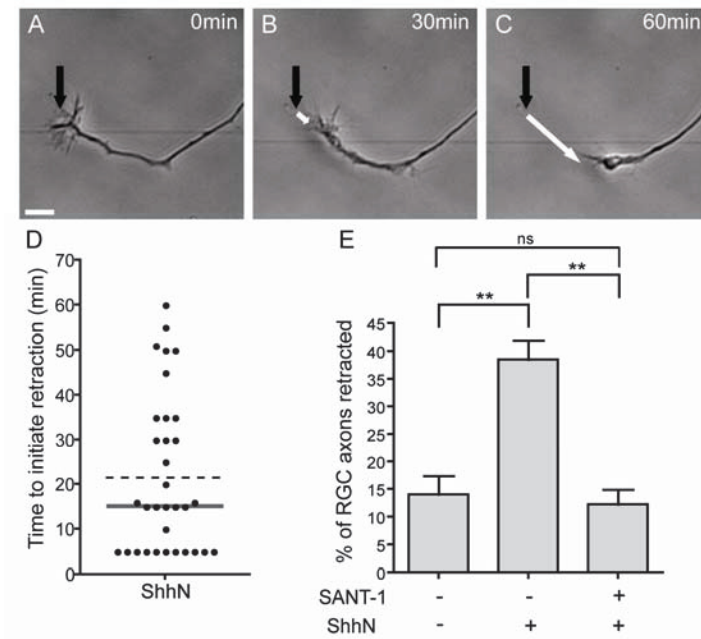


Figure 2. 2. Shh induces the rapid retraction of a subset of RGC axons.

E17 rat retinal explants were cultured for 24 hours, which allows RGC axons to elongate long distances out of the explant. *A-C*, Time-lapse images showing the retraction of an RGC axon following addition of 10 nM ShhN. *A*, Morphology of an RGC axon and growth cone at the time of ShhN addition. The black arrow points to the initial position of the growth cone. *B*, The growth cone starts to collapse. *C*, The growth cone has completely collapsed and the axon is strongly retracting. *D*, Time for a growth cone to initiate retraction in response to ShhN. The plot shows a sample of 33 RGC axons from 4 different experiments. The bar indicates the median time to initiate retraction (15 min). The dashed line indicates the mean time to initiate retraction (22 min). *E*, Quantification of the percentage of axons that exhibit net retraction 90 min after ShhN treatment. ShhN induces an increase in the percentage of axons with net retraction from 14.0% to 38.5% ($p < 0.01$). This effect is completely blocked by adding an inhibitor of Smoothed (SANT-1, 137 nM) one hour before ShhN treatment (12.2% of RGC axons show net retraction; $p < 0.01$) (one way ANOVA with Bonferroni's post test, $** = p < 0.01$). The mean % of retracted axons was quantified from at least 3 independent experiments for each condition, with at least 4 retinal explants per condition per experiment. Error bars indicate SEM. Scale bar, 10 μm .

Many of the experiments implicating a role for Shh in the guidance of RGC axons were performed over a long time period (24-48 hr) and therefore did not distinguish between short-term, direct effects and long-term, indirect effects of Shh on the growth cone of these axons (Kolpak, et al., 2005; Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008; Trousse, et al., 2001). Moreover, it is not clear whether Shh has a direct effect on all RGC axons, or only on a subpopulation of RGCs. To address this, we cultured retinal explants and performed time-lapse analysis of RGC axon behavior in response to Shh. Using markers of RGC axons, we confirmed that the long projections growing out of RGC explants were exclusively RGC axons (Fig. 3.10S). In basal conditions (in the absence of Shh), most RGC axons exhibited net axonal growth over a period of 90 min, with only $14.0 \pm 3.3\%$ of axons exhibiting a net retraction during this period (Fig. 3.2). This reflects the normal dynamics of axon growth and retraction also observed with other neuron types (Yam, Langlois, Morin, & Charron, 2009). Addition of 10 nM ShhN, a concentration previously shown to induce turning of commissural axons (Yam, et al., 2009), led to a significant increase in the number of axons exhibiting net retraction over a 90 min period, with an almost 3-fold increase to $38.5 \pm 3.4\%$ of axons retracting (Fig. 3.2E and 3.11S). These results indicate that only a subset [comprising about 24.5% ($38.5\% - 14.0\%$)] of RGC axons retract in response to Shh. Of the neurons which responded to Shh, we observed that addition of Shh caused their growth cones to collapse and their axons to rapidly begin to retract, with a median time to initiate retraction of 15 min (Fig. 3.2D). Addition of SANT-1, a specific Smo inhibitor (Chen, et al., 2002), completely blocked the effect of Shh (Fig. 3.2E), indicating that Shh-induced retraction requires Smo activity.

Figure 2. 3. Shh specifically regulates axon and growth cone dynamics of Boc-expressing RGCs.

A, Immunofluorescent labelling of RGC axons from E17 rat retinal explants shows the presence of high Boc (rabbit anti-Boc antibody) levels in a subpopulation of RGC axons (arrow), while most of the axons exhibit no or low Boc levels (arrowhead). *B*, Immunofluorescent labelling shows that the Shh signalling mediator Smoothed (Smo) is present on RGC axons. *C*, ShhN induces the growth cone collapse of RGC axons exhibiting high levels of Boc. Immunofluorescent labelling of Boc protein (green, rabbit anti-Boc antibody) in RGC growth cones (arrow), co-labelled with the F-actin marker phalloidin (red) to delineate the morphology of the growth cone. Upper panels: The growth cones of RGC axons expressing high levels of Boc remain uncollapsed 20 min after control treatment. Lower panels: In contrast, 20 minutes after ShhN addition, RGC axons expressing a high level of Boc (arrow) have a collapsed growth cone, whilst the growth cone of RGC axons expressing no or low levels of Boc (arrowhead) are not sensitive to ShhN and do not collapse. Addition of control medium does not affect the size of RGC growth cones with high level of Boc (upper panels). *D*, Quantification of the collapse response from *C*. Measurement of the size of the RGC growth cone area (in μm^2) 20 minutes after treatment with control medium (white bars) or ShhN (grey bars) shows a significant reduction in the area of RGC growth cones that express a high level of Boc when treated with ShhN. In contrast, RGC growth cones with no/low Boc levels do not have a significant change in area in response to ShhN. $n=87$ growth cones. Error bars indicate SEM (one way ANOVA with $p<0.05$). *E*, Boc is required to mediate Shh-induced retraction of axons. Retinal explants isolated from $\text{Boc}^{+/-}$ and $\text{Boc}^{-/-}$ E15.5 embryos were cultured for 24 hr. RGC axon dynamics were analysed by time-lapse microscopy after addition of 10 nM ShhN. The percentage of RGC axons exhibiting net retraction 90 min after ShhN treatment was significantly higher for $\text{Boc}^{+/-}$ RGCs treated with ShhN (30.6%) than those treated with control medium (7.5%, $p=0.0002$), while $\text{Boc}^{-/-}$ RGC axons treated with ShhN were not significantly different from $\text{Boc}^{-/-}$ RGCs treated with control medium ($p>0.05$) (one way ANOVA with Bonferonni's post test, $\text{ns}=p>0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$). Error bars indicate SEM. Scale bar, 10 μm .

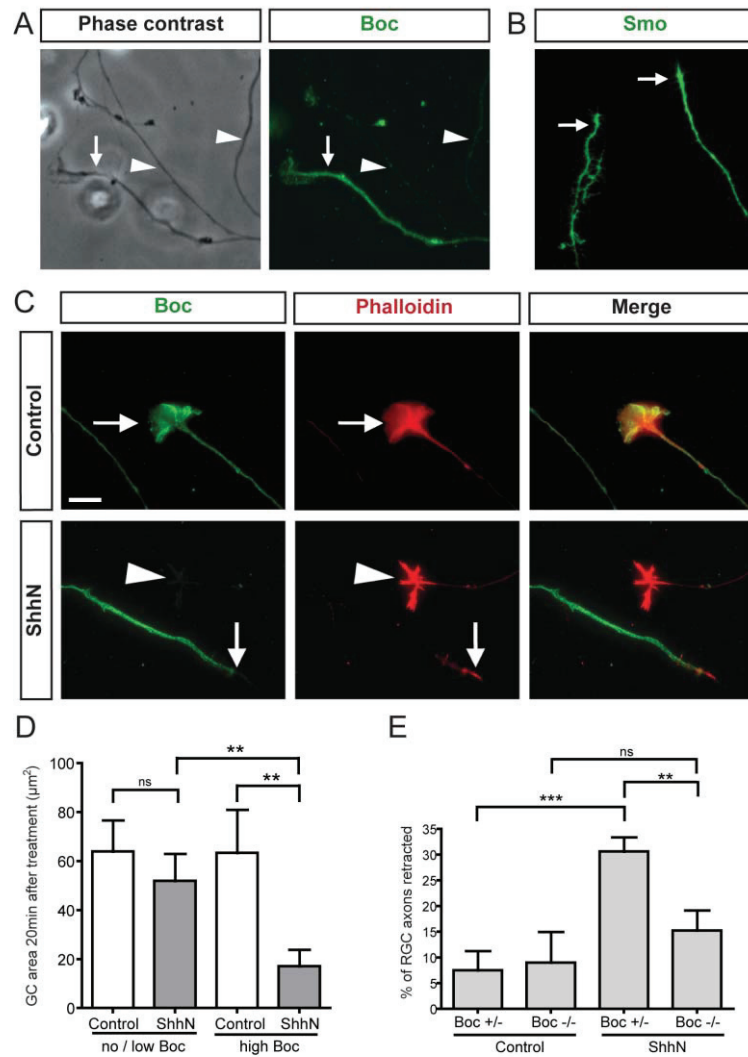


Figure 2. 3. Shh specifically regulates axon and growth cone dynamics of Boc-expressing RGCs.

We next tested whether the subset of RGC axons that retract in response to Shh corresponds to a specific and identifiable subpopulation of RGCs. Since Boc is expressed in ipsilateral RGCs (Fig. 3.1) and has been implicated in the guidance of commissural axons, we assessed whether the RGCs responding to Shh correspond to a Boc-expressing subpopulation.

Immunofluorescent staining of RGC axons showed that Boc and Smo proteins are present in the axon and the growth cone of RGCs (Fig. 3.3A-C), similar to commissural neurons (Okada, et al., 2006). Consistent with the restricted expression of Boc observed on retina sections (Fig. 3.1), we found that only a subpopulation (24.8%) of RGC axons express Boc *in vitro* (Fig. 3.3A,C), while the other RGCs expressed undetectable (or very low) levels of Boc (thereafter referred to as “no/low Boc”). Of interest, the percentage of RGC axons expressing high levels of Boc was similar to the percentage of axons responding to Shh *in vitro* (24.8% versus 24.5%, respectively), raising the possibility that they might correspond to the same population.

To directly test whether the RGCs expressing Boc might be the ones responding to Shh *in vitro*, we compared the growth cone collapse activity of Shh on no/low Boc growth cones *versus* growth cones expressing high Boc levels. This was performed 20 minutes after the addition of Shh, at an early phase of the response when the growth cones had already collapsed but the axons were only beginning to retract. Only the growth cones with high level of Boc collapsed following Shh addition, while nearby growth cones not expressing Boc did not collapse (Fig. 3.3C-D, Fig. 3.12S). Hence, Boc-expressing RGCs collapse in response to Shh, but RGCs not expressing Boc do not.

To test whether Boc is required to mediate the response of RGCs to Shh, we performed Shh retraction assays on mouse retinal explants isolated from Boc mutant embryos (Okada, et al., 2006). In the absence of Shh, RGC axons in explants from Boc heterozygous and Boc mutant embryos had the same basal percentage of retracted axons after 90 min (Fig. 3.3E), indicating that Boc is not required for their Shh-independent dynamics. Upon addition of Shh, RGC axons from Boc heterozygous explants had a significant increase in retraction compared to the control group ($30.6 \pm 2.6\%$ versus $7.5 \pm 3.8\%$, respectively, $p < 0.001$). However, RGC axons from Boc mutant explants did not show a significant increase in their retraction compared to the control untreated Boc mutant explant group ($p = 0.399$). Taken together, these results indicate that the Boc-expressing RGCs are the RGCs responsive to Shh and that Boc is required in these neurons to mediate their retraction response to Shh.

Boc mutant mice have normal retinal cell fate.

Our *in vitro* results raised the possibility that Boc might play a role in the guidance of ipsilateral RGC axons *in vivo*. However, since Shh also controls the proliferation and differentiation of RGCs (Jensen & Wallace, 1997; Locker, et al., 2006; Lupo, et al., 2005; Y. Wang, Dakubo, Thurig, Mazerolle, & Wallace, 2005; Zhang & Yang, 2001), it was important to first assess whether Boc mutant retinas are generated normally, before analyzing Boc-dependent axon guidance in these animals. To address this, we analyzed layer formation and cell fate specification in Boc mutant retina (Fig. 3.4). We counted the number of cells in the GCL and in the inner nuclear layer (INL). No difference was observed between wild-type, Boc^{+/-} and Boc^{-/-} retinas (Fig. 3.4D-E). We used multiple RGC

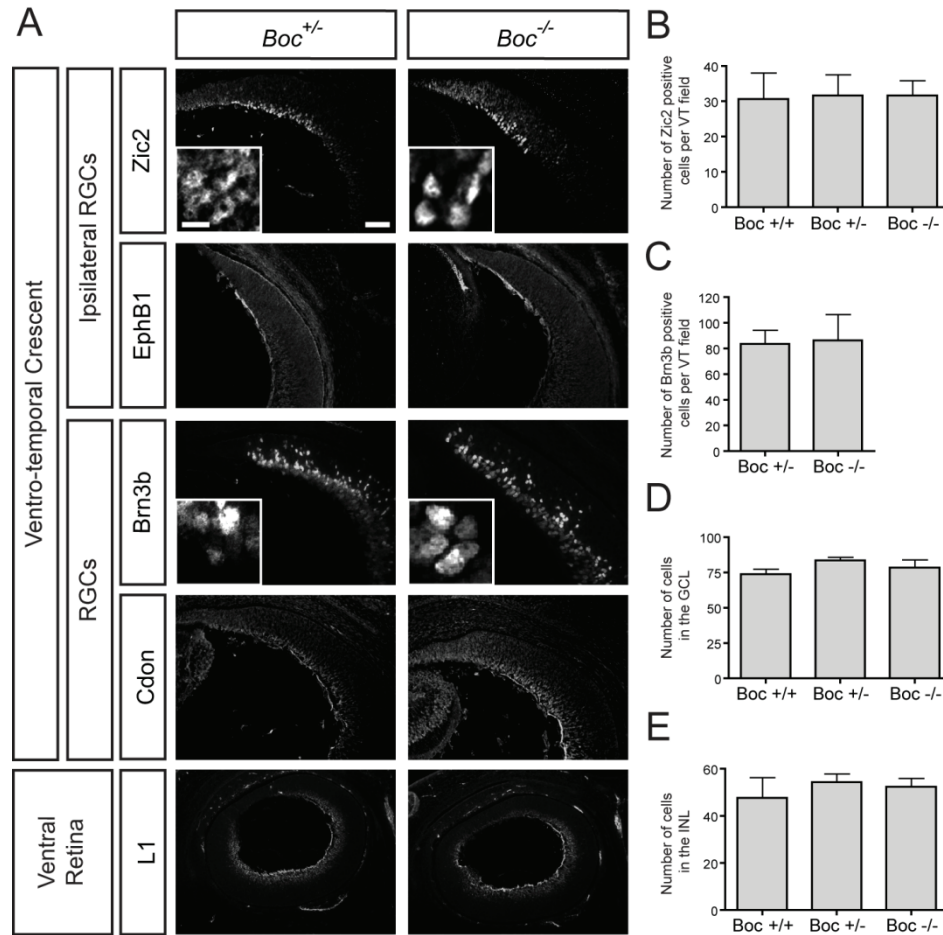


Figure 2. 4. *Boc* mutant mice have normal retinal cell fate.

A, Horizontal sections of mouse E15 ventral retina from *Boc*^{+/+} and *Boc*^{-/-} mice were stained with various RGC markers. *Zic2* is an ipsilateral RGC nuclear marker. *EphB1* is an axonal marker of ipsilateral RGCs. *Brn3b* is a general RGC nuclear marker. *Cdon* labels RGCs and their axons. The lowest panels show cross sections of the whole ventral retina (with the temporal side up) stained with *L1*, a marker of all RGC axons. None of these markers appears to be different in *Boc*^{-/-} retina compared to *Boc*^{+/+} retina. Insets represent a zoom in of the GCL. **B**, Quantification of the number of *Zic2* positive RGCs shows that the number of ipsilateral RGCs is similar between *Boc*^{+/+}, *Boc*^{+/-} and *Boc*^{-/-} retina. **C**, Quantification of the number of *Brn3b* positive RGCs shows that the number of RGCs in the VT region is similar between *Boc*^{+/+} and *Boc*^{-/-} retina. **D-E**, The number of cells in the VT region of the GCL (**D**) and the developing INL (**E**) is not significantly different between wild-type, *Boc*^{+/-} and *Boc*^{-/-} retina. $n \geq 3$ embryos for each genotype. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer. Scale bars, 50 μ m; insets, 10 μ m.

markers, including two general RGC markers (Brn3b and L1) and two ipsilateral-specific RGC markers (Zic2 and EphB1), to assess the integrity of RGC cell fate specification in Boc mutant retina. We also looked at the expression of Cdon, which is expressed in the majority of RGCs. All the markers analyzed were expressed in a similar pattern and at similar levels in Boc^{+/-} and Boc^{-/-} retina (Fig. 3.4A). Counting the number of RGCs (using Brn3b as a marker) present in the VT did not reveal any difference between Boc^{+/-} and Boc^{-/-} retinas (Fig. 3.4C). Importantly, the number of Zic2 positive ipsilateral RGCs generated was the same in wild-type, Boc^{+/-} and Boc^{-/-} retinas (Fig. 3.4B). Thus, Boc mutant retinas have no apparent defects in layer formation, RGC number, and RGC fate specification, indicating that the growth and differentiation effects of Shh in the retina are not mediated by Boc.

Normal segregation of ipsilateral axons at the optic chiasm requires Boc.

If Boc is required *in vivo* for ipsilaterally-projecting RGC axons to respond to Shh present at the diencephalon midline, it would be predicted that the ipsilateral projections of Boc mutant mice would have pathfinding defects. To test whether Boc is required *in vivo* for the guidance of ipsilaterally-projecting RGC axons at the chiasm, we performed complete mono-ocular DiI-filling of the retina of E18 mouse embryos to estimate the relative proportion of axons entering the contralateral versus the ipsilateral optic tract (Plump, et al., 2002; Williams, et al., 2003). After allowing the dye to diffuse, we cut frontal sections caudal to the optic chiasm, and quantified the amount of DiI fluorescence signal in the contralateral and ipsilateral optic tracts (Fig. 3.5B). This analysis revealed that

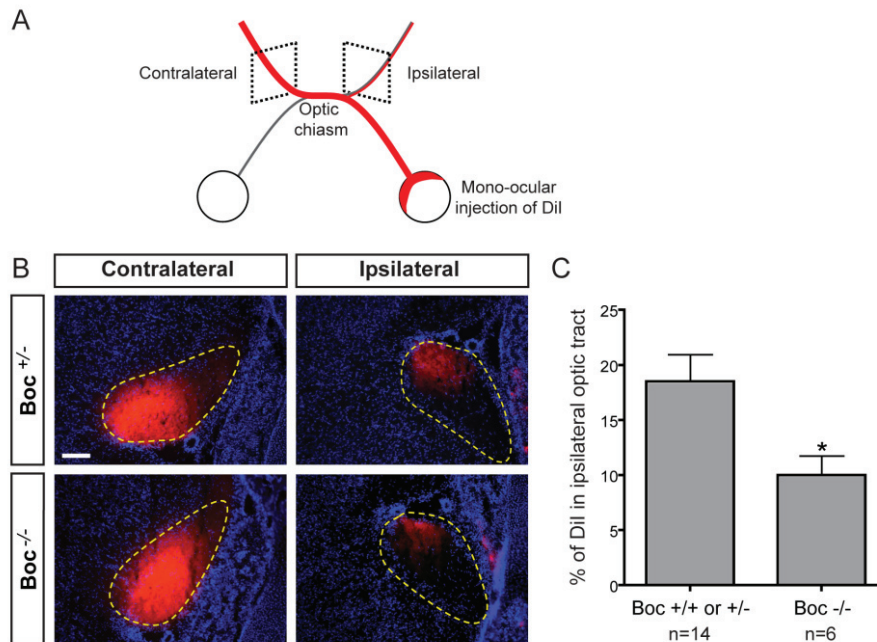


Figure 2. 5. Normal segregation of ipsilateral axons at the optic chiasm requires *Boc*.

A, Schematic of the rostral part of the E18.5 mouse visual system after mono-ocular injection of DiI crystals (red) in the whole retina. *B*, Coronal sections of E18.5 *Boc*^{+/-} and *Boc*^{-/-} optic tracts after mono-ocular injection of DiI crystals (red) and counterstaining with DAPI (blue). The optic tracts are circled with yellow dashed lines. The DiI intensity is lower in the ipsilateral tract of *Boc*^{-/-} compared to *Boc*^{+/-} mice. Note that although these images show saturated pixels for ease of viewing the faint ipsilateral signal, the quantification was performed on unsaturated images. *C*, Quantification of the percentage of DiI signal in the ipsilateral optic tract as a proportion of the total DiI signal from the contralateral and ipsilateral optic tract reveals a significant decrease in ipsilateral projections in *Boc*^{-/-} mice compared to control (*Boc*^{+/-} or *Boc*^{+/+}) mice [18.5±2.5% (n=14 embryos) and 10.0±1.8% (n=6), respectively; p<0.05 using Student's unpaired *t* test]. Scale bar, 100 μm.

the percentage of ipsilateral axon signal [calculated by dividing the ipsilateral axon signal over the total signal (ipsilateral + contralateral)] in mice heterozygous and wild-type for Boc was $18.5 \pm 2.5\%$ (Fig. 3.5C), consistent with values previously determined by others using the same technique (17%) (Williams, et al., 2003). However, in mice homozygous for the Boc mutation, the percentage of ipsilateral axon signal was strongly reduced with only $10.0 \pm 1.8\%$ of the DiI signal in the ipsilateral optic tract. These results indicate that the lack of Boc leads to a reduction in the number of axons in the ipsilateral optic tract and provide evidence that Boc is required *in vivo* for the normal segregation of ipsilateral projections at the optic chiasm.

Ectopic Boc expression in contralateral RGCs prevents their axons from crossing the optic chiasm.

We next asked whether Boc expression is sufficient to determine RGC axon choice at the optic chiasm. Using *in utero* electroporation, we introduced vectors encoding either yellow fluorescent protein (YFP) or a combination of Boc and YFP in RGCs at E13.5, just before the peak phase of RGC axon growth (Petros, et al., 2008). We analyzed the trajectories of RGC axons at the optic chiasm at E16.5, a time when most RGC axons from the peak phase have projected beyond the chiasm. Using this approach, only the nasal retina was targeted for electroporation, leading to expression exclusively in contralaterally-projecting RGCs (Fig. 3.6B), and their axons could be followed far past the chiasm in the optic tract (Garcia-Frigola et al., 2007). Axons expressing YFP alone projected contralaterally and only very rarely entered the ipsilateral optic tract or contralateral optic nerve (Fig. 3.6D-F).

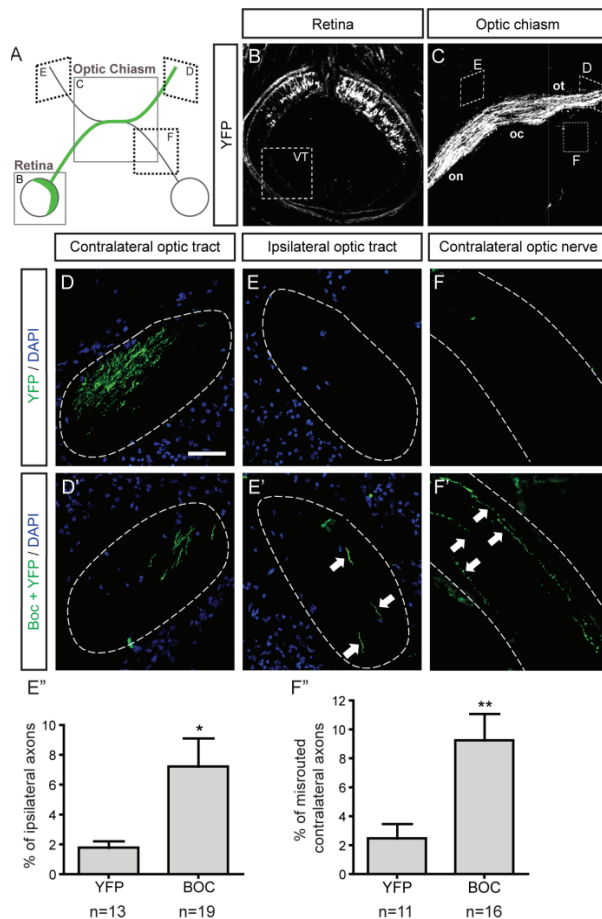


Figure 2. 6. Ectopic Boc expression in contralateral RGCs prevents their axons from crossing the optic chiasm.

A, Schematic of the rostral part of the E16.5 mouse visual system, 3 days after *in utero* electroporation of the retina at E13.5. The position of the retina (**B**) and the optic chiasm (**C**) are indicated by the boxes. The green line indicates the normal path of YFP-electroporated contralateral RGC axons. **B**, Horizontal section of an E16.5 mouse retina 3 days after electroporation. Due to electrode positioning, the VT region never contained YFP positive cells. **C**, Control axons expressing YFP alone exhibit normal axon pathfinding, crossing the optic chiasm and reaching the contralateral optic tract (**D**). They very rarely enter (**E**) the ipsilateral optic tract ($1.8 \pm 0.4\%$, **E''**) or (**F**) the contralateral optic nerve ($2.5 \pm 1.0\%$, **F''**). **D-D'**, Semi-perpendicular sections of the contralateral optic tract. **E-E'** Semi-perpendicular sections of the ipsilateral optic tract. **F-F'** Parallel sections of the contralateral optic

nerve. When Boc is co-electroporated with YFP (Boc+YFP), Boc+YFP expressing axons enter the ipsilateral optic tract (**E'**) and contralateral optic nerve (**F'**) at a higher frequency. **E''-F''**, Quantification of the percentage of misguided RGC axons over the total number of electroporated axons. **E''**, Histogram showing that the percentage of ipsilateral axons is significantly increased (by 4 fold, $p=0.0262$ using Student's unpaired *t* test) when RGCs express Boc+YFP compared to YFP alone (YFP, $n=13$; Boc, $n=19$ embryos). **F''**, Histogram showing that the percentage of axons re-entering the contralateral optic nerve is significantly higher (by 3.7 fold, $p=0.0085$ using Student's unpaired *t* test) in RGCs expressing Boc+YFP compared to YFP alone (YFP, $n=11$; Boc+YFP, $n=16$ embryos). VT, ventro-temporal retina; on, optic nerve; oc, optic chiasm; ot, optic tract. Scale bar, 100 μm .

When YFP was co-expressed with Boc, two types of defects, both consistent with a role for Boc in preventing contralateral RGC axons from crossing the optic chiasm, were observed. First, we observed that many Boc-electroporated axons failed to pass the chiasm; instead these axons re-entered in the contralateral optic nerve towards the eye (Fig. 3.6F'). This phenotype was observed in almost all (93%) of the Boc-electroporated embryos and represented $9.3 \pm 1.8\%$ of all Boc-electroporated RGC axons, compared to $2.5 \pm 1.0\%$ in YFP controls (Fig. 3.6F). In these experiments, Boc expression in presumptive contralaterally-projecting RGCs appears to render them sensitive to Shh-mediated repulsion, thus making their axons avoid the chiasm and enter the contralateral optic nerve.

The second type of defect that we observed in Boc-electroporated axons was an increase in ipsilateral projections at the chiasm. In the YFP control condition, $1.8 \pm 0.4\%$ of the total number of axons projected to the ipsilateral optic tract (Fig. 3.6E). When Boc was electroporated, we observed a 4-fold increase in the percentage of ipsilateral axons, with an average of $7.2 \pm 1.9\%$ exhibiting this behavior (Fig. 3.6E'), indicating that Boc expression in contralateral RGCs prevents their axons from crossing the optic chiasm, and they instead project ipsilaterally. This phenotype was observed in 67% of the Boc-electroporated embryos. Of note, a similar increase in ipsilaterally-projecting axons has been observed in EphB2 and EphB1 gain of function experiments, with 3- and 6-fold increase, respectively, when EphB2 or EphB1 are ectopically expressed in contralaterally-projecting RGCs, compared to control (Petros, Shrestha, & Mason, 2009). These results suggest that, similarly to EphB1 and EphB2, Boc expression is sufficient to re-route contralaterally-projecting into ipsilaterally-projecting RGC axons at the chiasm.

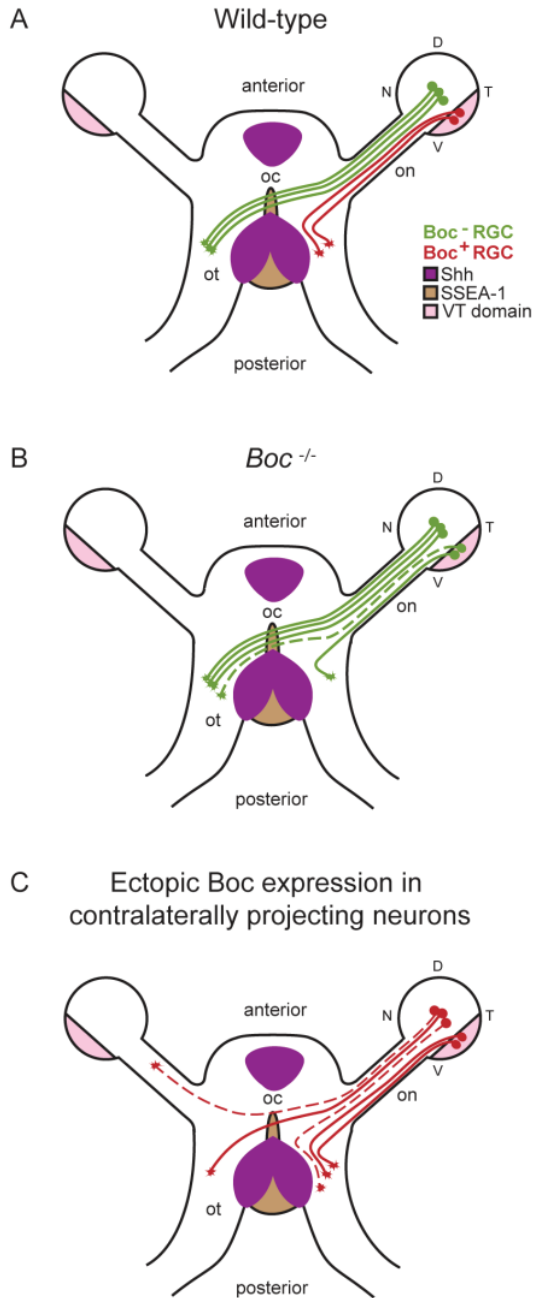


Figure 2. 7. Summary of the *Boc* gain and loss of function phenotypes at the chiasm.

A, In wild-type conditions, axons expressing *Boc* (red) originate from the VT retina and avoid *Shh* at the optic chiasm. **B**, In *Boc* mutant mice, VT axons do not express *Boc* and fail to detect *Shh* at the midline. Instead of being repelled by *Shh*, they cross the chiasm and project contralaterally (represented by the dashed line). **C**, Ectopic expression of *Boc* in presumptive contralateral RGCs prevents their axons from crossing the optic chiasm. Two types of defects were observed: the conversion of contralateral projections into ipsilateral projections and the misrouting of axons to the contralateral optic nerve (represented by the dashed lines). V, ventral; D, dorsal; N, nasal; T, temporal; on, optic nerve; oc, optic chiasm; ot, optic tract.

DISCUSSION

We have previously shown that Boc, a Shh receptor which has an extracellular domain architecture homologous to other guidance receptors such as Robos and DCC, is required for the guidance of commissural axons by Shh (Okada, et al., 2006). In this paper, we present evidence supporting a role for Boc in mediating the guidance effect of Shh on ipsilateral-projecting RGCs. First, we found that Boc is expressed in *Zic2*⁺ and *EphB1*⁺ RGCs, confirming that Boc is expressed in ipsilateral RGCs. Second, to test whether the Boc⁺ subpopulation of RGCs responds to Shh, we cultured retinal explants and found that only Boc positive growth cones collapsed in response to Shh. Third, using our RGC retraction assay, we found that Shh-mediated retraction requires Boc, as the response is lost in Boc mutant RGCs. That Shh-mediated growth cone collapse and retraction occur rapidly (within 20 min) supports a direct effect of Shh on these axons. *In vivo*, using anterograde labeling of RGC axons in Boc mutant mice, we show that Boc is required for the normal segregation of ipsilateral axons in the optic chiasm (Fig. 3.7), and conversely, we show that Boc expression in presumptive contralateral RGCs induces misrouting of their axons at the optic chiasm, suggesting that Boc is sufficient to confer Shh sensitivity to these axons. Taken together, these results suggest that Shh repels ipsilateral RGC axons at the optic chiasm via its receptor Boc. This work identifies a novel molecular pathway required for the segregation of ipsilateral axons at the optic chiasm.

The roles of Shh in the guidance of RGC axons

Previous studies have supported a role for Shh in the guidance of RGC axons. Earlier work in chick proposed that Shh, which is expressed in the diencephalic ventral midline, acts as a repellent to guide RGC axons through the optic chiasm (Trousse, et al., 2001). Recently, it has been shown that Shh has different effects on the outgrowth and growth cone size of RGC neurites depending on their origin (dorso-nasal vs VT), with Shh promoting the growth of VT retinal explants over 24-48 hr (Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008). Our *in vitro* experiments show that the ability of RGCs to respond to Shh in the short term depends on the expression of Boc, and it remains to be determined whether the longer-term increase in outgrowth previously observed in VT-derived neurites also depends on Boc.

In addition to *in vitro* experiments, *in vivo* experiments have also suggested a role for Shh in mouse RGC axon pathfinding (Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008). Injection of E13.5 mouse embryos with an hybridoma producing a Shh-blocking antibody (and analyzed at E18.5) alters the distribution of RGC axons at the optic chiasm with an enlargement of the overall region occupied by RGC fibers at the midline and axon extension in aberrant directions. However, as Shh activity is important to pattern the midbrain regions surrounding the ventral hypothalamus (just adjacent to the optic chiasm) during retinal axon development (Barresi, Hutson, Chien, & Karlstrom, 2005; Dale, et al., 1997; Manning, et al., 2006), it is likely that blocking Shh signaling for 5 days in developing embryos can cause patterning defects. Thus, as noted by the authors (Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008), it is possible that the effects observed are not due to a direct guidance effect of Shh but rather to changes in expression of other guidance cues. In a

second set of experiments, an inhibitor of the Shh signaling mediator Smo was electroporated in the developing mouse visual system at E13.5 and analyzed at E16.5 (Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008). Electroporated presumptive contralaterally-projecting RGC axons exhibited growth and guidance defects, suggesting that Shh functions cell-autonomously to control the pathfinding of these axons. However, this experiment did not assess whether ipsilaterally-projecting RGC axons are guided normally at the chiasm in these conditions and, therefore, whether Shh signaling guides ipsilateral projections *in vivo* remained unknown until now.

Our *in vivo* data indicate that Boc is required for the normal segregation of ipsilateral axons in the optic chiasm, but not for RGC fate specification. Although we have not shown that, *in vivo*, the role of Boc is dependent on its ability to bind Shh, based on our *in vitro* experiments showing that Boc is required for the axonal response of RGCs to Shh, we propose that Boc functions as a Shh receptor to prevent ipsilateral RGC axons from crossing the optic chiasm.

In contrast to Sanchez-Camacho and Bovolenta, we found that, *in vitro*, only Boc positive RGC axons retract in response to Shh and that this response is dependent on Boc. Additionally, Sanchez-Camacho and Bovolenta did not observe an induction of VT explant growth cone collapse by Shh. One possibility for this discrepancy is that they did not look specifically at ipsilaterally-projecting RGCs. Additionally, differences in the methods used to quantify growth cone collapse, the origin of the retinal tissue (mouse E14.5 versus rat E17), the concentration of laminin, and the concentration of Shh used to induce collapse might explain the difference between the results, with the laminin concentration and Shh concentration both potentially affecting the sensitivity of the cells to collapse in response to

Shh. Although we did not see any effect of Shh on Boc negative RGCs *in vitro*, our results do not exclude a role for Shh-mediated guidance of contralaterally-projecting RGCs *in vivo* (Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008) or that Shh might have longer term growth effects on contralaterally-projecting RGCs. However, as Boc is not expressed in these RGCs, the identity of the Shh receptor mediating this effect of Shh on contralaterally-projecting axons remains to be determined.

Boc is a bifunctional axon guidance receptor for Shh.

We have previously shown that Boc is required for the attraction of spinal cord commissural axons by Shh (Okada, et al., 2006). Here, our data show that Boc is required for the retraction response of ipsilateral RGC axons to Shh. Thus, Boc is required to mediate both positive (attraction) and negative (retraction) guidance effects of Shh. This is similar to other axon guidance receptors, which can also mediate positive and negative effects. The opposite effects of Shh on commissural and RGC axons might be due to modulation of the response by an intrinsic and/or extrinsic factor. For example, extrinsic factors can convert Netrin attraction to repulsion by modulating cyclic nucleotide levels (Hopker, Shewan, Tessier-Lavigne, Poo, & Holt, 1999). Alternatively, it is also possible that these two effects are mediated by distinct Boc receptor complexes that result in opposite guidance effects – a possibility that also has a precedent in the case of Netrin/UNC-6, which attracts axons by activating DCC/UNC-40 family receptors, but becomes a repellent when UNC5h/UNC-5 family receptors are present (Hamelin, Zhou, Su, Scott, & Culotti, 1993; Hong, et al., 1999). Further experiments will be required to

determine the molecular mechanism underlying this differential effect of Shh on commissural and RGC axons.

A novel molecular pathway required for the segregation of ipsilateral RGC axons at the optic chiasm.

Although other molecules in addition to EphBs/ephrin-Bs have been shown to play a role in the guidance of RGC axons, none of them have been shown to control the ipsilateral guidance decision of RGCs (Petros, et al., 2008). For example, *in vitro*, contralaterally- and ipsilaterally-projecting axons do not respond differentially to inhibition of EphA signaling (as they do for EphB signaling) (Marcus, Matthews, Gale, Yancopoulos, & Mason, 2000) and, *in vivo*, no evidence for abnormal chiasm guidance have been observed in Ephrin-A mutant mice (Feldheim, et al., 2000; Haustead, et al., 2008). Additionally, the Slit proteins, through their Robo receptors, channel RGC axons into their normal paths and regulate their fasciculation, but normal ipsilateral projections form in the Slit1;Slit2 mutant mice (Plump, et al., 2002). Finally, Nr-CAM mediates midline crossing of contralateral axons, but does not affect the guidance of ipsilateral axons (Williams, et al., 2006). Since the EphBs/ephrin-Bs account for the pathfinding of only half of the ipsilateral projections, other factors which regulate ipsilateral segregation remained to be identified.

Our results indicate that, similarly to EphB receptors, Boc is required *in vivo* for the proper segregation of ipsilateral projections at the optic chiasm. Importantly, this effect is not due to a decrease in the number of ipsilateral RGCs generated or to the loss of EphB1 receptor expression. Therefore, we propose that signaling through the Boc receptor is a

novel molecular mechanism required for the segregation of ipsilateral RGC axons at the optic chiasm.

We show that the Boc knock-out has an approximately 50% reduction in the size of the ipsilateral optic tract. This indicates that Boc is not required for all of the ipsilateral axons to segregate at the optic chiasm. Similarly, a partial phenotype was also observed in the EphB1;EphB2;EphB3 triple knock-out (Williams, et al., 2003). These observations are consistent with two models. In the first model, EphBs and Boc could function in two different subpopulations of ipsilateral RGCs and each receptor could account independently for the ipsilateral segregation of their subpopulation. In this model, the 50% of ipsilateral axons still projecting normally in the Boc mutant mice would be an EphB-dependent subpopulation, and vice versa in the EphBs mutant mice. In the second model, EphBs and Boc could both function in the whole population of ipsilateral RGCs and play partially redundant roles. In this model, the 50% of ipsilateral axons still projecting normally in the Boc mutant mice would be guided by partially redundant EphB-dependent guidance, and vice versa in the EphBs mutant mice. Since we observed that most EphB1+ RGCs express Boc, we favour the second model. Regardless of whether Boc and EphBs function in the same ipsilateral RGCs or in two different subpopulation of RGCs, it will be interesting to see whether the loss of both types of receptors (Boc and EphBs) result in the complete absence of ipsilateral projections.

REFERENCES

- Barresi MJ, Hutson LD, Chien CB, Karlstrom RO (2005) Hedgehog regulated Slit expression determines commissure and glial cell position in the zebrafish forebrain. *Development* 132:3643-3656.
- Brown LY, Kottmann AH, Brown S (2003) Immunolocalization of *Zic2* expression in the developing mouse forebrain. *Gene Expr Patterns* 3:361-367.
- Charron F, Tessier-Lavigne M (2005) Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 132:2251-2262.
- Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M (2003) The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113:11-23.
- Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, Beachy PA (2002) Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14071-14076.
- Dale JK, Vesque C, Lints TJ, Sampath TK, Furley A, Dodd J, Placzek M (1997) Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell* 90:257-269.
- Erskine L, Herrera E (2007) The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 308:1-14.
- Feldheim DA, Kim YI, Bergemann AD, Frisen J, Barbacid M, Flanagan JG (2000) Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25:563-574.

- Garcia-Frigola C, Carreres MI, Vegar C, Herrera E (2007) Gene delivery into mouse retinal ganglion cells by in utero electroporation. *BMC Dev Biol* 7:103.
- Garcia-Frigola C, Carreres MI, Vegar C, Mason C, Herrera E (2008) Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. *Development* 135:1833-1841.
- Hamelin M, Zhou Y, Su MW, Scott IM, Culotti JG (1993) Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally. *Nature* 364:327-330.
- Haustead DJ, Lukehurst SS, Clutton GT, Bartlett CA, Dunlop SA, Arrese CA, Sherrard RM, Rodger J (2008) Functional topography and integration of the contralateral and ipsilateral retinocollicular projections of ephrin-A^{-/-} mice. *J Neurosci* 28:7376-7386.
- Herrera E, Brown L, Aruga J, Rachel RA, Dolen G, Mikoshiba K, Brown S, Mason CA (2003) Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell* 114:545-557.
- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97:927-941.
- Hopker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C (1999) Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401:69-73.
- Jensen AM, Wallace VA (1997) Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development* 124:363-371.

- Kolpak A, Zhang J, Bao ZZ (2005) Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J Neurosci* 25:3432-3441.
- Locker M, Agathocleous M, Amato MA, Parain K, Harris WA, Perron M (2006) Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev* 20:3036-3048.
- Lupo G, Liu Y, Qiu R, Chandraratna RA, Barsacchi G, He RQ, Harris WA (2005) Dorsoroventral patterning of the *Xenopus* eye: a collaboration of Retinoid, Hedgehog and FGF receptor signaling. *Development* 132:1737-1748.
- Manning L, Ohyama K, Saeger B, Hatano O, Wilson SA, Logan M, Placzek M (2006) Regional morphogenesis in the hypothalamus: a BMP-Tbx2 pathway coordinates fate and proliferation through Shh downregulation. *Dev Cell* 11:873-885.
- Marcus RC, Matthews GA, Gale NW, Yancopoulos GD, Mason CA (2000) Axon guidance in the mouse optic chiasm: retinal neurite inhibition by ephrin "A"-expressing hypothalamic cells in vitro. *Dev Biol* 221:132-147.
- Marcus RC, Shimamura K, Sretavan D, Lai E, Rubenstein JL, Mason CA (1999) Domains of regulatory gene expression and the developing optic chiasm: correspondence with retinal axon paths and candidate signaling cells. *J Comp Neurol* 403:346-358.
- Nakagawa S, Brennan C, Johnson KG, Shewan D, Harris WA, Holt CE (2000) Ephrin-B regulates the Ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. *Neuron* 25:599-610.
- Okada A, Charron F, Morin S, Shin DS, Wong K, Fabre PJ, Tessier-Lavigne M, McConnell SK (2006) Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 444:369-373.

- Petros TJ, Rebsam A, Mason CA (2008) Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. *Annu Rev Neurosci* 31:295-315.
- Petros TJ, Shrestha BR, Mason C (2009) Specificity and sufficiency of EphB1 in driving the ipsilateral retinal projection. *J Neurosci* 29:3463-3474.
- Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, Mason CA, Tessier-Lavigne M (2002) Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33:219-232.
- Sanchez-Camacho C, Bovolenta P (2008) Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* 135:3531-3541.
- Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P (1996) Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* 122:3381-3391.
- Trousse F, Marti E, Gruss P, Torres M, Bovolenta P (2001) Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* 128:3927-3936.
- Wallace VA, Raff MC (1999) A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve. *Development* 126:2901-2909.
- Wang Y, Dakubo GD, Thurig S, Mazerolle CJ, Wallace VA (2005) Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development* 132:5103-5113.
- Williams SE, Grumet M, Colman DR, Henkemeyer M, Mason CA, Sakurai T (2006) A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. *Neuron* 50:535-547.

Williams SE, Mann F, Erskine L, Sakurai T, Wei S, Rossi DJ, Gale NW, Holt CE, Mason CA, Henkemeyer M (2003) Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron* 39:919-935.

Yam PT, Langlois SD, Morin S, Charron F (2009) Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* 62:349-362.

Zhang XM, Yang XJ (2001) Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development* 128:943-957.

SUPPLEMENTAL FIGURES

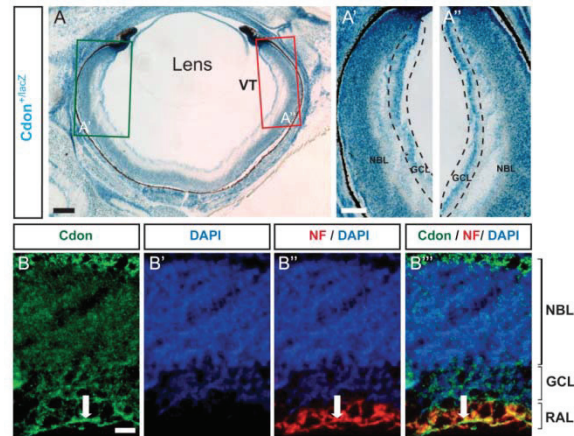


Figure 2. 8S. Cdon is evenly distributed in the developing retina.

A-A'', Cdon expression as detected by β -gal histochemistry on horizontal section of Cdon+/lacZ E15 mice. Cdon is expressed throughout the retina, both in the GCL and the NBL. Similar levels of expression are observed in the ventro-temporal crescent (A'') and the ventro-nasal crescent (A'). B-B''' Immunostaining of horizontal section of E17 rat retina shows that Cdon (green) colocalizes with neurofilament (red) in RGC axons in the RAL. Nuclear staining (DAPI, blue) shows the absence of cell bodies in the RAL. VT, ventro-temporal retina; NBL, neuroblast layer; GCL, ganglion cell layer; RAL, RGC axon layer; NF, neurofilament. Scale bars: A, 100 μ m; A'-A'', 50 μ m; B-B''', 20 μ m.

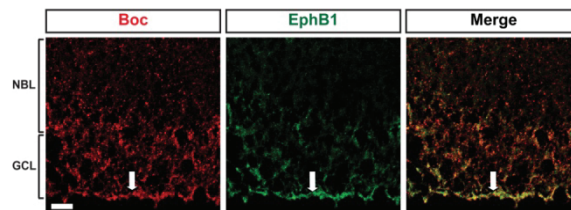


Figure 2. 9S. Boc and EphB1 colocalize in RGC axons.

Confocal images show the colocalization of Boc (goat antibody) and EphB1 in RGC axons of E17 ventral rat retina (horizontal section). The arrow points to RGC axons that are positive for Boc and EphB1. NBL, neuroblast layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar, 10 μ m

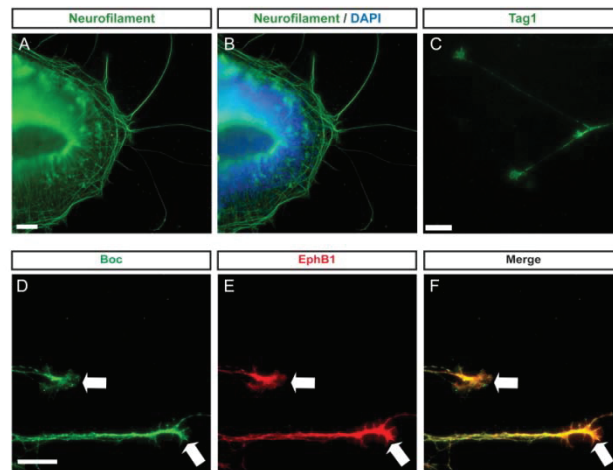


Figure 2. 10S. Characterisation of the axons growing out of retinal explants.

E17 rat retinal explants were cultured 24 hr *in vitro*, fixed and immunostained. A,B, Axons extending over long distances outside the explants are all positive for the RGC marker neurofilament (green). Nuclear staining (DAPI) shows the position of the explant. (blue, B). Retinal axons exiting the explants are also positive for Tag1, a cell surface marker expressed by RGCs from the ventro-temporal crescent (C). D-F, Boc (goat antibody) and EphB1 colocalize in RGC axons and growth cones. Arrows indicates growth cones that are positive for Boc and EphB1. Scale bars: A,B, 25 μ m ; C-F, 10 μ m.

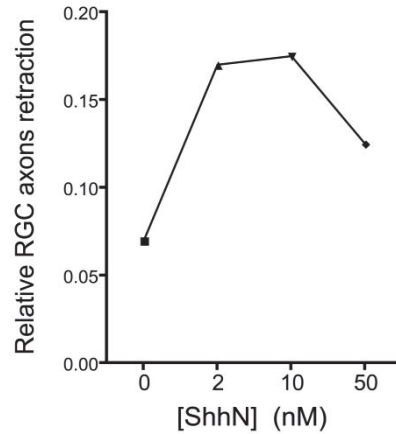


Figure 2. 11S. ShhN induces dose dependant RGC axons retraction.

E17 Rat retinal explants characterized in Fig. S3 were treated with different doses of the N-terminal form of Shh (ShhN). The relative retraction represents the number of axons retracting versus the number of axons growing.

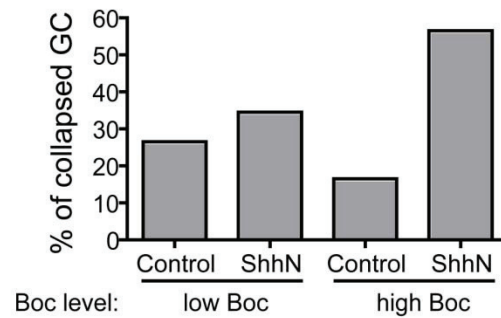


Figure 2. 12S. Quantification of the collapse response shown in Fig. 3C-D.

The bars represent the percentage of E17 rat RGC growth cones that have collapsed 20 min after the addition of 10 nM ShhN.

CHAPITRE III

ARTICLE:

**“BINOCULAR VISION REQUIRES SEGREGATION
OF IPSILATERAL RETINAL GANGLION CELL
AXONS AT THE OPTIC CHIASM”**

Manuscrit en préparation

Contribution des auteurs

Dans cet article, j'ai conçu un nouveau modèle génétique murin permettant l'ablation des connexions nerveuses responsable de la vision binoculaire. J'ai conçu, réalisé, supervisé et analysé les expériences. J'ai écrit le manuscrit. J. Peng a participé à l'analyse anatomique qui a servi à générer la figure 4.2. J. Cardin a apporté le soutien technique nécessaire pour générer les quadruples mutants et le maintien de cette lignée de souris. La Dr. Shimogori a réalisé les électroporations *in utero* qui ont servi pour la figure supplémentaire 4.4S. F. Charron a supervisé l'étude, a participé à la conception et à l'analyse des expériences. Il a participé à l'écriture du manuscrit.

Binocular vision requires segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm.

Pierre J. Fabre^{1,2}, Jimmy Peng^{1,3}, Julie Cardin¹, Tomomi Shimogori⁴ and Frédéric Charron^{1,2,3,5}

¹ Molecular Biology of Neural Development, Institut de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM). ²Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada.

³Department of experimental medicine, McGill University, Montreal, QC, Canada.

⁴RIKEN BSI, Wako city, Saitama, Japan. ⁵University of Texas Southwestern Medical Center. ⁵Department of Anatomy and Cell Biology, Department of Biology, Division of Experimental Medicine and Program in Neuroengineering, McGill University, Montreal, QC, Canada

Keywords: Shh; Boc; EphB1; axon guidance; retinal ganglion cell; optic chiasm

Correspondence should be addressed to Frédéric Charron: Molecular Biology of Neural Development, Institut de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM), Montreal, QC, Canada. Tel: (1) 514-987-5773; Fax: (1) 514-987-5774



ABSTRACT

In binocular animals, three dimensional vision allows perception of depth through the integration of visual information from both eyes. The first step of this integration is possible anatomically with the segregation of contralateral and ipsilateral axons at the optic chiasm. However, it has never been shown before that binocular vision requires visual ipsilateral projections. The EphB and Shh signalling pathways have been shown to specifically induce the collapse of ipsilateral axons *in vitro*, and are required for the proper segregation of these fibres *in vivo*. We show here that *in vivo*, the abrogation of both signalling pathways using quadruple knockout mice of Shh receptor Boc and three ephrinB2 receptors led to the absence of ipsilateral projections, indicating that Shh and ephrinB2 signalling act independently in two parallel pathways. We used these animals as a new genetic model to perform visual tests and observed that their ability to perceive depth is impaired. Thus, we demonstrated that ipsilateral retinal projections, made possible by the combination of EphB and Shh signalling, are essential for accurate binocular vision and the perception of depth.

INTRODUCTION

In mammals, binocularity is crucial for stereoscopic vision, which allows the accurate assessment of distances and perception of depth (Parker, 2007). Binocularity is made possible by the fusion of the two images perceived by the eyes into one single image in the visual cortex. Axonal projections need to converge structurally for the integration of both visual fields to occur. Decussations at the corpus callosum and optic chiasm are thought to be essential for the development stereoscopic vision. While transection of the corpus callosum has little effect on stereopsis (Lepore, et al., 1986; Ptito, et al., 1991), previous studies in cat have shown that chiasmatic transections disrupted the ability to perceive depth, thereby demonstrating the importance of the optic chiasm in allowing normal stereopsis (Lepore, et al., 1986; Timney & Lansdown, 1989).

The optic chiasm is the point at which retinal ganglion cell (RGC) axons cross the midline in the brain. In binocular species, in order to merge visual information coming from both eyes, RGCs are subdivided in two populations. The contralateral RGCs turn toward the chemoattractant VEGF (Erskine, et al., 2011; Ruiz de Almodovar, et al., 2011) and decussate at the optic chiasm. This population of RGCs express the cell-adhesion molecule NrCAM that maintain their fasciculation (Williams, et al., 2006). The second population is composed of the ipsilateral RGCs. Their axons are repelled by cues secreted at the optic chiasm (Erskine & Herrera, 2007; P. Fabre, Morin, & Charron, 2008; Petros, et al., 2008). There are several repulsive cues including slits and semaphorins that play a role in defining the borders of the chiasmatic structure (Plump, et al., 2002; Sakai & Halloran, 2006). However, in the mouse, Shh and ephrin-B2 are the only guidance cues that have been shown to specifically repel ipsilateral axons, and thus trigger the differential segregation of

ipsilateral axons at the optic chiasm (P. J. Fabre, et al., 2010; Nakagawa, et al., 2000; Petros, et al., 2009; Trousse, et al., 2001; Williams, et al., 2003). Importantly, this precise segregation of ipsilateral axons is being achieved by the specificity of expression of EphB1 and Boc, which are respectively Ephrin-B2 and Shh receptors (P. J. Fabre, et al., 2010; Williams, et al., 2003). However, it is not known whether EphB1 and Boc play partially redundant roles in ipsilateral RGCs or independently function in the segregation of separate ipsilateral subpopulations. We propose two different hypotheses, either 1) EphB1 and Boc function in two different subpopulations of ipsilateral RGCs with each receptor accounting independently for the ipsilateral segregation of their subpopulation or 2) Boc and EphB1 can both function in the whole population of ipsilateral RGCs and play partially redundant roles. In the first situation, the remaining 50% of ipsilateral axons still projecting normally in the Boc mutant mice would be an EphB1-dependent subpopulation, and vice versa in the EphBs mutant mice. If the second hypothesis is true, then the 50% of ipsilateral axons still projecting normally in the Boc mutant mice would be guided by partially redundant EphB1 dependent guidance, and vice versa in the EphBs mutant mice.

In this study, we have focused on the guidance of ipsilateral axons, and investigated their role in the establishment of binocular vision. In the first part, we studied the potential collaborative action of both Shh and Ephrin-B2 pathways, both *in vitro* and *in vivo*. We demonstrated that both Boc and EphB1 are expressed in the same population of RGCs, and, *in vitro*, that induction of growth cone collapse by ephrin-B2 is not affected in the *Boc* mutant. *In vivo*, using multiple genetics knock-outs to conduct an epistasis analysis, we also showed that inactivation of both Boc and EphB receptors leads to the complete ablation of ipsilateral projections, indicating that Boc and EphB receptors act in two distinct and

parallel pathways. Furthermore, we also provide evidence showing the role of ipsilateral RGC axons in the establishment of binocular vision. Using binocular functional tests challenging depth perception of both *Boc* and *EphB* single and compound mutant mice, we demonstrate for the first time the requirement of ipsilateral axons for normal binocular vision.

RESULTS

Boc and EphB1 are co-expressed in ipsilateral RGCs.

While previous studies have demonstrated that both *Boc* and *EphB1* are expressed in ipsilateral RGCs (P. J. Fabre, et al., 2010; Williams, et al., 2003) it is not known whether these receptors are co-expressed or they mark independent subpopulations of ipsilateral RGCs. We, therefore, first characterized the expression of *Boc* and *EphB1* in the ventro-temporal crescent of the retina, where the ipsilateral RGC compartment is located. By co-immunostaining the RGC cell bodies within the ventro-temporal quadrant of the retina at E15, a stage at which ipsilateral RGC axons cross the optic chiasm, we show that most RGC co-express both *Boc* and *EphB1* receptors (**Fig. 4.1a,b**). We quantified the percentage of overlap and found that there are 95% (need to be confirmed) double positive RGCs for *Boc* and *EphB1* (**Fig. 4.1c**). This supports a situation in which *Boc* and *EphB1* can both

Figure 3. 1. EphB1 and Boc are expressed in the same population of RGCs.

a. Representation of the two hypothesis of *Boc* and *EphB1* expression in RGC subpopulation. The largest circle represents the overall RGC population. The intermediate circle represents the ventral RGCs that express *EphB2* and *EphB3*. The smallest circle represents the ipsilateral RGCs: on the left a model in which *Boc* and *EphB1* are expressed by exclusive populations of RGC; on the right a model in which *Boc* and *EphB1* are expressed by the same population of RGC, acting on RGC axon segregation at the same time (rectangle box on the far right). **b.** Expression of *EphB1* (red) and *Boc* (green) was analysed using co-immunostaining of ventro-temporal crescents of E15 mouse retina. The white line encircles the RGC layer, and the stars indicate the nuclei (DAPI). Note that all RGCs are positive for *Boc* and *EphB1* in this region. **c.** On the right: representation of the selected hypothesis based on the colocalization study (b). On the left: two possible model can explain this situation: in model- 1, *Boc* or *EphB1* are in the same pathway and one of them is epistatic for the other, the remaining ipsilateral RGCs are controlled by an unknown factor (X). In model-2, *Boc* and *EphB1* act in two distinct parallel pathways and thus are responsible for the generation of all ipsilateral RGCs.

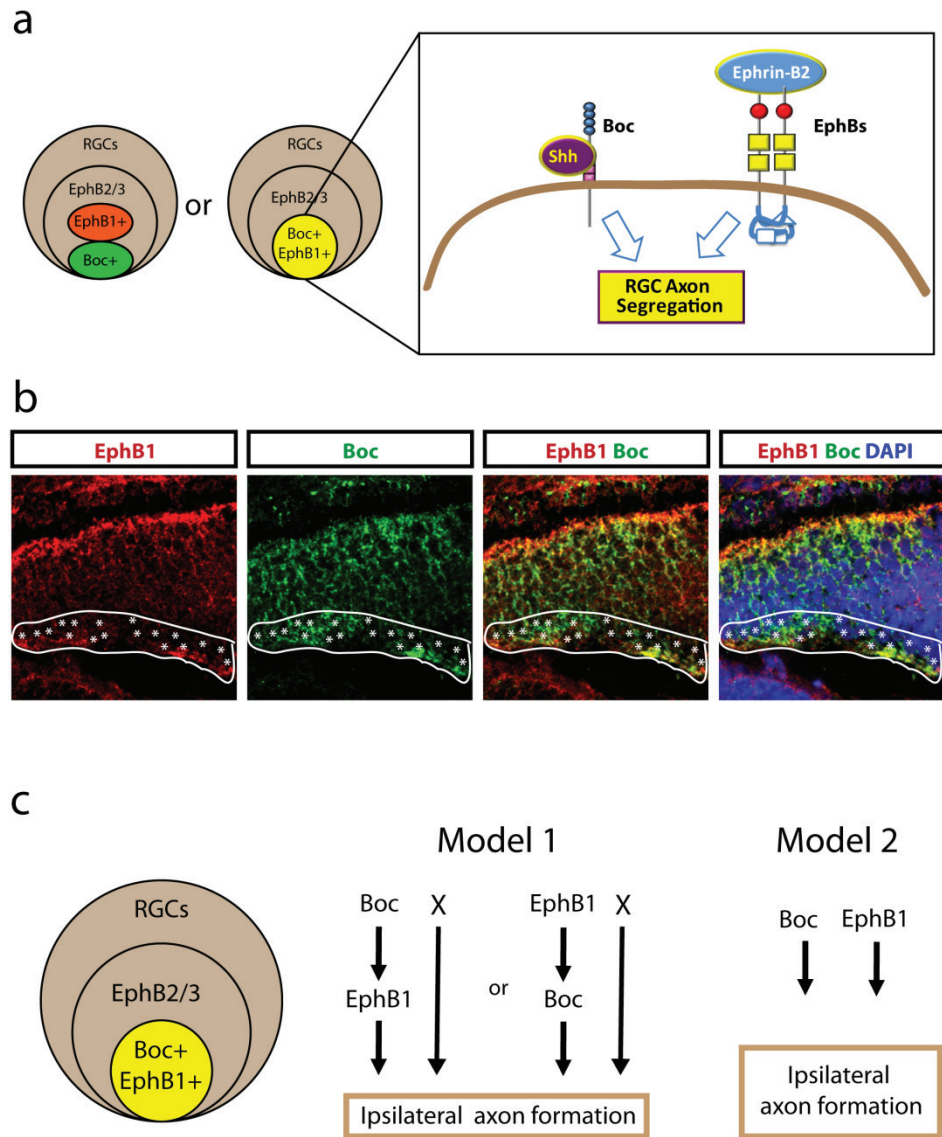


Figure 3. 1. EphB1 and Boc are expressed in the same population of RGCs.

function in the whole population of ipsilateral RGCs. It is thus unlikely that the partial loss of ipsilateral axons observed in both single mutants is due to the fact that *Boc* and *EphB1* are expressed by different populations of RGCs. Previous genetic experiments have demonstrated that the removal of either *Boc* or *EphB1* are responsible in both cases for an approximate 50% reduction in the percentage of ipsilateral projections (P. J. Fabre, et al., 2010; Williams, et al., 2003). It is not yet known, however, whether *Boc* and *EphB1* act independently (in parallel), or together (in the same pathway) (**Fig 4.1d**). We propose here to test these two possibilities. In the first alternative, the 2 pathways act in parallel, meaning that they are both responsible for 50% of the effect, and ablating both should give a stronger phenotype. Thus if this model is true, we should observe the loss of most if not all ipsilateral projections in a double mutant for *Boc* and *EphB1*. In a second model, one of the genes is epistatic to the other and thus they are in the same pathway. In such a case, the 50% reduction of ipsilateral observed in both single mutants is due to the disruption of the same molecular pathway and thus we expect that the ablation of both *Boc* and *EphB1* genes will not reduce more the percentage of ipsilateral axons. In this case, the remaining 50% of ipsi could be explained by an as yet undiscovered additional guidance cue for ipsilateral segregation.

Epistasis analysis: double mutant Boc-EphB1 and Boc-EphB1;EphB2;EphB3

If *Boc* and *EphB1* act in parallel in two independent pathways and each gene is responsible for the maintenance of 50% of the ipsilateral population, ablation of both genes together would result in a complete loss of ipsilateral projections in *Boc;EphB1* double mutant animals. If *Boc* and *EphB1* function together in the same pathway and, one gene is

epistatic to the other, disruption of both genes together would not further enhance the phenotype observed in single mutant animals.

To formally address the possible interaction between the two ipsilateral pathways, we generated the double mutant mice carrying both the mutation for *Boc* and *EphB1* (P. J. Fabre, et al., 2010; Williams, et al., 2003). Since it was reported that EphB2 and EphB3 can be redundant and compensate for the loss of *EphB1*, we also generated the *Boc;EphB1;EphB2;EphB3* quadruple mutant animals. In order to assess the percentage of ipsilateral axons in these animals, we performed a monocular anterograde labelling (**Fig. 4.2a**). We found that while ablation of *Boc* alone or *EphB1* alone led to a partial reduction of the ipsilateral projections (**Fig. 4.2b,c**, 8.5% and 6%, respectively), the abrogation of both pathways, in both the double and the quadruple mutants, led to a nearly complete ablation of the ipsilateral RGC axon (1.9% and 2%, **Fig. 4.2b,c**). Together, these results show that *Boc* and *EphB1* act in two independent pathways. Most importantly, it provides us with a new genetic model allowing testing for the role of ipsilateral axons using functional tests.

Ephrin-B2-induced growth cone collapse is not affected in Boc mutants

Previous *in vitro* studies have demonstrated that addition of ephrin-B2 or ShhN to ipsilateral RGCs resulted in growth cone collapse (P. J. Fabre, et al., 2010; Petros, et al., 2010; Trousse, et al., 2001). To test if both pathways are inter-related, we first assessed whether Shh can modulate the growth cone collapse induced by ephrin-B2 in ipsilateral

Figure 3. 2. Loss of ipsilateral projection in the *Boc;EphB* mutant mouse.

a, Schematic of the rostral part of the P0 mouse visual system after mono-ocular injection of DiI crystals (red) in the whole retina. **b**, Coronal sections of P0 optic tracts in control, *Boc*^{-/-}, *EphB1*^{-/-}, *Boc*^{-/-};*EphB1*^{-/-} double mutants and *Boc*^{-/-};*EphB1*^{-/-};*EphB2*^{-/-};*EphB3*^{-/-} quadruple mutants after mono-ocular injection of DiI crystals (red) and counterstaining with DAPI (blue). The optic tracts are circled with yellow dashed lines. The DiI staining is not detectable in the ipsilateral tract of double and quadruple mutants, thus much lower than *Boc*^{-/-} and *EphB1*^{-/-} and control mice. Although these images show saturated pixels for ease of viewing the faint ipsilateral signal, the quantification was performed on unsaturated images. **c**, Quantification of the percentage of DiI signal in the ipsilateral optic tract as a proportion of the total DiI signal from the contralateral and ipsilateral optic tract reveals a significant decrease in ipsilateral projections in *Boc*^{-/-};*EphB1*^{-/-} mice compared to control, *Boc*^{-/-} or *EphB1*^{-/-}. *p<0.05; ** p<0.01 using, student's unpaired *t* test. Scale bar, 100 μm.

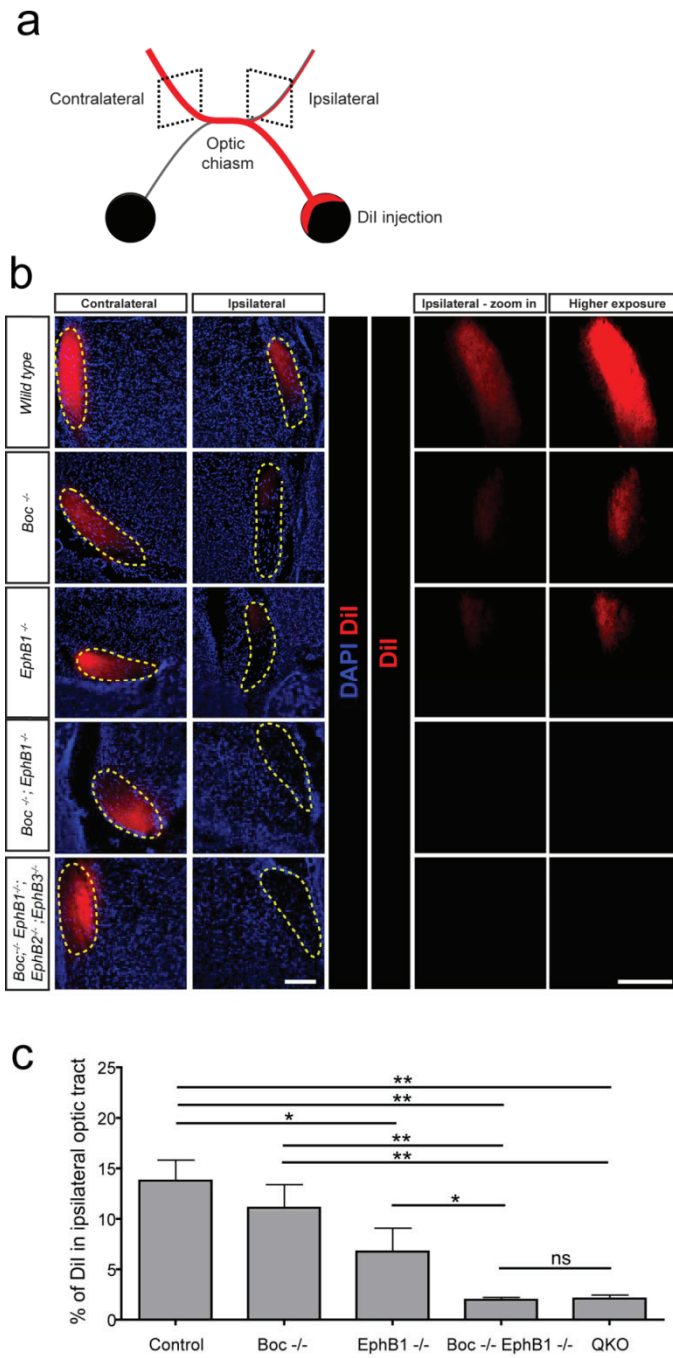


Figure 3. 2. Loss of ipsilateral projection in *Boc*; *EphB* mutant.

RGCs. When RGC cultures were treated with a suboptimal dose of ephrin-B2 (0,2ug/ml) we observed that 43% of RGC growth cones collapsed when compared to untreated control (17%, $p < 0.05$) (**Fig4.4Sa**). These results are similar with those observed recently by Petros et al. (2010). We then conducted a series of co-stimulation of ShhN and Ephrin-B2 and we did not observed any increase of collapse when both cues were added.

To further investigate the role *Boc* in RGC growth cone collapse in response to ephrin-B2 stimulation, we performed collapse assays using RGC purified from *Boc*-null retina. We observed that 42% *Boc*-mutant RGC growth cones collapsed in response to Ephrin-B2 and this was indistinguishable of the control (43%, **Fig 4.4Sb**).

It was previously shown that the single electroporation of either *Boc* or *EphB1* alone is sufficient to induce an increase of the percentage of ipsilateral axons (P. Fabre, et al., 2008; P. J. Fabre, et al., 2010; Petros, et al., 2009). To determine if *EphB1* can function cumulatively with *Boc* to induce the rerouting of contralateral axons, we performed *in utero* electroporation of either *Boc*, *EphB1*, or a combination of both at E13.5 and analyzed the trajectories 3 days later (**Fig. 4.5Sa**). We found that 6,5% of axons become ipsilateral when *Boc* is overexpressed, 6% of axons were rerouted ipsilaterally when overexpressing *EphB1*, which is in agreement with what was previously shown that is electroporation of either *Boc* or *EphB1* alone is sufficient to induce an increase of the percentage of ipsilateral axons (P. Fabre, et al., 2008; P. J. Fabre, et al., 2010; Petros, et al., 2009). Interestingly, co-electroporation of both *Boc* and *EphB1* enhanced the numbers of axons projecting ipsilaterally to 8,2% (**Fig. 4.5Sb**). Even if the combination tends to further augment the percentage of ipsilateral axons, it is not additive nor does it significantly potentiate the effect. Our results suggest that the ability to become ipsilateral might require either

additional factors acting downstream of *Boc* and *EhpB1*, or the repression of contralateral factors. Taken together, these results support the previous genetic evidence showing the *Boc* and *EphB1* act in two independent pathways.

Binocular vision is impaired in *Boc;EphB1* double mutants and *Boc;EphB1;EphB2;EphB3* quadruple mutants

Binocular vision is an important feature for animals who need to survive in a three dimensional environment. It was proposed that the overlap between the visual fields of the two eyes is structurally supported by the ipsilateral projections. This dogma is supported by the correlation between the percentage of ipsilateral RGC axon and the size of the overlapping visual fields (Mann & Holt, 2001). Thus we took advantage of the *Boc;EphB1* and *Boc;EphB1;EphB2;EphB3* mutants to address the importance of ipsilateral projections in the establishment of binocular vision. One of the most important functions allowed by binocular vision is depth perception. Given that depth perception is a means to measure binocular function (Parker, 2007), we measured depth perception in wild-type and mutants lacking ipsilateral projections using the visual cliff test (**Fig. 4.3a**) (Fox, 1965; Gibson & Walk, 1960; Leamey, et al., 2007; Satz, et al., 2009). We first conducted a preliminary test to assess whether the global vision of our double and quadruple mutant was affected. Two days before the tests, the whiskers of the mice were trimmed to avoid that they rely on non visual stimuli. Mice were then challenged with the vertical placement test. This test consists in slowly approaching vertically the mice toward a bar and score positively when the mice

Figure 3. 3. The visual cliff test analysis reveals the poor visual performance of *Boc*^{-/-}; *EphB1*^{-/-} and *Boc*^{-/-}; *EphB1*^{-/-}; *EphB2*^{-/-}; *EphB3*^{-/-} mouse mutants.

a. Schematic representation of the visual cliff test apparatus. The test evaluates the ability of the mouse, placed at the center of the platform, to see the drop-off the edge of the horizontal plexiglass surface. **b.** Representative images of the two possible decisions the mouse can make after being placed on the midline. **c.** Quantification of the percentage of 'safe' after 10 trials for each genotype reveals a significant decrease in DKO (n=8) and QKO (n=4) when compared to control (n=5), *Boc*^{-/-} (n=5) and *EphB1*^{-/-} (n=5). The low percentages in DKO and QKO were not significantly different of those of a blind mouse (n=5) (C3H/HeJ, a model of retinal degeneration). **d.** Quantification of the scores on the vertical placement test for the mice of the different genotypes. Only the blind strain was significantly different of the control. The 'n' represents the number of mice used per genotype; DKO: *Boc*^{-/-}; *EphB1*^{-/-} QKO: *Boc*^{-/-}; *EphB1*^{-/-}; *EphB2*^{-/-}; *EphB3*^{-/-}.

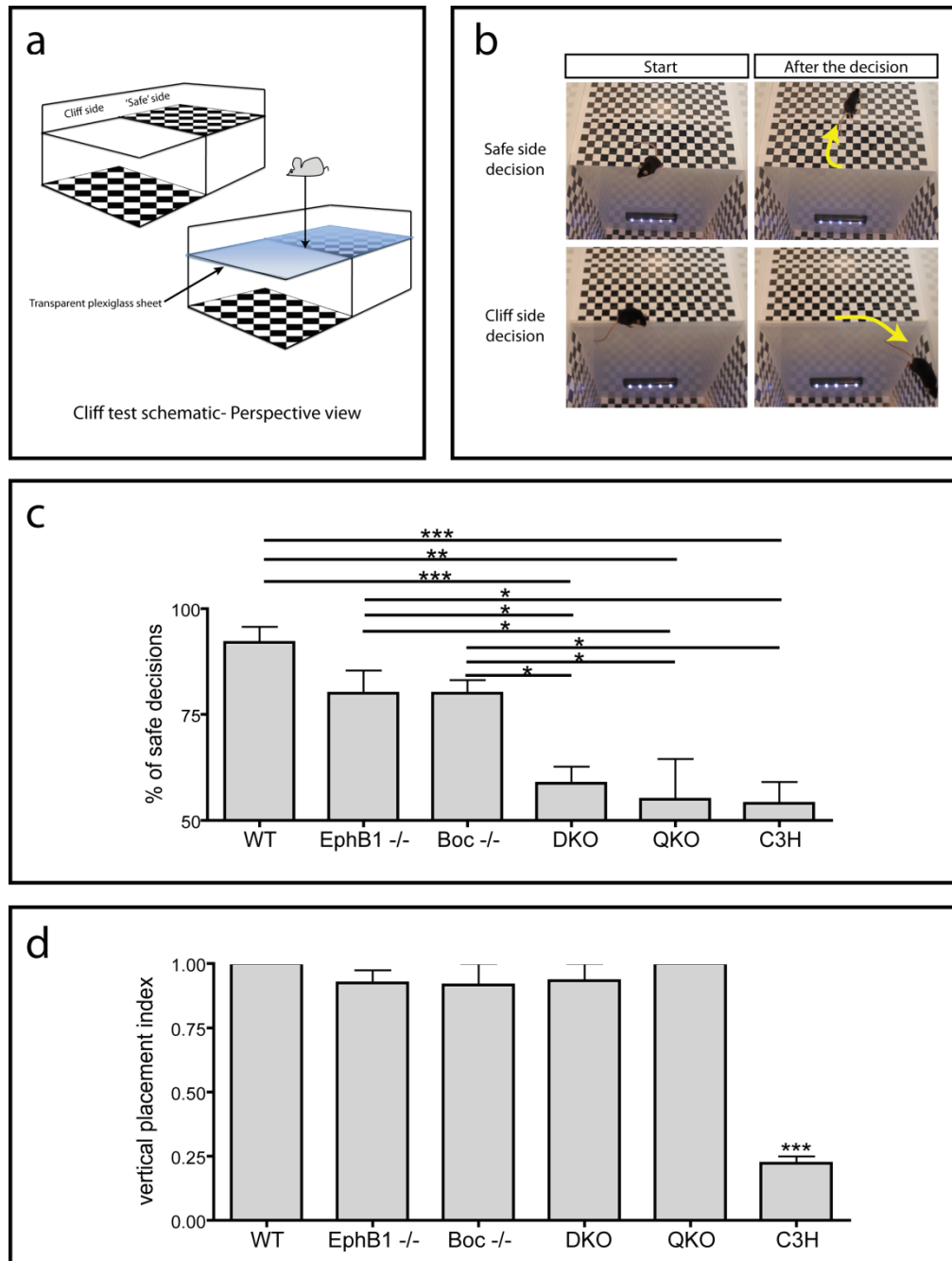


Figure 3.3. The visual cliff test analysis reveals the poor visual performance of *Boc*^{-/-}; *EphB1*^{-/-} and *Boc*^{-/-}; *EphB1*^{-/-}; *EphB2*^{-/-}; *EphB3*^{-/-} mouse mutants.

grab the bar before it touches her head. With the exception of the blind strain used as a control (C3H HeJ (Fox, 1965)), mice of all different genotypes (*Boc*^{-/-}, *EphB1*^{-/-}, *Boc*^{-/-}; *EphB1*^{-/-}; *Boc*^{-/-}; *EphB1*^{-/-}; *EphB2*^{-/-}; *EphB3*^{-/-}) passed the test with similar scores (**Fig. 4.3d**). Next, we tested the ability of our mutant animals to perceive depth with the visual cliff test. This test consists of placing the mice on the center of a transparent plexiglass board. One half of the plexiglass is covered by chess squares, showing an opaque ‘safe’ surface while on the other half it remains transparent and show a 67cm high cliff, with checkered squares at the bottom (**Fig. 4.3a-b**). While wild type mice turn preferentially to the safe part of the platform (92% of the time), the *Boc*; *EphB1* and *Boc*; *EphB1*; *EphB2*; *EphB3* double and quadruple mutants failed significantly to recognize the cliff and turn toward the ‘safe’ side in only 58 and 55 percent (respectively) of the trials ($p < 0.01$, One way ANOVA with tukey post test). While 92% of wild-type mice turned preferentially to the safe part of the platform, only 58% of *Boc*; *EphB1* and 55% of *Boc*; *EphB1*; *EphB2*; *EphB3* mutants mice turned toward the ‘safe’ side ($p < 0.01$, One way ANOVA with tukey post test) (**Fig 4.3c**). Together, our data shows that double and quadruple mutant animals failed to significantly recognize the cliff, and this was not significantly different from the C3H HeJ blind mice that were used as a control. *Boc* and *EphB1* single mutants performed significantly better than the double and quadruple mutants, with 80 and 82%, respectively, opting for safe side side of the platform, and this was not significantly different from the control mice (**Fig. 4.3c**). As well, our data support a role for ipsilateral RGC projections in conveying the visual information that is essential for proper depth perception, a landmark of binocular vision.

DISCUSSION

We have previously shown that Boc, a Shh receptor, is required for the proper segregation of ipsilateral axons by Shh at the optic chiasm. In this paper, we show that its role in segregating ipsilateral axons is distinct from EphB1. More importantly, we present new evidence to support the fact that binocular vision requires binocular wiring.

First, we found that Boc and EphB1 are co-expressed in the same population of RGCs and that the combination of both cues for these receptors did not further increase the percentage of RGCs that collapse after the addition of single cue. Second, to test whether Boc and EphB1 signalling act in concert or in distinct paths, we cultured retinal explants from Boc mutant retina and found that the percentage of response to ephrin-B2 was maintained. More importantly, we conducted an epistasis analysis using double and quadruple mutants that showed a complete ablation of the ipsilateral projection, a phenotype much stronger than the inactivation of single receptors, demonstrating formally that the two molecular pathways are independent. Third, using the double mutant *Boc;EphB1* as a new genetic model for the removal of all retinal ipsilateral connections, we found that binocular activities in the visual cortex were lost in animals lacking ipsilateral axons. Finally, our new genetic model allowed us to test for the function of ipsilateral axons. Animals with no ipsilateral axons fail to detect depth in the visual cliff test, proving for the first time that ipsilateral projections have a role in binocular vision. Taken together, our results suggest that the ipsilateral axon segregation, mediated by Shh and EphrinB signalling, is essential to merge the retinal inputs from both visual fields.

Specificity of ipsilateral RGC axon segregation is defined by the combination of a set of repulsive receptors

Given the presence of EphB receptors in all the ventral RGCs, but with the maximum abundance of Eph receptors in ipsilateral axons, increased concentration of ephrinB-2 induced the response of a broader population, ultimately allowing a repulsive response in most of the ventral RGCs (Petros, et al., 2010). On the other hand, increased concentration of Shh would not act further repulsively on the contralateral RGCs, since only Boc mediates a repulsive effect in these axons. Other Shh receptors may instead induce positive effects, as shown recently by the disruption of patched-1 activity in contralateral RGCs (Sanchez-Camacho & Bovolenta, 2008). It has been shown recently that Ptch1 can form a complex with either Boc or Gas1 to transduce Shh signalling (Izzi, et al., 2011). Since contralateral RGC do not express Boc, it might be possible that the guidance in contralateral RGC is mediated via Gas1. Another receptor that might be involved with Ptch1 could also be the homolog of Boc, Cdo, since we have shown previously that it was strongly expressed in contralateral RGC (P. J. Fabre, et al., 2010). In our study, we show that the establishment of ipsilateral specificity is orchestrated by the expression of the two guidance receptors *Boc and EphB1*. However, in ipsilateral RGC, Bovolenta and colleagues showed that Ptch2, but not Ptch1, is expressed. Ptch2 may act as a co-receptor for Boc to mediate the repulsive response in RGCs. Thus, Ptch2 might be another essential component of the ipsilateral axon guidance at the optic chiasm.

The guidance of ipsilateral axons by an EphB1 independent mechanism.

It was recently reported that the formation of ipsilateral projections is mediated by a Zic2 effect independent of EphB (Garcia-Frigola, et al., 2008). This was shown when an increase of ipsilateral axons was observed after the electroporation of *EphB1* mutant retina. This raised the possibility that *Boc* was responsible for the *EphB1* independent increase of ipsilateral axons. In our assays, the combinations of *Boc* and *EphB1* overexpression was not sufficient to increase further the capacity of contralateral axons to be rerouted ipsilaterally. The Zic2 effect on the ability of a contralateral axon to be redirected as an ipsilateral axon might require the repression of contralateral programs. Thus, it is possible that the co-expression of both *Boc* and *EphB1* is not sufficient to redirect the contralateral axons that still express essential contralateral component such as Neuropilin1 (Erskine, et al., 2011) and NrCAM (Williams, et al., 2006). Thus, NrCAM, which plays a role in the fasciculation of contralateral RGCs (Williams, et al., 2006), might counteract the action of Boc and EphB1. In order to circumvent this possible counteraction, we would need to 1) force the expression of *Boc* and *EphB1* in all contralateral RGC, or 2) force this expression in *NrCAM* mutant retina.

Implication of our work in understanding binocular vision

More importantly, our work allowed us to generate a new genetic model of the mouse with a complete ablation of ipsilateral retinal projections. Thus, in the second part of our study, we provide evidence for the role of ipsilateral RGC axons in the establishment of binocular vision. Finally, using binocular functional tests to challenge depth perception, we demonstrate the requirement of ipsilateral axons for accurate binocular vision.

Previous model with impaired ipsilateral projections and binocular vision defects: albinism

Many studies have reported previously that albino animals have a strong reduction of ipsilateral RGC axons, especially in adult ferrets (Guillery, Jeffery, & Cattnach, 1987; Morgan, Henderson, & Thompson, 1987). Early studies in the mouse also showed a third reduction of ipsilateral axons in albino compare to pigmented mice. However, this reduction was thought to be associated with impaired binocular vision as binocular cortical fields were normal (Drager & Olsen, 1980). Furthermore, when testing albino mouse strains with the cliff test apparatus, no differences were observed compared to the control pigmented mice (Fox, 1965). Thus, the albino mice did not provide a good model to test for binocular vision. Our data show that the partial reduction of ipsilateral fibers, as observed before in *Boc* mutants (P. J. Fabre, et al., 2010) and *EphB1* mutants (Williams, et al., 2003), were not associated with an inability to perform on the cliff test. Neither *Boc*^{-/-} nor *EphB1*^{-/-} were different from the control in our test. This suggests that the remaining ipsilateral RGCs are sufficient to provide binocular vision in our animals. However, some albino species did not perform optimally when tested for binocular vision. Deficient depth perception was detected with albino rats when tested on the original visual cliff test (Gibson & Walk, 1960). Furthermore, in humans, albino subjects did not perform as well as control for stereoptic tasks. Nevertheless, all animal and human albinos retain a capacity to use binocular vision (Apkarian & Reits, 1989). Authors proposed that corpus callosal connections were essential to compute binocular stimuli. Our data, in which there is a loss of the ipsilateral connections, suggest that callosal connections are not able to compensate when ipsilateral connections are absent.

Ipsilateral segregations in final brain targets

Spatial segregation of contralateral and ipsilateral projections occurs in both the dLGN and the superior colliculus (Godement, et al., 1984). In the dLGN, the ipsilateral fibers are restricted to a central compartment, surrounded by the contralateral fibers. In the superior colliculus, the ipsilateral fibers are confined to a narrow sublamina in the deepest part of the tectum. Recently, it was shown that, in *EphB1* mutant mice, the compartmentalization in the dLGN of rerouted ipsilateral axons was affected. These axons that project contralaterally do not merge with other contralateral axons, and instead aggregate abnormally with the remaining ipsilateral axons. It will be interesting to define if such an effect is present in the *Boc* and *Boc;EphB1* mutants. Furthermore, this impaired targeting of rerouted axons might act as a dominant negative effect in our mutants. To circumvent this possibility, it will be important for future studies to generate a model in which we can induce the degeneration of all ipsilateral axons.

Stereopsis in human

In humans, it was previously shown that patients with an absence of optic chiasm but an otherwise normal anatomy failed the Titmus stereo test, indicating that they have defective stereopsis (Prakash, Dumoulin, Fischbein, Wandell, & Liao, 2010). Now that we have seen that the ipsilateral axons are important for binocular vision, it will be interesting to evaluate whether patients with defective stereopsis have a loss of ipsilateral axons. The improvement of MRI resolutions might allow future studies to detect these axonal defects.

METHODS

Animals

C57Bl/6J mice were maintained in a specific pathogen-free (SPF) animal facility (IRCM, Montréal, Québec, Canada). *Boc^{+lacZ}* mice were kindly provided by A. Okada and S.K. McConnell (Okada, et al., 2006) and were maintained on a C57Bl/6J background. *EphB1^{+/-}* and *EphB1;EphB2;EphB3* were previously described (Williams, et al., 2003), and were maintained on a C57Bl/6J background. Embryonic day 0 (E0) was defined as midnight of the night before a plug was found. Post natal day 0 (P0) represents the day of birth. All animal work was performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care Guidelines.

Reagents

Recombinant purified human ShhN (C24II; R&D systems, Minneapolis, USA) was used at 10 nM. EphrinB2-Fc (R&D systems, Minneapolis, USA) was used at 0.2ug/ml

Retinal explant cultures

Eight-chamber culture slides (BD Falcon) were coated with 10 µg/ml poly-L-lysine (Sigma) for two hours at room temperature, washed three times with water and then coated overnight at 37°C with 6 µg/ml laminin (Invitrogen) in PBS. Retinas were dissected from E15.5-E17.5 mouse embryos. Each retina was cut into approximately 50 explants (average size of 300 µm). Explants were then transferred to the culture slides and cultured in serum-free medium (Neurobasal and DMEM/F12), supplemented with B27 (Invitrogen) and N2 (Invitrogen). Retinal explants were then maintained at 37°C, 7.5% CO₂. Eighteen to

twenty-two hours after being plated, 10 nM ShhN or ephrin-B2 were added. Explants were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature for subsequent immunostaining.

Microscopy

Fluorescence and brightfield images were acquired with Leica DM6000 and DM4000 microscopes. Colocalization and *in utero* electroporation experiments were imaged with a Zeiss LSM 710 confocal microscope. Live cell imaging was performed on a Leica DMIRE2 inverted microscope equipped with a heated environmental chamber (37°C) and a MS-2000 XYZ automated stage (ASI, Eugene, OR). Time-lapse phase contrast images were acquired every 5 minutes using a 10X fluotar or 20X fluotar LD objective. All images were collected with an Orca ER CCD camera (Hamamatsu) using Volocity version 4.3 (Improvision, Waltham, MA).

Immunohistochemistry and histology

Immunohistochemistry was performed on 12 µm thick cryosections. Primary antibodies used were against: Boc (AF2385, R&D), neurofilament heavy chain 2H3 (Developmental Studies Hybridoma Bank), EphB1 (SC926, Santa Cruz), Brn3b (Santa Cruz), L1 (Millipore), and GFP (Abcam). Immunofluorescence images were visualized using secondary antibodies conjugated to Alexa 488 or Alexa 568 (Molecular Probes) and DAPI (Sigma).

Analysis of growth cone collapse

For the analysis of growth cone collapse, only single axons that had grown over 200 μm outside of the retinal explants were analyzed because we have shown using different markers that these long axons are all RGC axons. Growth cones were fixed 20 minutes after ShhN or ephrin-B2 addition, by adding an equal volume of 8% PFA to the medium containing the retinal explants, at room temperature for 15 min. RGCs were stained with phalloidin (sigma) to identify the growth cone. The length of axons, the level of fluorescence and the area of growth cones were measured using Volocity.

Anterograde DiI Labeling

Anterograde labeling of RGC axons was performed on fixed tissue using DiI as described previously (P. J. Fabre, et al., 2010; Plump, et al., 2002). After DiI labeling, whole heads were sectioned at 30 μm . The sections were washed for 3 min in PBS and incubated for 5 min in DAPI at room temperature. The sections were then mounted in moviol and images taken immediately. For measurement of the relative ipsilateral projections, the area occupied by the optic nerve was selected and total DiI fluorescence was measured in this area. All images were acquired under conditions where the pixels were not saturated. The data for each animal is an average of ten consecutive frontal sections of the optic tracts just caudal to the optic chiasm. Measurements were taken blind to the genotype.

In utero electroporation

In utero electroporation was performed essentially as described (Garcia-Frigola, et al., 2007). To co-electroporate Boc-FLAG, EphB1-GFP and YFP, DNA solutions were

prepared with equal amounts of YFP-expression plasmid (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), EphB1-GFP and pCAGGS-mouse Boc expression plasmid (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Only the YFP plasmid was electroporated in the control conditions. The DNA solution was injected into the eye at E13.5 (*in utero*) and electroporated with 5 pulses (38V, 50 ms). Three days after electroporation (E16.5), the embryos were collected, their head were dissected and fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde. Heads were then frozen and sectioned horizontally. Subsequent immunohistochemistry was performed to enhance YFP signal using a chicken anti-GFP antibody (Abcam).

Visual tests

We observed that the cliff test was more robust with female mice so we conducted all the trials with this sex only. Vertical placement tests: animals with trimmed whiskers were held by the tail and moved toward a stick while a bar was approached horizontally toward their eyes. The visual cliff tests were performed as described previously (Fox, 1965; Gibson & Walk, 1960; Leamey, et al., 2007; Satz, et al., 2009). Briefly, using a Plexiglas platform consisting of an horizontal transparent Plexiglas installed over 2 distinct compartment. On one side a cliff of 67cm high and on the other side an opaque surface. Each trial consisted of placing the mice on the center of the platform, at the interface between the cliff and the safe zone. Each mice was tested 10 times

Statistical Analysis

Data were analyzed and graphs generated using Prism 4 statistical software (GraphPad

Software, Inc., San Diego, CA, USA). All error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistical significance was determined using one way ANOVA with tukey post-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR; MOP74700). FC is a FRSQ (Fonds de la recherche en santé du Québec) Junior II Scientist. We thank Steves Morin, Jessica Barthe and Typhaine Nédélec for technical assistance. We also thank A. Kania, TJ Kao, L. Lepelletier, Jan Sandink and N. Szabo for providing advice and reagents and Luisa Izzi for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Apkarian, P., & Reits, D. (1989). Global stereopsis in human albinos. *Vision Res*, 29(10), 1359-1370.
- Drager, U. C., & Olsen, J. F. (1980). Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol*, 191(3), 383-412.
- Erskine, L., & Herrera, E. (2007). The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol*, 308(1), 1-14.
- Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J. M., et al. (2011). VEGF Signaling through Neuropilin 1 Guides Commissural Axon Crossing at the Optic Chiasm. *Neuron*, 70(5), 951-965.
- Fabre, P., Morin, S., & Charron, F. (2008). Une histoire de guidage axonal très attirante [Sonic hedgehog and Boc: a very attractive story about axons]. *Med Sci*, 24(2), 129-131.
- Fabre, P. J., Shimogori, T., & Charron, F. (2010). Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. *J Neurosci*, 30(1), 266-275.
- Fox, M. W. (1965). The visual cliff test for the study of visual depth perception in the mouse. *Anim Behav*, 13(2), 232-233.
- Garcia-Frigola, C., Carreres, M. I., Vegar, C., & Herrera, E. (2007). Gene delivery into mouse retinal ganglion cells by in utero electroporation. *BMC Dev Biol*, 7, 103.
- Garcia-Frigola, C., Carreres, M. I., Vegar, C., Mason, C., & Herrera, E. (2008). Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. *Development*, 135(10), 1833-1841.
- Gibson, E. J., & Walk, R. D. (1960). The "visual cliff". *Sci Am*, 202(4), 64-71.
- Godement, P., Salaun, J., & Imbert, M. (1984). Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol*, 230(4), 552-575.
- Guillery, R. W., Jeffery, G., & Cattanaach, B. M. (1987). Abnormally high variability in the uncrossed retinofugal pathway of mice with albino mosaicism. *Development*, 101(4), 857-867.
- Izzi, L., Levesque, M., Morin, S., Laniel, D., Wilkes, B. C., Mille, F., et al. (2011). Boc and gas1 each form distinct shh receptor complexes with ptch1 and are required for shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell*, 20(6), 788-801.
- Leamey, C. A., Merlin, S., Lattouf, P., Sawatari, A., Zhou, X., Demel, N., et al. (2007). Ten_m3 regulates eye-specific patterning in the mammalian visual pathway and is required for binocular vision. *PLoS Biol*, 5(9), e241.
- Lepore, F., Ptitto, M., & Lassonde, M. (1986). Stereoperception in cats following section of the corpus callosum and/or the optic chiasma. *Exp Brain Res*, 61(2), 258-264.
- Mann, F., & Holt, C. E. (2001). Control of retinal growth and axon divergence at the chiasm: lessons from *Xenopus*. *Bioessays*, 23(4), 319-326.
- Morgan, J. E., Henderson, Z., & Thompson, I. D. (1987). Retinal decussation patterns in pigmented and albino ferrets. *Neuroscience*, 20(2), 519-535.
- Nakagawa, S., Brennan, C., Johnson, K. G., Shewan, D., Harris, W. A., & Holt, C. E. (2000). Ephrin-B regulates the Ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. *Neuron*, 25(3), 599-610.
- Okada, A., Charron, F., Morin, S., Shin, D. S., Wong, K., Fabre, P. J., et al. (2006). Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature*, 444(7117), 369-373.
- Parker, A. J. (2007). Binocular depth perception and the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 8(5), 379-391.

- Petros, T. J., Bryson, J. B., & Mason, C. (2010). Ephrin-B2 elicits differential growth cone collapse and axon retraction in retinal ganglion cells from distinct retinal regions. *Dev Neurobiol*, *70*(11), 781-794.
- Petros, T. J., Rebsam, A., & Mason, C. A. (2008). Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. *Annu Rev Neurosci*, *31*, 295-315.
- Petros, T. J., Shrestha, B. R., & Mason, C. (2009). Specificity and sufficiency of EphB1 in driving the ipsilateral retinal projection. *J Neurosci*, *29*(11), 3463-3474.
- Plump, A. S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C. J., Goodman, C. S., et al. (2002). Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron*, *33*(2), 219-232.
- Prakash, S., Dumoulin, S. O., Fischbein, N., Wandell, B. A., & Liao, Y. J. (2010). Congenital achiasma and see-saw nystagmus in VACTERL syndrome. *J Neuroophthalmol*, *30*(1), 45-48.
- Ptito, M., Lepore, F., & Guillemot, J. P. (1991). Stereopsis in the cat: behavioral demonstration and underlying mechanisms. *Neuropsychologia*, *29*(6), 443-464.
- Rebsam, A., Petros, T. J., & Mason, C. A. (2009). Switching retinogeniculate axon laterality leads to normal targeting but abnormal eye-specific segregation that is activity dependent. *J Neurosci*, *29*(47), 14855-14863.
- Ruiz de Almodovar, C., Fabre, P. J., Knevels, E., Coulon, C., Segura, I., Haddick, P. C., et al. (2011). VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1. *Neuron*, *70*(5), 966-978.
- Sakai, J. A., & Halloran, M. C. (2006). Semaphorin 3d guides laterality of retinal ganglion cell projections in zebrafish. *Development*, *133*(6), 1035-1044.
- Sanchez-Camacho, C., & Bovolenta, P. (2008). Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development*, *135*(21), 3531-3541.
- Satz, J. S., Philp, A. R., Nguyen, H., Kusano, H., Lee, J., Turk, R., et al. (2009). Visual impairment in the absence of dystroglycan. *J Neurosci*, *29*(42), 13136-13146.
- Timney, B., & Lansdown, G. (1989). Binocular depth perception, visual acuity and visual fields in cats following neonatal section of the optic chiasm. *Exp Brain Res*, *74*(2), 272-278.
- Trousse, F., Marti, E., Gruss, P., Torres, M., & Bovolenta, P. (2001). Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development*, *128*(20), 3927-3936.
- Williams, S. E., Grumet, M., Colman, D. R., Henkemeyer, M., Mason, C. A., & Sakurai, T. (2006). A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. *Neuron*, *50*(4), 535-547.
- Williams, S. E., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D. J., et al. (2003). Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron*, *39*(6), 919-935.

SUPPLEMENTAL FIGURES

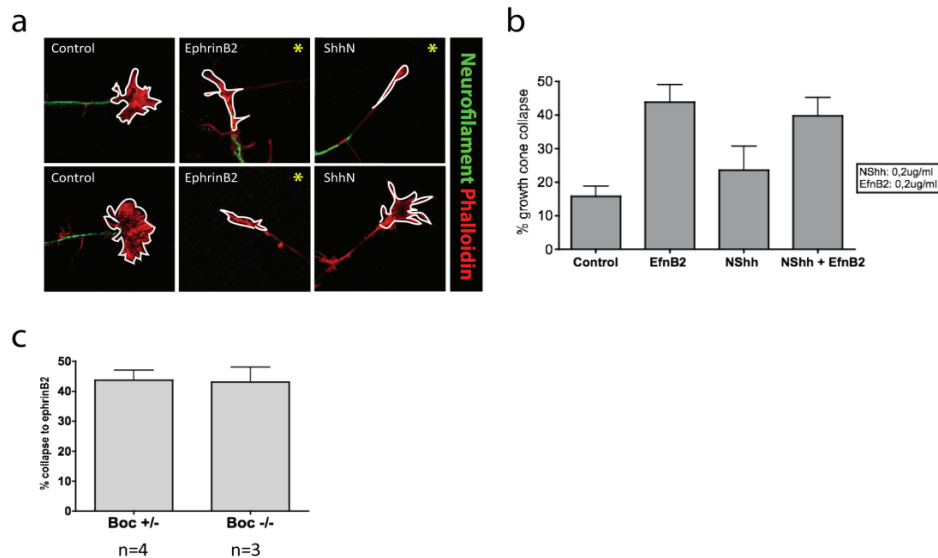


Figure 3. 4S. Boc is not required for ephrin-B2 induced growth cone collapse.

a. Representative images of RGC growth cones from E15 retina treated with either ephrin-B2, Shh N or control medium. **b.** Quantification of the percentage of collapse does not show increase of growth cone collapse in RGC growth cones treated with ShhN and EfnB2 when compared to EfnB2 alone, or ShhN alone. **c.** Quantification of the percentage of growth cone exhibiting collapse following Efn-B2 treatment. $Boc^{-/-}$ (n=3 animals) growth cone depicted similar percentages of collapse when compared to $Boc^{+/-}$ (n=4 animals) growth cone.

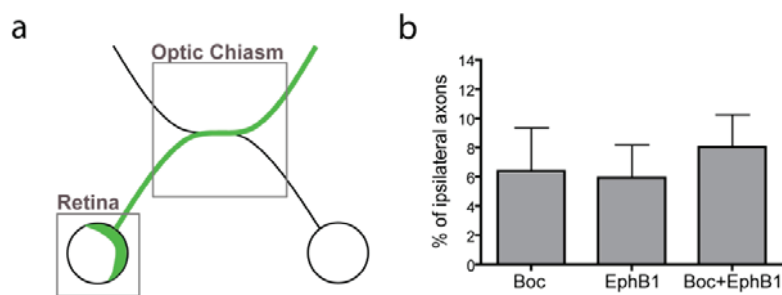


Figure 3. 5S. Ectopic expression of a combination of Boc and EphB1 does not augment significantly the percentage of ipsilateral RGC axons.

a. Schematic of the E16.5 mouse visual system, 3 days after *in utero* electroporation of the retina at E13.5. **b.** Quantification of the percentage of YFP positive ipsilateral axons after ectopic expression of YFP in combination with Boc, EphB1, or Boc+EphB1. Co-expression of Boc and EphB1 does not increase significantly the percentage of ipsilateral axons.

CHAPITRE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de cette thèse était de découvrir le rôle de la signalisation Shh dans le guidage des axones de la rétine. Les travaux présentés dans le chapitre III ont permis de démontrer l'expression et le rôle spécifique de Boc, un récepteur de Shh, dans la ségrégation des axones des CGR ipsilatérales. L'inactivation de *Boc* étant responsable de la perte de presque la moitié des projections ipsilatérales, ces souris mutantes auraient déjà pu nous servir de modèle pour étudier le rôle de ces connexions ipsilatérales. Toutefois, c'est en générant des souris mutantes à la fois pour *Boc* et *EphB1*, l'autre récepteur responsable de la ségrégation des fibres ipsilatérales, que nous avons pu créer un modèle murin avec absence complète de projections rétiniennes ipsilatérales. C'est ainsi que la démonstration du rôle essentiel des axones ipsilatéraux de CGR dans la vision binoculaire a été faite dans le chapitre IV. Dans les pages qui suivent nous allons voir quelles sont les limitations et les implications de ces travaux, en décrivant comment ces résultats pourront servir de base à des études plus poussées sur les régulations de guidage axonal. Enfin j'insisterai sur la pertinence générale et les aspects cliniques qui pourraient être associés à l'étude des voies moléculaires décrites dans ces travaux.

1. Boc et Shh, un couple de guidage ambivalent

1.1 Rôles attractifs et répulsifs de Shh dans le système visuel

Shh repousse les axones des CGR au chiasma (P. Fabre, et al., 2008; P. J. Fabre, et al., 2010; Trousse, et al., 2001), mais la présence de Shh dans la rétine suggère qu'un mécanisme prévient (ou inverse) un tel effet dans la rétine (Kolpak, et al., 2005).

Les observations que nous avons faites *in vitro* indiquent que Shh induit la rétraction et le collapsus des CGR (Chapitre III, Figure 3.2). Cependant, le type d'essai que nous avons utilisé ne nous permet pas d'observer des effets positifs de Shh, et ce pour deux

raisons. D'une part l'ajout de ShhN sur des explants en bain de culture *in vitro* n'est pas un test directionnel de l'action de Shh, ce qui exclut la possibilité de détecter un phénomène d'attraction. D'autre part, de nombreux axones restent à l'intérieur de l'explant, et sont donc exclus de l'analyse. Ce dernier point pourrait aussi expliquer pourquoi le pourcentage d'axones qui répondent à ShhN *in vitro* (24,5%) est supérieur au pourcentage d'axones ipsilatéraux générés *in vivo* (entre 5 et 15% à cet âge). Notre laboratoire a récemment développé une nouvelle technique permettant l'analyse directionnelle du guidage des axones de neurones dissociés (Yam, et al., 2009). Il serait intéressant de réaliser des purifications des CGR de souris E15 et ainsi de tester pour un effet potentiellement attractif de Shh en utilisant cet essai de guidage directionnel.

1.2 Rôles attractif et répulsifs de Shh dans la moelle épinière

Dans la moelle épinière, Shh a d'abord été identifié comme un chimioattractant qui attire les axones des neurones commissuraux vers la plaque basale (Charron, et al., 2003). Cet effet est dépendant de *Boc* et nécessite l'activation de Smo (Charron, et al., 2003; Okada, et al., 2006). Une fois que les axones commissuraux ont croisé la plaque basale, Shh semble avoir un tout autre rôle. En effet, Shh est exprimé en gradient décroissant le long de l'axe rostro-caudal de la moelle épinière en développement (stade 25 chez le poulet), et exerce une action chimioréulsive sur les axones commissuraux alors que ceux-ci progressent rostralement le long de la moelle épinière (Bourikas, et al., 2005). De façon surprenante, cet effet ne requiert pas Smo, et utilise même un récepteur différent, Hip, dont la régulation de l'expression apparaît de manière transitoire dans les neurones commissuraux, au moment où ils font le choix de tourner antérieurement après avoir traversé la plaque basale (Bourikas, et al., 2005).

On a vu dans l'introduction de cette thèse que la plupart des molécules de guidage peuvent servir aussi bien de chimioattractant que de chimiorépulsif. Plusieurs mécanismes ont été proposés, mais une stratégie récurrente pour moduler les effets de guidage est l'expression sélective d'un co-récepteur qui fait basculer la réponse au ligand.

Un exemple est celui de la nétrine et son couple de récepteurs DCC-Unc5. La nétrine est un chimioattractant classique pour les neurones commissuraux. Cet effet d'attraction passe le récepteur à la nétrine DCC. Toutefois, l'expression d'une autre composante membranaire, Unc5C, permet d'inverser cet effet. Ainsi, l'attraction devient répulsion, comme cela a été démontré par essai de pipette sur des neurones commissuraux de xénope (Hong, et al., 1999). Ainsi, en exprimant de façon ectopique une version d'Unc5, il est possible d'induire la répulsion des axones commissuraux. De même, la réponse au ligand Sémaphorine-3E est répulsive pour les axones striataux-nigraux. Or cette réponse répulsive peut être convertie en attraction si le co-récepteur neuropiline-1 est exprimé (Chauvet, et al., 2007).

Dans les études futures, il sera très intéressant de voir si ces mécanismes, qui sont utilisés par la plupart des voies de guidage axonal, sont aussi mis en jeu dans les variations de réponses observées pour le couple Shh-Boc. Ainsi, on pourra se demander si Boc est 1) un récepteur impliqué dans l'effet répulsif des axones commissuraux une fois qu'ils ont croisé la ligne médiane et 2) si le positionnement ipsilatéral des axones des interneurons de la moelle épinière est également le résultat d'une signalisation répulsive par Boc. Enfin, il sera important de caractériser le rôle potentiel des autres récepteurs (Cdo, Hip, Ptch2...) de Shh dans le guidage des CGR au cours du développement, et de déterminer si des

combinaisons de ces récepteurs sont responsables de moduler les effets attractifs et répulsifs observés dans les différentes populations de neurones.

2. Rôle d'un système à molécules de guidage multiples

À travers les travaux présentés ci-dessus, nous avons vu l'importance d'un système à voies de guidage multiples. En effet, Boc et EphB1 sont tous les deux responsables de transmettre un effet répulsif au niveau du chiasma, et on a pu démontrer qu'il faut inactiver les deux voies pour que la fonction comportementale qui est supportée par ce processus de guidage devienne déficiente. On peut facilement comprendre que l'utilisation d'une panoplie de voies de guidage présente un avantage pour raffiner la précision des choix, mais aussi pour permettre des processus de compensation. En effet, lorsqu'une voie est déficiente, la seconde (ou la troisième) peut prendre le relai.

On constate que c'est le cas dans de nombreux systèmes. Ainsi, dans la moelle épinière, la nétrine agit conjointement avec Shh pour attirer les axones commissuraux vers la portion dorso-ventrale. Or, lorsque ces deux voies sont inactivées, il est toujours possible d'observer des axones commissuraux qui sont attirés par la plaque basale (Charron, et al., 2003). Ainsi, l'existence d'au moins un autre facteur restait à déterminer. Nous venons tout juste d'identifier ce troisième facteur, le VEGF, pour son rôle d'attractant pour les neurones commissuraux. Les preuves génétiques et les essais *in vitro* démontrant la fonction du VEGF sont décrits en détail dans l'annexe 1. Nous sommes désormais en présence d'un système mettant en jeu trois molécules attractives pour dicter une seule trajectoire. Même s'il est étonnant à première vue de constater tant de redondance dans le système, il sera particulièrement intéressant d'étudier comment cette multiplicité de signaux de guidage

pourrait être à l'origine d'une navigation de plus haute précision, et si cela met en jeu des mécanismes de synergie.

Parfois, la multiplicité des signaux de guidage vient d'une combinaison de guidage dit de contact, et de guidage chimiotactique. Les cônes de croissance, en plus de suivre une source chimioattractive le font en évoluant sur un substrat permissif. Cet aspect pourrait être revisité. Tous mes travaux sur les CGR *in vitro* ont été réalisés sur du substrat de laminine. Or, celle-ci agit comme un attractant très tôt pour les CGR. Cela pourrait-il masquer un effet dans nos tests *in vitro* ? Aussi, les résultats obtenus sur laminine nous révèlent-ils des effets synergiques ? Une façon de tester cela serait de modifier les concentrations de laminine utilisée dans nos expériences, ainsi que d'essayer de nouveaux substrats (tels que la fibronectine) et chercher à voir si les effets de rétraction induit par Shh persistent.

3. Devenir des CGR ipsilatérales dans nos modèles : une reconversion contralatérale ?

Quand on pense au devenir des fibres ipsilatérales chez nos animaux mutants, que ce soit pour *Boc*, *EphB1*, ou nos doubles mutants *Boc;EphB1*, le premier raisonnement qui vient à l'esprit est que ces fibres prennent le chemin du tractus contralatéral. En effet, en raison de l'absence du récepteur impliqué dans la transduction du message répulsif, les axones de CGR, malgré leur origine ventro-temporale et l'expression du facteur de transcription *Zic2*, devraient donc être attirés, comme les autres axones et poursuivre leur élongation du côté contralatéral. Pour essayer de répondre à cela, des expériences de marquage rétrograde ont été réalisées chez les souris mutantes pour les récepteurs EphB (Williams, et al., 2003). Dans ce cas là, on remarque que chez les souris mutantes, après un

marquage au DiI dans le tract optique, la zone VT de la rétine contralatérale contient plus de corps cellulaires marqués rétrogradement. Ces résultats sont significatifs seulement quand les auteurs analysent, à l'aide d'un gène rapporteur, les cellules mutantes qui auraient dû exprimer *EphB1* (*EphB1^{lacZ/lacZ}*).

Dans les souris dont le gène *Boc* a été inactivé, une expérience similaire pourrait être réalisée pour démontrer que les axones des CGR sont effectivement réorientées dans le tractus optique contralatéral. Des données préliminaires semblent indiquer que c'est le cas puisque sur des sections, l'aire du tract optique dans les mutants *Boc* est inchangée, ce qui suggère que le nombre d'axones (ipsilatéral + contralatéral) qu'il contient est approximativement le même. Une autre façon de tester cela serait d'utiliser une souris qui exprime le transgène GFP sous le contrôle de l'expression d'un promoteur spécifique des CGR ipsilatérales. Une telle souris est depuis peu disponible chez la compagnie JAX (Humphreys, et al., 2010), le promoteur de *FoxD1* étant très spécifique du segment VT de la rétine en développement (Herrera, et al., 2004). Ainsi, en croisant ces souris avec nos mutants, nous pourrions visualiser spécifiquement les fibres ipsilatérales à l'aide de la GFP, Encore mieux, puisque cette lignée exprime également une recombinaise de type Cre sous le contrôle de ce même promoteur, le suivi axonal pourrait être fait à l'aide d'un gène rapporteur s'exprimant spécifiquement lorsque la Cre est active.

Que les fibres ipsilatérales soient réorientées ou absentes dans notre modèle de souris n'altère pas la conclusion que les fibres ipsilatérales sont requises pour l'établissement d'une vision binoculaire normale. Toutefois, si ces fibres sont réorientées, cela pourrait conduire vers de nouvelles questions. Ainsi on pourrait se demander comment

ces fibres s'intègrent au sein des structures cibles comme le CGL, et si elles restent fasciculées entre elles ou bien se mélangent aux axones contralatéraux d'origine non VT.

4. La régulation de la variabilité des comportements des axones à choix binaire par la signalisation EphB, un phénomène dépendant du contexte

Des travaux menés sur des combinaisons de mutants pour *EphB1*, *EphB2* et *EphB3* suggèrent un rôle des récepteurs EphB dans la régulation de la variabilité des décisions lors du guidage des motoneurones à l'entrée du membre (Luria, et al., 2008). Dans cette étude, le phénotype observé en l'absence des récepteurs EphB est une augmentation du nombre d'axones de motoneurones projetant dorsalement au lieu d'être repoussés vers la partie ventrale du membre. Or, cette élévation n'est pas observée de façon consistante chez tous les animaux mutants puisque moins il y a de récepteurs EphB, et plus les valeurs observées diffèrent de la moyenne.

Dans notre étude, le phénotype de guidage observé est une réduction du nombre de fibres ipsilatérales. Or, lorsque l'on diminue le nombre de récepteurs EphB présents, nous n'avons pas constaté d'augmentation des écarts à la moyenne. Ceci semble être similaire à ce qui a été observé avec des mutants *EphB* au niveau du chiasma (Williams, et al., 2003). L'hypothèse la plus plausible pour expliquer l'absence de ce phénomène dans notre système est probablement reliée au choix par défaut que les axones peuvent faire en l'absence de la signalisation EphB. Ainsi, pour les axones de motoneurones, l'inactivation des *EphB* impose aux cônes de croissance de motoneurones de redéfinir leur choix entre dorsal et ventral, un choix qui s'avère de plus en plus aléatoire au fur et à mesure que la signalisation est réduite. Dans le cas du guidage des CGR, l'absence de signalisation EphB

impose aux CGR de prendre le choix par défaut, c'est-à-dire la trajectoire contralatérale, un choix qui, chez les quadruples mutants, n'est plus dicté par aucune signalisation répulsive.

5. Vision binoculaire : le rôle fondamental du chiasma et des projections ipsilatérales

5.1 Preuves d'un rôle distinct des différentes commissures

L'intégration des signaux visuels en provenance des deux yeux peut se faire à divers niveaux du cerveau. On sait, d'après des études électro-physiologiques et d'imagerie, que les premiers neurones qui reçoivent des afférences binoculaires se situent dans le V1, et que ce message est traité plus finement dans les aires secondaires et tertiaires, dont certaines zones ne sont activées que lorsque les deux rétines sont sollicitées (Parker, 2007). Des transections effectuées dans le plan sagittal au niveau du chiasma ou du corps calleux ont été réalisées dans les années 80 pour déterminer le rôle respectif de chaque commissure. Ainsi, ces expériences, faites chez le chat, ont révélé d'importants défauts de stéréopsie après section du chiasma, tandis que les altérations étaient à peine notables lorsque la chirurgie avait eu lieu au niveau du corps calleux (Lepore, Ptito, & Lassonde, 1986; Ptito, Lepore, & Guillemot, 1991; Timney & Lansdown, 1989).

5.2 Limites et implications de la perte des fibres ipsilatérales

Au delà d'apporter la preuve du rôle des projections ipsilatérales dans une fonction visuelle spécifiquement binoculaire, les travaux rapportés dans cette thèse ont conforté l'idée de l'importance de la ségrégation des axones ipsilatéraux au chiasma pour une perception fine de la profondeur de champs chez le rongeur. Toutefois, plusieurs points restent à élucider dans ce nouveau modèle génétique. Tout d'abord, on peut se demander

s'il y a d'autres facteurs qui sont à l'origine de l'incapacité de nos souris à réussir le test de précipice. Il se peut en effet que, malgré une vision globale fonctionnelle, la vision à longue distance soit affectée. En effet, notre essai témoins visant à vérifier la bonne vue des souris (test de placement vertical) implique le positionnement d'une barre à 1 ou 2 cm du museau de l'animal. Or, sur la plateforme de précipice, une vision de loin (60 cm) est requise pour définir le côté apparemment à risque. De façon plus générale, il sera bon de caractériser ces aspects de façon plus fine. Nos tests préliminaires indiquent que la structure de la rétine n'est pas affectée. Toutefois, on pourrait réaliser un électrorétinogramme pour confirmer le bon fonctionnement de la rétine. Enfin, il sera bon de tester la vision de loin chez nos animaux mutants.

D'autre part, les gènes *Boc* et *EphB1* sont exprimés dans d'autres régions du cerveau. Ainsi, *Boc* est important pour le développement du cervelet (Izzi, et al., 2011). *EphB1* est exprimé dans l'hippocampe (Henkemeyer, Itkis, Ngo, Hickmott, & Ethell, 2003). L'inactivation des récepteurs *Boc* et *EphB* pourrait donc avoir des conséquences sur le comportement de l'animal qui, pour une raison encore inconnue, deviendrait plus enclin à s'aventurer du côté 'précipice' de la plateforme. Un test général de l'anxiété, comme le labyrinthe d'espaces ouverts, pourrait ainsi être réalisé pour s'assurer d'un comportement normal de nos animaux mutants. C'est un test qui sert à mesurer l'anxiété chez les souris en les mettant à l'épreuve entre l'envie naturelle d'explorer et la peur des espaces ouverts. On peut conclure que plus un animal est anxieux, moins il passera de temps dans les corridors ouverts. Il faudrait cependant adapter ce test pour que les espaces ouverts ne soient pas situés en hauteurs.

5.3 Rôle des facteurs monoculaires dans la perception de la profondeur

Il existe d'autres processus visuels qui peuvent expliquer l'appréciation des distances et la détection de la profondeur sans pourtant nécessiter l'implication des deux yeux. Parmi ces facteurs, on peut retenir le parallaxe de mouvement. Celui-ci permet, lors du déplacement de l'animal dans un espace tridimensionnel, d'apprécier la distance relative des différents objets par la rapidité relative des changements de perspectives. Ainsi, un objet éloigné changera moins d'apparence qu'un objet plus rapproché. De même, un objet rapproché pourra masquer la vision d'un objet éloigné lors d'un mouvement, indiquant la position relative de l'un par rapport à l'autre. Toutefois, les seuils de détection autorisés par les parallaxes de mouvements ne sont pas aussi fins que ceux qui peuvent être produits grâce à la fusion de deux images chevauchantes perçues binoculairement (Steinman, & Garzia, 2000).

5.4 Relations entre le nombre de fibres ipsilatérales et la capacité à percevoir la profondeur

Il a été observé très tôt qu'il existait une corrélation entre le degré de vision binoculaire (lié à la position des yeux et à leur orientation) et le pourcentage de fibres ipsilatérales (Figure 11). C'est-à-dire que plus le champ de vision entre les deux yeux se chevauche, et plus la ségrégation au niveau du chiasma est élevée. Ainsi, tandis que les oiseaux adultes et les poissons ne possèdent pas de projections visuelles ipsilatérales (O'Leary, et al., 1983), les souris, dont les yeux partagent un étroit champ de vision, ont un pourcentage de fibres ipsilatérales de l'ordre de 5%, et les furets, qui appartiennent au genre des mustélidés, de l'ordre de 15%. Enfin, chez l'homme, chez qui la vision binoculaire est particulièrement élaborée, on retrouve près de 50% des axones de CGR qui ne croisent pas

au niveau du chiasma optique. Plusieurs groupes ont ainsi émis le postulat du rôle essentiel des connexions ipsilatérales dans la vision binoculaire et donc la perception de la profondeur (Herrera, et al., 2003; Pak, et al., 2004; Williams, et al., 2006). Toutefois, aucune preuve formelle n'avait été fournie quand à la validité de ce postulat. En effet, on aurait tout aussi bien pu imaginer que les informations visuelles en provenance des fibres contralatérales auraient suffi à permettre la fusion des deux images, plusieurs structures cérébrales permettant des décussation entre les deux hémisphères cérébraux, comme le corps calleux, pouvant servir de module de partage nécessaire à l'élaboration d'une vision binoculaire. Les expériences que j'ai décrites plus haut, dans lesquelles des sections des commissures cérébrales ont été réalisées, ont ainsi visé à distinguer les rôles respectifs du corps calleux et du chiasma optique (Lepore, et al., 1986). Toutefois, le rôle de la ségrégation au chiasma restait à explorer puisque une section à ce niveau est responsable, chez le chat (15 à 20% de fibres ipsilatérales seulement) de la perte de la quasi-totalité des connexions visuelles. En effet, en sectionnant le chiasma chirurgicalement, l'animal perd en peu de temps toutes ses fibres contralatérales, et probablement une partie des fibres ipsilatérales (cela n'a pas été vérifié à l'époque). Il n'est donc pas étonnant d'observer des difficultés visuelles chez les animaux ayant subi la chirurgie, en particulier pour ce qui est des fonctions stéréoptiques. Nos expériences ont ainsi permis de lever le voile sur la part que jouent les fibres ipsilatérales dans ce processus, et ont également permis d'indiquer que le corps calleux n'était pas responsable, ou en tout cas suffisant, pour une convergence post-thalamique à l'origine de la stéréopsie.

On a vu plus haut que les oiseaux et les poissons ne possèdent pas de fibres ipsilatérales. Les études conduites chez le poulet et le poisson zèbre reflètent donc bien,

dans ces modèles, la corrélation entre chevauchement des champs visuels (latéralité des yeux) et présence de fibres ipsilatérales. Sans revenir sur l'utilité de la stéréopsie dans les processus vitaux, il est intéressant de noter que, chez certaines espèces d'oiseaux (chouette, rapaces) et de poissons prédateurs (requins), la position des yeux leur permet d'intégrer une vision binoculaire qui peut s'avérer utile pour apprécier la profondeur alors qu'ils essayent de déterminer la position de leur proie. Ces espèces-là ont-elles des fibres ipsilatérales ou utilisent-t-elles le corps calleux pour faire la fusion des 2 images ? Des études plus poussées sur les mécanismes qui sous-tendent ce phénomène chez ces espèces seront nécessaires et nous permettront de mieux comprendre le fonctionnement général et les différentes composantes de l'établissement de la vision binoculaire.

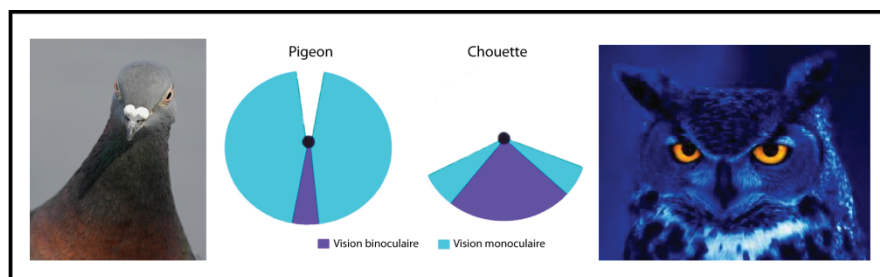


Figure 4. 1. Illustrations des champs binoculaires de différentes espèces d'oiseaux.

6. Molécules de guidage axonal ou molécules à usages multiples

6.1. Autres fonctions neuronales

Au-delà de Shh, molécule morphogénique réutilisée au cours du développement pour guider les axones, de nombreuses études ont démontré récemment que Shh, mais aussi les molécules dites « classiques » de guidage collaborent dans divers processus neuronaux qui précèdent le guidage axonal, tels que la prolifération et la migration neurales, ou qui lui

sont subséquents pour des fonctions plus tardives telles que la synaptogenèse et la régénération axonale (Figure 5.2) (Kolodkin & Tessier-Lavigne, 2011).

6.2. Processus « non-neuronaux »

Plus récemment, il a été découvert que les mêmes molécules de guidage axonal servent à des fins et sur des types cellulaires « non neuronaux » tels que l'angiogenèse, l'organogenèse ou la tumorigenèse (Carmeliet & Tessier-Lavigne, 2005). Ainsi, la Nétrine-1 et la Nétrine-4, en agissant directement sur les cellules endothéliales, stimulent leur prolifération, leur migration et enfin la formation des vaisseaux (B. D. Wilson, et al., 2006). Dans le système vasculaire, ces effets semblent ne pas dépendre du récepteur classique DCC qui n'est pas exprimé par les cellules endothéliales. En revanche, des études ont démontré que l'action des nétrines est spécifiquement transmise par le récepteur Unc5b et la néogénine, des récepteurs impliqués dans le guidage répulsif des axones de la rétine (Lejmi, et al., 2008; Lu, et al., 2004).

6.3. Des molécules 'non-neuronaux' au service du câblage nerveux

Inversement, les molécules du système cardiovasculaire ont récemment été impliquées dans des processus de guidage axonal. L'exemple du VEGF est le plus remarquable. Cette protéine sécrétée a été identifiée initialement pour son rôle crucial dans la régulation de la perméabilité vasculaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, et plus généralement dans la formation des vaisseaux sanguins (angiogenèse) (Carmeliet, 2005; Leung, Cachianes, Kuang, Goeddel, & Ferrara, 1989).

Le Recyclage des Molécules du Guidage Axonal

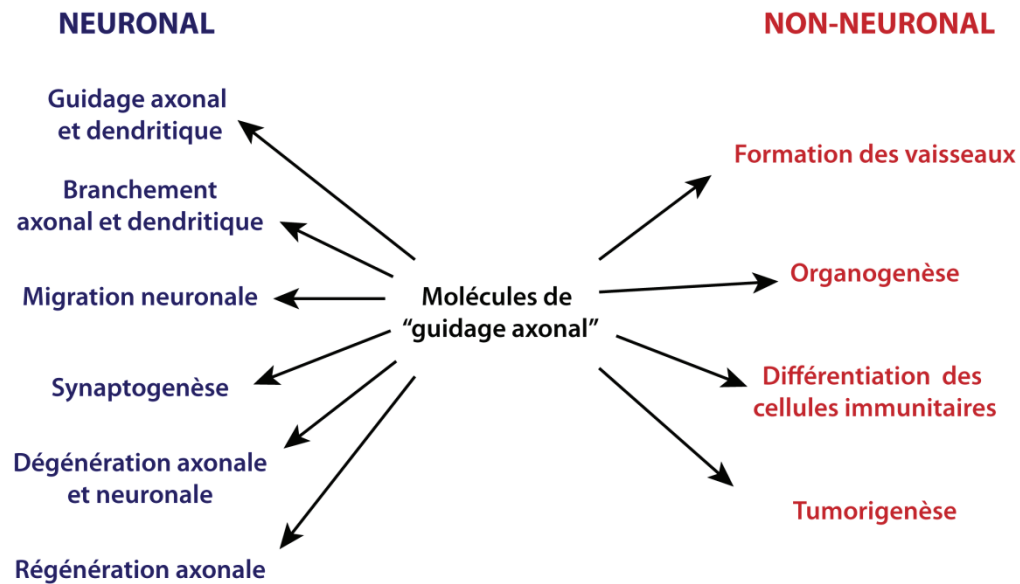


Figure 4. 2. Les molécules de guidage axonal au service de nombreuses fonctions neuronales et non neuronales.

(D'après (Kolodkin & Tessier-Lavigne, 2011))

Très récemment, nous avons ainsi montré que le VEGF était aussi une molécule attractive qui guidait les axones commissuraux lors de leur extension dorso-ventrale en direction de la plaque basale de la moelle épinière en développement (Ruiz de Almodovar, et al., 2011) (Voir annexe 1). Ainsi, cette molécule, qui est exprimée par les cellules de la plaque basale, collabore avec Shh et Nétrine dans le guidage attractif des axones commissuraux (Dickendesher & Giger, 2011; P. Fabre, et al., 2008). Puisque le VEGF est essentiel à la formation des vaisseaux, et que son inactivation entraîne des effets d'hypoxie, la démonstration de l'action du VEGF a donc nécessité la mise en évidence de son action directe (et non indirecte via les vaisseaux sanguins). Ainsi, c'est encore une fois *in vitro*, en utilisant le système des chambres de Dunn (Yam, et al., 2009), que nous avons apporté la

preuve formelle que le VEGF avait un effet attractif direct sur des préparations pures de neurones commissuraux. Enfin, nous avons démontré que cet effet était spécifique de la voie VEGF puisque, en inactivant conditionnellement et spécifiquement dans les neurones commissuraux le récepteur de VEGF (Flk1) requis pour cet effet, cela permettait de phénotyper l'inactivation génétique de VEGF. De façon intéressante, un autre groupe a pu démontrer une action similaire du VEGF agissant comme attractant pour les axones commissuraux de la rétine (Erskine, et al., 2011). Dans ce cas, les auteurs ont démontré chez la souris que l'effet passait par un autre récepteur, la Neuropiline1, et que la spécificité d'expression de ce récepteur dans les CGR contralatérales était à l'origine de l'attraction spécifique de leurs axones au niveau du chiasma. Ainsi, le VEGF contribue aussi à la ségrégation au niveau du chiasma en aidant les CGR contralatérales à traverser.

L'article présenté dans l'annexe 1 décrit le rôle que joue le VEGF, en collaboration avec la nétrine-1 et Shh, dans le guidage des axones commissuraux. Cette partie de mon travail de doctorat a ainsi permis d'explorer le rôle d'un de ces facteurs 'non neuronaux' qui sont utilisés durant le développement pour le guidage des axones. Les études futures viseront à définir comment l'activation de plusieurs voies peuvent optimiser la réponse lors du guidage, et comment plusieurs voies de guidage pourraient éventuellement induire une synergie dans l'efficacité ou la finesse de la réponse.

7. Pertinence vis-à-vis des processus pathologiques

Les maladies affectant le système nerveux central sont de plus en plus répandues à travers le monde. Aussi, des mutations et des dérégulations de gènes composant les voies éphrines et Shh, mais aussi les molécules de guidage en général, sont de plus en plus incriminées dans divers processus pathologiques d'ordre neurologique, parfois en

association avec des conditions développementales majeures (Engle, 2010; Izzi & Charron, 2011).

7.1. Bases génétiques à la source de désordres neurologiques

7.1.1 Mutations affectant les récepteurs du guidage axonal et maladies du système nerveux

Plusieurs maladies impliquant des défauts de guidage axonal chez l'homme ont récemment été identifiées. Les meilleurs exemples concernent les récepteurs pour les Slits, ROBO3 (ou RIG1), et pour les nétrines, DCC (Izzi & Charron, 2011). Plusieurs mutations des gènes codant pour ces récepteurs ont ainsi été identifiées.

7.1.1.1 Mutations du gène ROBO3. Elles conduisent à de multiples défauts qui affectent plusieurs structures du cerveau (Jen, et al., 2004). Cet ensemble d'anomalies développementales est désigné sous le nom de syndrome de paralysie de l'horizontalité du regard et scoliose progressive (Izzi & Charron, 2011). C'est une condition rare à transmission autosomique récessive qui s'expliquerait en partie par des défaillances dans le croisement de plusieurs faisceaux à la ligne médiane. Notons que le récepteur ROBO3 partage une forte homologie avec le récepteur BOC, et que tous deux ont été impliqués dans des défauts de croisement de la ligne médiane. Ainsi, des études futures avec des patients atteints de troubles similaires pourraient potentiellement révéler des mutations dans des molécules de guidages de ce type.

7.1.1.2 Mutations de DCC. Elles ont été impliquées dans une condition tout à fait particulière, les mouvements miroirs (Srour, et al., 2010). Chez les patients hétérozygotes pour ces mutations, les gestes intentionnels initiés d'un côté du corps sont suivis de façon

quasi-synchrone par le même geste de l'autre côté du corps. Ce trouble, qui implique la réalisation involontaire des mouvements symétriques, ou miroirs, et qui se manifeste dès l'enfance, serait aussi dû à des défauts de croisements de la ligne médiane pour les axones des tractus cortico-spinaux. Des études menées dans notre laboratoire ont ainsi montré que les mutations dans ce récepteur, qui est aussi structurellement proche de *Boc*, conduisent à la production d'une protéine tronquée qui perd la capacité de lier ses ligand, les nétrines (Srouf, et al., 2010). Il sera intéressant de voir si tels troubles existent chez les souris mutantes pour *Boc* ou pour *Flk-1*, le récepteur responsable de l'attraction par VEGF au niveau de la moelle épinière (Ruiz de Almodovar, et al., 2011).

7.1.2 VACTERL, un syndrome associé à des mutations de gènes codants pour des ligands

VACTERL est un acronyme utilisé pour décrire une association d'anomalies vertébrales, d'atrésie anale, de cardiopathie congénitale, de fistule trachéo-œsophagienne, de troubles rénaux et d'un défaut des membres (l pour limb en anglais). Ce syndrome congénital ressemblerait aux phénotypes observés chez des souris ayant des mutations dans les voies *Shh* (Kim, Kim, & Hui, 2001) ou éphrine-B2 (Dravis & Henkemeyer, 2011). De façon générale, les mutations dans des gènes codant pour des molécules pléiotropes sont souvent à l'origine de syndrome à défauts multiples. Ainsi, des mutations dans *Shh* causent l'holoprosencéphalie, une condition distincte mais qui a de nombreuses similitudes avec le syndrome VACTERL.

7.2 Bases génétiques des défauts de croissance axonale des CGR et troubles de la vision binoculaire

7.2.1 Exemple du glaucome : implication du locus du gène EphB1

Le glaucome est, avec plus de 8 millions de cas répertoriés, la seconde cause de déficit de la vision et de cécité dans le monde (Resnikoff, et al., 2004). Il survient lorsque les axones des CGR dégèrent au sein du nerf optique, entraînant une perte progressive de la vision par rétrécissement des champs visuels. La cause principale de la dégénérescence est une pression intraoculaire élevée. Toutefois, dans un tiers des cas, cette pression n'est pas trop élevée, et des preuves pointent vers des facteurs génétiques.

La forme la plus fréquente d'une telle cause de cécité est le glaucome chronique à angle ouvert (ou POAG pour le sigle anglais). Or, une étude a cartographié le locus 3q21-3q24 chez une cohorte de patients atteints de cette forme de glaucome qui se déclare chez l'adulte (Wirtz, et al., 1997). Plusieurs gènes sont présents dans cette région chromosomique, mais aucun d'entre eux n'a été impliqué dans la maladie depuis la découverte du locus (Fuse, 2010). Il est donc intéressant de noter que le locus du gène *EphB1* se trouve, chez l'homme dans la partie 3q21-3q23, c'est-à-dire dans cette exacte région chromosomique. Puisque l'expression d'*EphB1* dans la rétine est, chez l'homme, bien plus étendue que chez la souris (Lambot, et al., 2005), il est raisonnable d'émettre l'hypothèse qu'*EphB1* pourrait être un facteur de susceptibilité pour cette condition. Plus récemment, une étude a démontré que l'expression d'*EphB1* était augmentée par suite de l'élévation de la pression oculaire dans un modèle de glaucome induit au laser chez le singe, suggérant qu'*EphB1* pourrait avoir un rôle protecteur dans cette pathologie (Schmidt, Agapova, Yang, Kaufman, & Hernandez, 2007). Des études plus poussées seront

nécessaires pour déterminer les causes et effets qu'*EphB1* pourrait avoir dans le développement de cette maladie. Chez l'homme, chez qui le pourcentage de fibres ipsilatérales avoisine les 50%, il est intéressant de noter que le locus du gène *Boc* (3q13.2) se trouve sur le même bras chromosomique, à 20Mb du gène *EphB1*. Ainsi, on peut se demander si cette distance pourrait permettre une éventuelle co-régulation de l'expression de ces gènes au cours du développement. Toutefois, en ce qui concerne le glaucome, le locus du gène *Boc* n'est jamais ressorti des études de liaison génétique.

Enfin, chez l'homme, l'implication dans le glaucome d'un facteur responsable de l'établissement de la vision binoculaire ne serait pas surprenante à la lumière des études qui montrent qu' *EphB1* est exprimé dans toute la rétine temporale chez cette espèce (Lambot, et al., 2005), et des études préliminaires montrant des déficits de stéréopsie chez des patients atteints de glaucome (Bassi & Galanis, 1991; Gupta, Krishnadev, Hamstra, & Yucel, 2006).

7.2.2 L'albinisme.

Une diminution des projections ipsilatérales et des défauts de vision binoculaire ont été rapportés chez des sujets albinos (Cobo-Lewis, Siatkowski, Lavina, & Marquez, 1997).

Cela pourrait être lié, au moins en partie, à une diminution de la composante ipsilatérale chez les humains albinos (Guillery, Okoro, & Witkop, 1975). Cette faible proportion de fibres ipsilatérales est aussi observée chez les animaux albinos, et ce dans plusieurs espèces, dont la souris, le rat, le furet et le chat. Ainsi, l'albinisme est probablement le premier modèle qui semblait associer une perte de fibres ipsilatérales à un défaut visuel de perception de la profondeur. Toutefois, chez les souris albinos, des études

réalisées au moyen du test de précipice n'ont pas permis de les distinguer des souris témoins (Fox, 1965). De plus, de nombreux défauts dans la rétine, notamment lors de la neurogenèse des CGR rendent cette interprétation difficile (Rachel, et al., 2002). Ceci est également vrai chez les sujets albinos qui démontrent des défauts de vision plus sévères impliquant généralement des hypoplasies de la fovéa (McAllister, et al., 2010).

7.3 Quel potentiel pour la régénération axonale suivant des lésions du système nerveux

Dans le système nerveux central, les axones endommagés ont perdu la capacité à repousser. Ces lésions conduisent ultimement à la dégénération du neurone. De nombreux travaux visent à rétablir ce potentiel de croissance axonale pour permettre aux axones de se reconnecter avec leur cible. Une façon simple en apparence pour aider à la repousse de ces axones serait de délivrer aux axones lésés les facteurs de croissance, trophiques et de guidage axonal pour retracer le chemin permettant à l'axone de rejoindre sa cible. Les deux principaux sites de lésion étudiés sont la moelle épinière et le nerf optique. Puisque Shh a été découvert comme un chimioattractant dans la moelle épinière (Charron, et al., 2003), on peut se demander si son utilisation pourrait être bénéfique pour aider les axones de moelle épinière à régénérer. Cela ne s'avère pas si facile. D'abord, dans l'axe antéro-postérieur, Shh a un effet répulsif sur les axones (Bourikas, et al., 2005). Ensuite, on ne sait pas si les récepteurs et la machinerie de signalisation en aval de Shh sont présents aux stades post-nataux. Enfin, même si la machinerie était présente, de nombreuses études ont montré que la sur-activation de la voie induite par Shh chez l'adulte est à l'origine de tumeurs (Rubin & de Sauvage, 2006). Malgré tout, des cribles de petites molécules ont permis de développer des agonistes et des antagonistes de Shh ou de ses récepteurs qui sont très efficaces, rendant

réalisable des études *in vivo* pour déterminer si la voie Shh peut être ciblée lors de la régénération axonale.

A la lumière de nos travaux, on discerne plusieurs points à considérer avant la mise en place de telles tentatives. Tout d'abord, en étudiant le rôle de Boc, on a découvert que ce récepteur était crucial pour relayer les effets de guidage de Shh. Il représente ainsi une cible privilégiée. En effet, alors que des manipulations générales de la signalisation de Shh mènent au développement de tumeurs ou à des malformations sévères, on a vu que la manipulation de Boc seul n'est à l'origine que de défauts de guidage axonal (P. J. Fabre, et al., 2010; Okada, et al., 2006). Ainsi, en ciblant le récepteur Boc, on pourrait agir spécifiquement sur le guidage des axones. Ensuite, au-delà de la mise à jour d'un rôle ambivalent de ce récepteur, on a démontré que cette ambivalence dépendait du type cellulaire. En effet, tandis que Boc joue un rôle attractif dans la moelle épinière (Okada, et al., 2006), il a un effet répulsif dans le nerf optique (P. J. Fabre, et al., 2010). Ceci devra donc être pris en compte lors d'études futures. Enfin, on a vu que dans le cas des CGR, l'inactivation de plusieurs voies de guidage était plus efficace que celle d'une seule. Ainsi, dans le système visuel, nos travaux suggèrent que des combinaisons d'inhibition des signalisations Boc et EphB pourraient être envisagées pour obtenir de meilleurs résultats dans le cadre d'étude visant à améliorer la repousse axonale.

BIBLIOGRAPHIE

- Allen, B. L., Song, J. Y., Izzi, L., Althaus, I. W., Kang, J. S., Charron, F., et al. (2011). Overlapping Roles and Collective Requirement for the Coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH Pathway Function. *Dev Cell*, 20(6), 775-787.
- Apkarian, P., & Reits, D. (1989). Global stereopsis in human albinos. *Vision Res*, 29(10), 1359-1370.
- Ashe, H. L., & Briscoe, J. (2006). The interpretation of morphogen gradients. *Development*, 133(3), 385-394.
- Augsburger, A., Schuchardt, A., Hoskins, S., Dodd, J., & Butler, S. (1999). BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron*, 24(1), 127-141.
- Barresi, M. J., Hutson, L. D., Chien, C. B., & Karlstrom, R. O. (2005). Hedgehog regulated Slit expression determines commissure and glial cell position in the zebrafish forebrain. *Development*, 132(16), 3643-3656.
- Basler, K., Edlund, T., Jessell, T. M., & Yamada, T. (1993). Control of cell pattern in the neural tube: regulation of cell differentiation by dorsalin-1, a novel TGF beta family member. *Cell*, 73(4), 687-702.
- Bassi, C. J., & Galanis, J. C. (1991). Binocular visual impairment in glaucoma. *Ophthalmology*, 98(9), 1406-1411.
- Bérubé, L. (1991). *Terminologie de neuropsychologie et de neurologie du comportement*. Montreal: Les Éditions de la Chenelière.
- Birgbauer, E., Cowan, C. A., Sretavan, D. W., & Henkemeyer, M. (2000). Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development*, 127(6), 1231-1241.
- Bouquet, C., & Nothias, F. (2007). Molecular mechanisms of axonal growth. *Adv Exp Med Biol*, 621, 1-16.
- Bourikas, D., Pekarik, V., Baeriswyl, T., Grunditz, A., Sadhu, R., Nardo, M., et al. (2005). Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat Neurosci*, 8(3), 297-304.
- Briscoe, J., & Ericson, J. (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol*, 11(1), 43-49.
- Brown, L. Y., Kottmann, A. H., & Brown, S. (2003). Immunolocalization of Zic2 expression in the developing mouse forebrain. *Gene Expr Patterns*, 3(3), 361-367.
- Bumcrot, D. A., Takada, R., & McMahon, A. P. (1995). Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol Cell Biol*, 15(4), 2294-2303.
- Callaway, E. M. (1998). Local circuits in primary visual cortex of the macaque monkey. *Annu Rev Neurosci*, 21, 47-74.

- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932-936.
- Carmeliet, P., & Tessier-Lavigne, M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*, 436(7048), 193-200.
- Cepko, C. L., Austin, C. P., Yang, X., Alexiades, M., & Ezzeddine, D. (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(2), 589-595.
- Charrier, J. B., Lapointe, F., Le Douarin, N. M., & Teillet, M. A. (2001). Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development*, 128(20), 4011-4020.
- Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A. P., & Tessier-Lavigne, M. (2003). The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell*, 113(1), 11-23.
- Charron, F., & Tessier-Lavigne, M. (2005). Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development*, 132(10), 2251-2262.
- Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., et al. (2007). Gating of Semaphorin 3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron*, 56(5), 807-822.
- Chen, J. K., Taipale, J., Young, K. E., Maiti, T., & Beachy, P. A. (2002). Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22), 14071-14076.
- 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*, 82(3), 371-381.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., et al. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, 383(6599), 407-413.
- Cloutier, J. F., Sahay, A., Chang, E. C., Tessier-Lavigne, M., Dulac, C., Kolodkin, A. L., et al. (2004). Differential requirements for semaphorin 3F and Slit-1 in axonal targeting, fasciculation, and segregation of olfactory sensory neuron projections. *J Neurosci*, 24(41), 9087-9096.
- Cobo-Lewis, A. B., Siatkowski, R. M., Lavina, A. M., & Marquez, L. C. (1997). Poor stereopsis can support size constancy in albinism. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(13), 2800-2809.
- Colavita, A., Krishna, S., Zheng, H., Padgett, R. W., & Culotti, J. G. (1998). Pioneer axon guidance by UNC-129, a *C. elegans* TGF-beta. *Science*, 281(5377), 706-709.
- Colello, R. J., & Guillery, R. W. (1990). The early development of retinal ganglion cells with uncrossed axons in the mouse: retinal position and axonal course. *Development*, 108(3), 515-523.

- Dale, J. K., Vesque, C., Lints, T. J., Sampath, T. K., Furley, A., Dodd, J., et al. (1997). Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell*, *90*(2), 257-269.
- Deiner, M. S., Kennedy, T. E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., & Sretavan, D. W. (1997). Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron*, *19*(3), 575-589.
- Dickendesher, T. L., & Giger, R. J. (2011). VEGF shows its attractive side at the midline. *Neuron*, *70*(5), 808-812.
- Ding, Q., Fukami, S., Meng, X., Nishizaki, Y., Zhang, X., Sasaki, H., et al. (1999). Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol*, *9*(19), 1119-1122.
- Drager, U. C. (1985). Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, *224*(1234), 57-77.
- Drager, U. C., & Olsen, J. F. (1980). Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol*, *191*(3), 383-412.
- Dravis, C., & Henkemeyer, M. (2011). Ephrin-B reverse signaling controls septation events at the embryonic midline through separate tyrosine phosphorylation-independent signaling avenues. *Dev Biol*, *355*(1), 138-151.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, 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*, *82*(3), 359-370.
- Ericson, J., Muhr, J., Jessell, T. M., & Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube. *Int J Dev Biol*, *39*(5), 809-816.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., et al. (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell*, *90*(1), 169-180.
- Erskine, L., & Herrera, E. (2007). The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol*, *308*(1), 1-14.
- Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J. M., et al. (2011). VEGF Signaling through Neuropilin 1 Guides Commissural Axon Crossing at the Optic Chiasm. *Neuron*, *70*(5), 951-965.
- Fabre, P., Morin, S., & Charron, F. (2008). Une histoire de guidage axonal très attirante [Sonic hedgehog and Boc: a very attractive story about axons]. *Med Sci*, *24*(2), 129-131.
- Fabre, P. J., Shimogori, T., & Charron, F. (2010). Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. *J Neurosci*, *30*(1), 266-275.

- Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature*, *386*(6627), 796-804.
- 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*(3), 563-574.
- Flanagan, J. G., & Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci*, *21*, 309-345.
- Fox, M. W. (1965). The visual cliff test for the study of visual depth perception in the mouse. *Anim Behav*, *13*(2), 232-233.
- Fuse, N. (2010). Genetic bases for glaucoma. *Tohoku J Exp Med*, *221*(1), 1-10.
- Fuse, N., Maiti, T., Wang, B., Porter, J. A., Hall, T. M., Leahy, D. J., et al. (1999). Sonic hedgehog protein signals not as a hydrolytic enzyme but as an apparent ligand for patched. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(20), 10992-10999.
- Garcia-Frigola, C., Carreres, M. I., Vegar, C., & Herrera, E. (2007). Gene delivery into mouse retinal ganglion cells by in utero electroporation. *BMC Dev Biol*, *7*, 103.
- Garcia-Frigola, C., Carreres, M. I., Vegar, C., Mason, C., & Herrera, E. (2008). Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. *Development*, *135*(10), 1833-1841.
- Gibson, E. J., & Walk, R. D. (1960). The "visual cliff". *Sci Am*, *202*(4), 64-71.
- Godement, P., Salaun, J., & Imbert, M. (1984). Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol*, *230*(4), 552-575.
- Godement, P., Salaun, J., & Mason, C. A. (1990). Retinal axon pathfinding in the optic chiasm: divergence of crossed and uncrossed fibers. *Neuron*, *5*(2), 173-186.
- Godement, P., Vanselow, J., Thanos, S., & Bonhoeffer, F. (1987). A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development*, *101*(4), 697-713.
- Godement, P., Wang, L. C., & Mason, C. A. (1994). Retinal axon divergence in the optic chiasm: dynamics of growth cone behavior at the midline. *J Neurosci*, *14*(11 Pt 2), 7024-7039.
- Gordon, J. A., & Stryker, M. P. (1996). Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci*, *16*(10), 3274-3286.
- Gould, A., Itasaki, N., & Krumlauf, R. (1998). Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoid pathway. *Neuron*, *21*(1), 39-51.
- Grover, V. K., Valadez, J. G., Bowman, A. B., & Cooper, M. K. (2011). Lipid modifications of sonic hedgehog ligand dictate cellular reception and signal response. *PLoS One*, *6*(7), e21353.

- Guillery, R. W., Jeffery, G., & Cattanaach, B. M. (1987). Abnormally high variability in the uncrossed retinofugal pathway of mice with albino mosaicism. *Development*, *101*(4), 857-867.
- Guillery, R. W., Okoro, A. N., & Witkop, C. J., Jr. (1975). Abnormal visual pathways in the brain of a human albino. *Brain Res*, *96*(2), 373-377.
- Gupta, N., Krishnadev, N., Hamstra, S. J., & Yucel, Y. H. (2006). Depth perception deficits in glaucoma suspects. *Br J Ophthalmol*, *90*(8), 979-981.
- Hamelin, M., Zhou, Y., Su, M. W., Scott, I. M., & Culotti, J. G. (1993). Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally. *Nature*, *364*(6435), 327-330.
- Hatini, V., Tao, W., & Lai, E. (1994). Expression of winged helix genes, BF-1 and BF-2, define adjacent domains within the developing forebrain and retina. *J Neurobiol*, *25*(10), 1293-1309.
- Haustead, D. J., Lukehurst, S. S., Clutton, G. T., Bartlett, C. A., Dunlop, S. A., Arrese, C. A., et al. (2008). Functional topography and integration of the contralateral and ipsilateral retinocollicular projections of ephrin-A^{-/-} mice. *J Neurosci*, *28*(29), 7376-7386.
- Hedgecock, E. M., Culotti, J. G., & Hall, D. H. (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron*, *4*(1), 61-85.
- Henkemeyer, M., Itkis, O. S., Ngo, M., Hickmott, P. W., & Ethell, I. M. (2003). Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol*, *163*(6), 1313-1326.
- Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R. A., Dolen, G., Mikoshiba, K., et al. (2003). Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell*, *114*(5), 545-557.
- Herrera, E., Marcus, R., Li, S., Williams, S. E., Erskine, L., Lai, E., et al. (2004). Foxd1 is required for proper formation of the optic chiasm. *Development*, *131*(22), 5727-5739.
- Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M., & O'Leary, D. D. (2002). EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron*, *35*(3), 475-487.
- Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M. M., Tessier-Lavigne, M., & Stein, E. (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell*, *97*(7), 927-941.
- Hopker, V. H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., & Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature*, *401*(6748), 69-73.

- Humphreys, B. D., Lin, S. L., Kobayashi, A., Hudson, T. E., Nowlin, B. T., Bonventre, J. V., et al. (2010). Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol*, *176*(1), 85-97.
- Inatani, M., Irie, F., Plump, A. S., Tessier-Lavigne, M., & Yamaguchi, Y. (2003). Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science*, *302*(5647), 1044-1046.
- Izzi, L., & Charron, F. (2011). Midline Axon Guidance and Human Genetic Disorders. *Clin Genet*, *80*(2).
- Izzi, L., Levesque, M., Morin, S., Laniel, D., Wilkes, B. C., Mille, F., et al. (2011). Boc and gas1 each form distinct shh receptor complexes with ptch1 and are required for shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell*, *20*(6), 788-801.
- Jen, J. C., Chan, W. M., Bosley, T. M., Wan, J., Carr, J. R., Rub, U., et al. (2004). Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science*, *304*(5676), 1509-1513.
- Jensen, A. M., & Wallace, V. A. (1997). Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development*, *124*(2), 363-371.
- Jeong, J., & McMahon, A. P. (2002). Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *J Clin Invest*, *110*(5), 591-596.
- Jessell, T. M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*, *1*(1), 20-29.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of neural science* (4th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Keeble, T. R., Halford, M. M., Seaman, C., Kee, N., Macheda, M., Anderson, R. B., et al. (2006). The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci*, *26*(21), 5840-5848.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R., & Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*, *78*(3), 425-435.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., et al. (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell*, *92*(2), 205-215.
- Kim, J., Kim, P., & Hui, C. C. (2001). The VACTERL association: lessons from the Sonic hedgehog pathway. *Clin Genet*, *59*(5), 306-315.
- Kolodkin, A. L., & Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and Molecules of Neuronal Wiring: A Primer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *3*(6).
- Kolpak, A., Zhang, J., & Bao, Z. Z. (2005). Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J Neurosci*, *25*(13), 3432-3441.

- Koncina, E., Roth, L., Gonthier, B., & Bagnard, D. (2007). Role of semaphorins during axon growth and guidance. *Adv Exp Med Biol*, 621, 50-64.
- Kostyk, S. K., & Grobstein, P. (1982). Visual orienting deficits in frogs with various unilateral lesions. *Behav Brain Res*, 6(4), 379-388.
- Kullander, K., & Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(7), 475-486.
- Lambot, M. A., Depasse, F., Noel, J. C., & Vanderhaeghen, P. (2005). Mapping labels in the human developing visual system and the evolution of binocular vision. *J Neurosci*, 25(31), 7232-7237.
- Leamey, C. A., Merlin, S., Lattouf, P., Sawatari, A., Zhou, X., Demel, N., et al. (2007). Ten_m3 regulates eye-specific patterning in the mammalian visual pathway and is required for binocular vision. *PLoS Biol*, 5(9), e241.
- Lejmi, E., Leconte, L., Pedron-Mazoyer, S., Ropert, S., Raoul, W., Lavalette, S., et al. (2008). Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of Unc5B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(34), 12491-12496.
- Lepore, F., Ptilo, M., & Lassonde, M. (1986). Stereoperception in cats following section of the corpus callosum and/or the optic chiasma. *Exp Brain Res*, 61(2), 258-264.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., & Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935), 1306-1309.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237(4819), 1154-1162.
- Lewis, P. M., Dunn, M. P., McMahon, J. A., Logan, M., Martin, J. F., St-Jacques, B., et al. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell*, 105(5), 599-612.
- Li, Y., Zhang, H., Litington, Y., & Chiang, C. (2006). Cholesterol modification restricts the spread of Shh gradient in the limb bud. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17), 6548-6553.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., & Jessell, T. M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell*, 91(1), 127-138.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H., & Jessell, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*, 82(6), 969-979.
- Locker, M., Agathocleous, M., Amato, M. A., Parain, K., Harris, W. A., & Perron, M. (2006). Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev*, 20(21), 3036-3048.
- Lowery, L. A., & Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5), 332-343.

- Lu, X., Le Noble, F., Yuan, L., Jiang, Q., De Lafarge, B., Sugiyama, D., et al. (2004). The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature*, *432*(7014), 179-186.
- Lumsden, A. G., & Davies, A. M. (1983). Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature*, *306*(5945), 786-788.
- Lund, R. D. (1964). Terminal Distribution in the Superior Colliculus of Fibres Originating in the Visual Cortex. *Nature*, *204*, 1283-1285.
- Lund, R. D. (1969). Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol*, *135*(2), 179-208.
- Luo, Y., Raible, D., & Raper, J. A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*, *75*(2), 217-227.
- Lupo, G., Liu, Y., Qiu, R., Chandraratna, R. A., Barsacchi, G., He, R. Q., et al. (2005). Dorsoroventral patterning of the *Xenopus* eye: a collaboration of Retinoid, Hedgehog and FGF receptor signaling. *Development*, *132*(7), 1737-1748.
- Luria, V., Krawchuk, D., Jessell, T. M., Laufer, E., & Kania, A. (2008). Specification of motor axon trajectory by ephrin-B:EphB signaling: symmetrical control of axonal patterning in the developing limb. *Neuron*, *60*(6), 1039-1053.
- Lyuksyutova, A. I., Lu, C. C., Milanesio, N., King, L. A., Guo, N., Wang, Y., et al. (2003). Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science*, *302*(5652), 1984-1988.
- Macias-Silva, M., Hoodless, P. A., Tang, S. J., Buchwald, M., & Wrana, J. L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem*, *273*(40), 25628-25636.
- Mann, F., & Holt, C. E. (2001). Control of retinal growth and axon divergence at the chiasm: lessons from *Xenopus*. *Bioessays*, *23*(4), 319-326.
- Manning, L., Ohshima, K., Saeger, B., Hatano, O., Wilson, S. A., Logan, M., et al. (2006). Regional morphogenesis in the hypothalamus: a BMP-Tbx2 pathway coordinates fate and proliferation through Shh downregulation. *Dev Cell*, *11*(6), 873-885.
- Marcus, R. C., Blazeski, R., Godement, P., & Mason, C. A. (1995). Retinal axon divergence in the optic chiasm: uncrossed axons diverge from crossed axons within a midline glial specialization. *J Neurosci*, *15*(5 Pt 2), 3716-3729.
- Marcus, R. C., Matthews, G. A., Gale, N. W., Yancopoulos, G. D., & Mason, C. A. (2000). Axon guidance in the mouse optic chiasm: retinal neurite inhibition by ephrin "A"-expressing hypothalamic cells in vitro. *Dev Biol*, *221*(1), 132-147.
- Marcus, R. C., Shimamura, K., Sretavan, D., Lai, E., Rubenstein, J. L., & Mason, C. A. (1999). Domains of regulatory gene expression and the developing optic chiasm: correspondence with retinal axon paths and candidate signaling cells. *J Comp Neurol*, *403*(3), 346-358.

- Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M., & Tabin, C. J. (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature*, *384*(6605), 176-179.
- Mason, C. A., Marcus, R. C., & Wang, L. C. (1996). Retinal axon divergence in the optic chiasm: growth cone behaviors and signalling cells. *Prog Brain Res*, *108*, 95-107.
- McAllister, J. T., Dubis, A. M., Tait, D. M., Ostler, S., Rha, J., Stepien, K. E., et al. (2010). Arrested development: high-resolution imaging of foveal morphology in albinism. *Vision Res*, *50*(8), 810-817.
- McLaughlin, T., Hindges, R., Yates, P. A., & O'Leary, D. D. (2003). Bifunctional action of ephrin-B1 as a repellent and attractant to control bidirectional branch extension in dorsal-ventral retinotopic mapping. *Development*(130), 2407-2418.
- Milner, A. D., Lines, C. R., & Migdal, B. (1984). Visual orientation and detection following lesions of the superior colliculus in rats. *Exp Brain Res*, *56*(1), 106-114.
- Mitchell, D. E., & Blakemore, C. (1970). Binocular depth perception and the corpus callosum. *Vision Res*, *10*(1), 49-54.
- Moore, S. W., Tessier-Lavigne, M., & Kennedy, T. E. (2007). Netrins and their receptors. *Adv Exp Med Biol*, *621*, 17-31.
- Morgan, J. E., Henderson, Z., & Thompson, I. D. (1987). Retinal decussation patterns in pigmented and albino ferrets. *Neuroscience*, *20*(2), 519-535.
- Mui, S. H., Kim, J. W., Lemke, G., & Bertuzzi, S. (2005). Vax genes ventralize the embryonic eye. *Genes Dev*, *19*(10), 1249-1259.
- Murone, M., Rosenthal, A., & de Sauvage, F. J. (1999). Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex. *Curr Biol*, *9*(2), 76-84.
- Nakagawa, S., Brennan, C., Johnson, K. G., Shewan, D., Harris, W. A., & Holt, C. E. (2000). Ephrin-B regulates the Ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. *Neuron*, *25*(3), 599-610.
- Nusslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, *287*(5785), 795-801.
- O'Leary, D. M., Gerfen, C. R., & Cowan, W. M. (1983). The development and restriction of the ipsilateral retinofugal projection in the chick. *Brain Res*, *312*(1), 93-109.
- Okada, A., Charron, F., Morin, S., Shin, D. S., Wong, K., Fabre, P. J., et al. (2006). Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature*, *444*(7117), 369-373.
- Osterfield, M., Kirschner, M. W., & Flanagan, J. G. (2003). Graded positional information: interpretation for both fate and guidance. *Cell*, *113*(4), 425-428.
- Pak, W., Hindges, R., Lim, Y. S., Pfaff, S. L., & O'Leary, D. D. (2004). Magnitude of binocular vision controlled by islet-2 repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. *Cell*, *119*(4), 567-578.
- Parker, A. J. (2007). Binocular depth perception and the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, *8*(5), 379-391.

- Patel, M. (2011). *Exploring Rac GTPase regulation: The molecular mechanisms governing the DOCK180 and ELMO interaction and the role of this complex in Rac-mediated cell migration*. Université de Montréal, Montreal, QC.
- Pearse, R. V., 2nd, Collier, L. S., Scott, M. P., & Tabin, C. J. (1999). Vertebrate homologs of Drosophila suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators. *Dev Biol*, 212(2), 323-336.
- Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., et al. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem*, 273(22), 14037-14045.
- Petros, T. J., Bryson, J. B., & Mason, C. (2010). Ephrin-B2 elicits differential growth cone collapse and axon retraction in retinal ganglion cells from distinct retinal regions. *Dev Neurobiol*, 70(11), 781-794.
- Petros, T. J., Rebsam, A., & Mason, C. A. (2008). Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. *Annu Rev Neurosci*, 31, 295-315.
- Petros, T. J., Shrestha, B. R., & Mason, C. (2009). Specificity and sufficiency of EphB1 in driving the ipsilateral retinal projection. *J Neurosci*, 29(11), 3463-3474.
- Pham, A., Therond, P., Alves, G., Tournier, F. B., Busson, D., Lamour-Isnard, C., et al. (1995). The Suppressor of fused gene encodes a novel PEST protein involved in Drosophila segment polarity establishment. *Genetics*, 140(2), 587-598.
- Plump, A. S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C. J., Goodman, C. S., et al. (2002). Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron*, 33(2), 219-232.
- Porter, J. A., Ekker, S. C., Park, W. J., von Kessler, D. P., Young, K. E., Chen, C. H., et al. (1996). Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell*, 86(1), 21-34.
- Porter, J. A., Young, K. E., & Beachy, P. A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*, 274(5285), 255-259.
- Prakash, S., Dumoulin, S. O., Fischbein, N., Wandell, B. A., & Liao, Y. J. (2010). Congenital achiasma and see-saw nystagmus in VACTERL syndrome. *J Neuroophthalmol*, 30(1), 45-48.
- Ptito, M., Lepore, F., & Guillemot, J. P. (1991). Stereopsis in the cat: behavioral demonstration and underlying mechanisms. *Neuropsychologia*, 29(6), 443-464.
- Rachel, R. A., Dolen, G., Hayes, N. L., Lu, A., Erskine, L., Nowakowski, R. S., et al. (2002). Spatiotemporal features of early neuronogenesis differ in wild-type and albino mouse retina. *J Neurosci*, 22(11), 4249-4263.
- Ramon y Cajal, S. (1893). *La Cellule* (Vol. 4). Louvain: Université Catholique de Louvain.
- Randlett, O., Poggi, L., Zolessi, F. R., & Harris, W. A. (2011). The oriented emergence of axons from retinal ganglion cells is directed by laminin contact in vivo. *Neuron*, 70(2), 266-280.

- Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G. P., et al. (2004). Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ*, 82(11), 844-851.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., et al. (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell*, 76(4), 761-775.
- Rubin, L. L., & de Sauvage, F. J. (2006). Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5(12), 1026-1033.
- Ruiz de Almodovar, C., Fabre, P. J., Knevels, E., Coulon, C., Segura, I., Haddick, P. C., et al. (2011). VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1. *Neuron*, 70(5), 966-978.
- Sabatier, C., Plump, A. S., Le, M., Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., et al. (2004). The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell*, 117(2), 157-169.
- Sakai, J. A., & Halloran, M. C. (2006). Semaphorin 3d guides laterality of retinal ganglion cell projections in zebrafish. *Development*, 133(6), 1035-1044.
- Sanchez-Camacho, C., & Bovolenta, P. (2008). Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development*, 135(21), 3531-3541.
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., & Kondoh, H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*, 126(17), 3915-3924.
- Satz, J. S., Philp, A. R., Nguyen, H., Kusano, H., Lee, J., Turk, R., et al. (2009). Visual impairment in the absence of dystroglycan. *J Neurosci*, 29(42), 13136-13146.
- Schmidt, J. F., Agapova, O. A., Yang, P., Kaufman, P. L., & Hernandez, M. R. (2007). Expression of ephrinB1 and its receptor in glaucomatous optic neuropathy. *Br J Ophthalmol*, 91(9), 1219-1224.
- Schmitt, A. M., Shi, J., Wolf, A. M., Lu, C. C., King, L. A., & Zou, Y. (2006). Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature*, 439(7072), 31-37.
- Schneider, G. E. (1973). Early lesions of superior colliculus: factors affecting the formation of abnormal retinal projections. *Brain Behav Evol*, 8(1), 73-109.
- Serafini, T., Colamarino, S. A., Leonardo, E. D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W. C., et al. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell*, 87(6), 1001-1014.
- 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*, 78(3), 409-424.

- Smith, D. H. (2009). Stretch growth of integrated axon tracts: extremes and exploitations. *Prog Neurobiol*, 89(3), 231-239.
- Srour, M., Riviere, J. B., Pham, J. M., Dube, M. P., Girard, S., Morin, S., et al. (2010). Mutations in DCC cause congenital mirror movements. *Science*, 328(5978), 592.
- Steinman, S. B., Steinman, B. A., & Garzia, R. P. (2000). *Foundations of binocular vision: a clinical perspective*. New York: McGraw Hill.
- Steketee, M. B., & Tosney, K. W. (2002). Three functionally distinct adhesions in filopodia: shaft adhesions control lamellar extension. *J Neurosci*, 22(18), 8071-8083.
- Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., et al. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*, 384(6605), 129-134.
- Tenzen, T., Allen, B. L., Cole, F., Kang, J. S., Krauss, R. S., & McMahon, A. P. (2006). The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell*, 10(5), 647-656.
- Tessier-Lavigne, M., & Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science*, 274(5290), 1123-1133.
- Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A. G., Dodd, J., & Jessell, T. M. (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature*, 336(6201), 775-778.
- Thompson, H., Andrews, W., Parnavelas, J. G., & Erskine, L. (2009). Robo2 is required for Slit-mediated intraretinal axon guidance. *Dev Biol*, 335(2), 418-426.
- Thompson, H., Camand, O., Barker, D., & Erskine, L. (2006). Slit proteins regulate distinct aspects of retinal ganglion cell axon guidance within dorsal and ventral retina. *J Neurosci*, 26(31), 8082-8091.
- Timney, B., & Lansdown, G. (1989). Binocular depth perception, visual acuity and visual fields in cats following neonatal section of the optic chiasm. *Exp Brain Res*, 74(2), 272-278.
- Torres, M., Gomez-Pardo, E., & Gruss, P. (1996). Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development*, 122(11), 3381-3391.
- Trousse, F., Marti, E., Gruss, P., Torres, M., & Bovolenta, P. (2001). Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development*, 128(20), 3927-3936.
- Van Essen, D. C., Anderson, C. H., & Felleman, D. J. (1992). Information processing in the primate visual system: an integrated systems perspective. *Science*, 255(5043), 419-423.
- Vanni, M. P., Provost, J., Casanova, C., & Lesage, F. (2010). Bimodal modulation and continuous stimulation in optical imaging to map direction selectivity. *Neuroimage*, 49(2), 1416-1431.

- Verschuereen, K., & Huylebroeck, D. (1999). Remarkable versatility of Smad proteins in the nucleus of transforming growth factor-beta activated cells. *Cytokine Growth Factor Rev*, 10(3-4), 187-199.
- Wallace, V. A., & Raff, M. C. (1999). A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve. *Development*, 126(13), 2901-2909.
- Wang, L. C., Dani, J., Godement, P., Marcus, R. C., & Mason, C. A. (1995). Crossed and uncrossed retinal axons respond differently to cells of the optic chiasm midline in vitro. *Neuron*, 15(6), 1349-1364.
- Wang, L. C., Rachel, R. A., Marcus, R. C., & Mason, C. A. (1996). Chemosuppression of retinal axon growth by the mouse optic chiasm. *Neuron*, 17(5), 849-862.
- Wang, Y., Dakubo, G. D., Thurig, S., Mazerolle, C. J., & Wallace, V. A. (2005). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development*, 132(22), 5103-5113.
- Wechsler-Reya, R. J., & Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*, 22(1), 103-114.
- Wijgerde, M., McMahon, J. A., Rule, M., & McMahon, A. P. (2002). A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes Dev*, 16(22), 2849-2864.
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., et al. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938), 448-452.
- Williams, S. E., Grumet, M., Colman, D. R., Henkemeyer, M., Mason, C. A., & Sakurai, T. (2006). A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. *Neuron*, 50(4), 535-547.
- Williams, S. E., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D. J., et al. (2003). Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron*, 39(6), 919-935.
- Wilson, B. D., Ii, M., Park, K. W., Suli, A., Sorensen, L. K., Larrieu-Lahargue, F., et al. (2006). Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science*, 313(5787), 640-644.
- Wilson, C. W., & Chuang, P. T. (2010). Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction. *Development*, 137(13), 2079-2094.
- Wirtz, M. K., Samples, J. R., Kramer, P. L., Rust, K., Topinka, J. R., Yount, J., et al. (1997). Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q. *Am J Hum Genet*, 60(2), 296-304.
- Wolpert, L. (1996). One hundred years of positional information. *Trends Genet*, 12(9), 359-364.

- Yam, P. T., Langlois, S. D., Morin, S., & Charron, F. (2009). Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron*, *62*(3), 349-362.
- Yoshikawa, S., McKinnon, R. D., Kokel, M., & Thomas, J. B. (2003). Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor. *Nature*, *422*(6932), 583-588.
- Zecca, M., Basler, K., & Struhl, G. (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell*, *87*(5), 833-844.
- Zelina, P., Avci, H. X., Thelen, K., & Pollerberg, G. E. (2005). The cell adhesion molecule NrCAM is crucial for growth cone behaviour and pathfinding of retinal ganglion cell axons. *Development*, *132*(16), 3609-3618.
- Zhang, X. M., & Yang, X. J. (2001). Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development*, *128*(6), 943-957.

ANNEXE 1

Revue publiée dans médecine/sciences :

**Sonic hedgehog et Boc, une histoire de guidage axonale
très attirante**

Sonic hedgehog et Boc

Une histoire de guidage axonal très attirante

Pierre Fabre, Steves Morin, Frédéric Charron

Laboratoire de biologie moléculaire
du développement neuronal,
Institut de recherches cliniques de Montréal
(IRCM) et Faculté de médecine,
Université de Montréal,
110, avenue des Pins Ouest,
Montréal, Québec, H2W 1R7 Canada.



> Le système nerveux est composé d'environ 100 milliards de neurones qui doivent se brancher de façon appropriée afin de former les circuits neuronaux nécessaires à ses fonctions. Lors du développement du système nerveux, les axones neuronaux sont dirigés vers leurs cibles par des molécules de guidage axonal attractives et répulsives extrêmement bien conservées entre les espèces [1]. Dans la moelle épinière en développement, la protéine chimioattractive Nétrine-1 est sécrétée par la plaque basale et attire les axones des

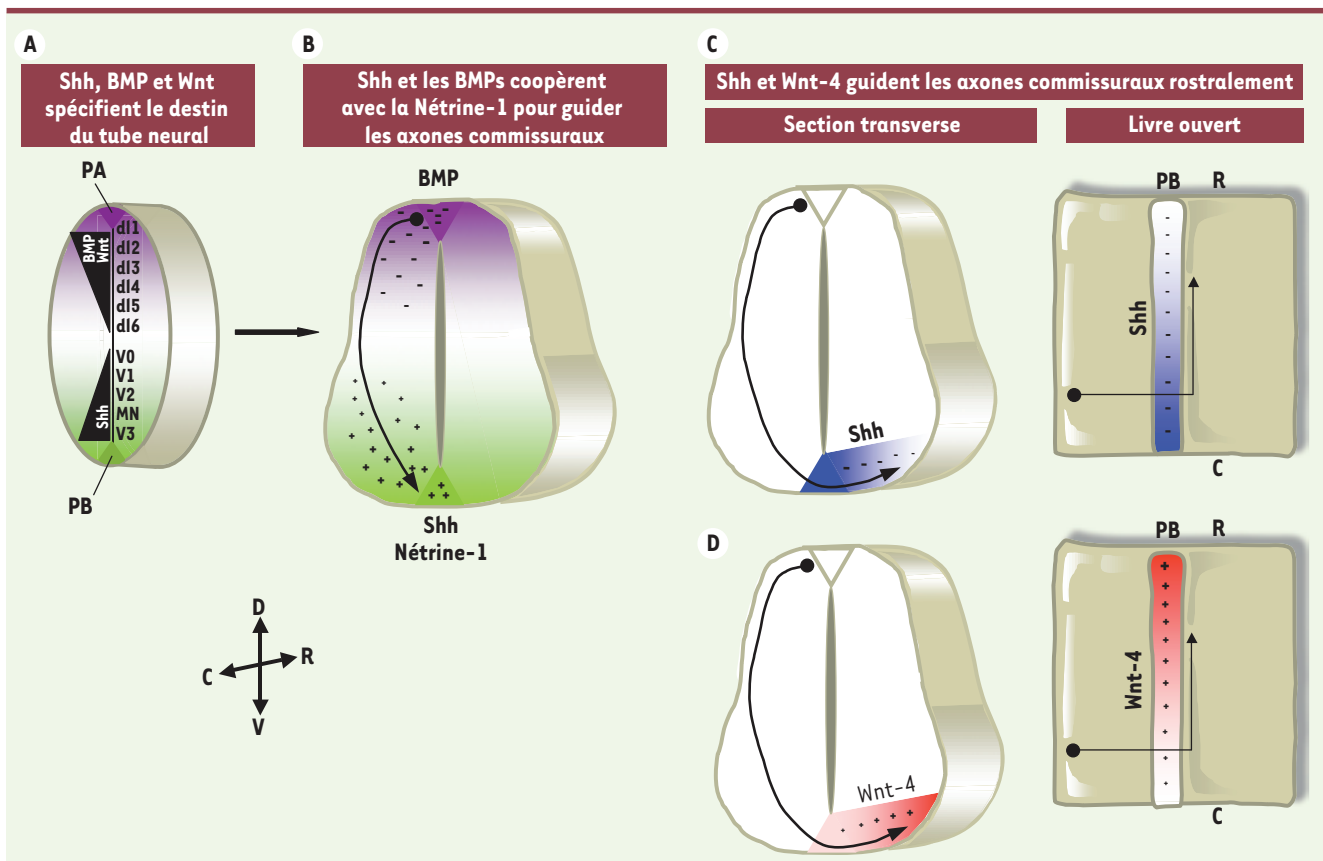


Figure 1. Détermination du destin neuronal et guidage des axones commissuraux par les morphogènes et la Nétrine-1. Trois groupes de morphogènes, Shh, BMP et les Wnt, qui servent de prime abord à induire la différenciation des progéniteurs neurax de la moelle épinière sont par la suite réutilisés comme molécules de guidage par les neurones commissuraux. **A.** Dans le tube neural primitif, les gradients de protéines Shh, BMP et Wnt déterminent le destin neuronal dans la moelle épinière ventrale et dorsale. **B.** Plus tard, les axones des neurones commissuraux différenciés sont repoussés de la ligne médiane dorsale par les BMP (violet) et attirés vers la ligne médiane ventrale par les chimioattractants Nétrine-1 et Shh (vert). **C, D.** Après le croisement de la plaque basale, les axones commissuraux sont attirés rostralement par un gradient de Wnt-4 (**D**, rouge) et repoussés caudalement par un gradient de Shh (**C**, bleu). **A, B,** et les panneaux de gauche en **C** et **D** sont des représentations de sections transverses de la moelle épinière en développement ; les panneaux de droite en **C** et **D** sont des représentations à livre ouvert. V0-3 : sous-populations d'interneurones ventraux ; dl1-6 : sous-populations d'interneurones dorsaux ; MN : motoneurones ; PA : plaque alaire ; PB : plaque basale ; D : dorsal ; V : ventral ; C : caudal ; R : rostral (adapté de [2]).

neurones commissuraux vers celle-ci (Figure 1) [2]. Bien que l'inactivation du gène de la Nétrine-1 chez la souris ait confirmé le rôle crucial de ce facteur pour le guidage des axones commissuraux, une partie d'entre eux parvient encore à rejoindre la ligne médiane dans ces souris, indiquant que d'autres facteurs de guidage doivent collaborer avec la Nétrine-1 pour guider ces axones [2]. Dans ce contexte, nous avons démontré que Sonic hedgehog (Shh), protéine sécrétée elle aussi par la plaque basale et bien connue pour son rôle morphogénique dans la spécification du destin des cellules du tube neural, agit également comme molécule chimioattractive pour les axones des neurones commissuraux de la moelle épinière [3]. Le modèle actuel suggère donc que la présence de ces deux facteurs, Shh et Nétrine-1, soit requise pour le guidage approprié des axones des neurones commissuraux.

Au cours des dernières années, le mécanisme moléculaire d'action de la Nétrine-1 a été relativement bien décrit [4], en revanche le mécanisme de Shh demeure quant à lui totalement obscur. Plus particulièrement, bien qu'il ait été démontré que l'effet de guidage de Shh requiert l'activité de Smoothed (Smo), une protéine de type récepteur à sept domaines transmembranaires, Shh n'interagit pas directement avec Smo et le récepteur utilisé par Shh pour son rôle de guidage des axones des neurones commissuraux est demeuré inconnu jusqu'à tout récemment.

Notre équipe, en collaboration avec celle du Dr Sue McConnell de l'Université Stanford et celle du Dr Marc Tessier-Lavigne de la firme Genentech, a démontré que la protéine Boc agit comme récepteur de Shh dans le guidage des neurones commissuraux [5]. Cdon (*Cell adhesion molecule-related/Downregulated by*

Oncogenes) et Boc (*Brother of Cdon*) sont des protéines transmembranaires homologues des membres de la famille Robo et DCC (*deleted in colorectal cancer*), deux familles de molécules bien connues pour leur rôle dans le guidage axonal de nombreux types neuronaux. De façon consistante avec un rôle de Boc et Cdon comme récepteurs de Shh, nous avons montré que Boc et Cdon interagissent directement avec Shh [5]. Des expériences d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont établi que Boc (mais non Cdon) est exprimé dans les neurones commissuraux. L'inactivation génique de Boc chez la souris entraîne des défauts de guidage axonal des neurones commissuraux en route vers la plaque basale, confirmant ainsi pour Boc un rôle dans ces neurones. *In vitro*, l'inhibition de l'expression de Boc par interférence à l'ARN (ARNi) compromet la capacité des axones commissuraux d'être attirés vers une source de Shh. Collectivement, ces résultats suggèrent que Boc joue un rôle essentiel comme récepteur de Shh dans le guidage des axones commissuraux.

Ces travaux sont tout particulièrement intéressants car l'identification de Boc en tant que nouveau récepteur de Shh requis pour son activité de guidage axonal ouvre la porte à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents au guidage par Shh. Toutefois, plusieurs questions demeurent en suspens. Parmi celles-ci, notons entre autres que jusqu'à ce jour, il était communément admis que tous les rôles de Shh découverts auparavant ont été démontrés comme agissant de façon transcriptionnelle. Cependant, l'activité de guidage de Shh se produit en 15 à 20 minutes, ce qui semble incompatible avec un effet transcriptionnel (bien que ce point doive encore être formellement démontré). Il est donc intéressant de se demander par quel mécanisme Shh exerce

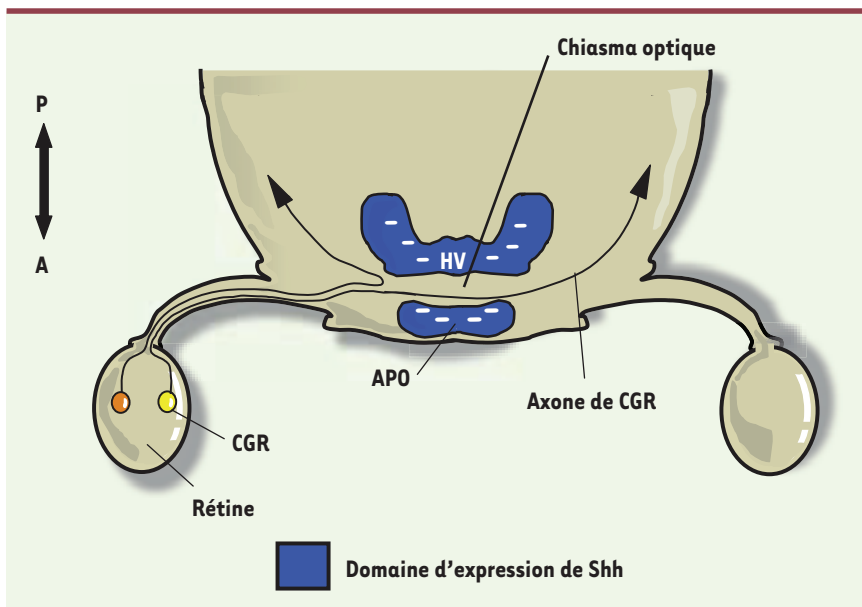


Figure 2. L'expression de Shh en bordure du chiasma optique définit une barrière au niveau de la ligne médiane ventrale qui sert au guidage des axones des CGR. Les axones des cellules ganglionnaires de rétine (CGR) en route vers la ligne médiane ventrale diencéphalique migrent soit contralatéralement soit ipsilatéralement en réponse aux molécules de guidage au niveau du chiasme. Pendant le développement, la diminution d'expression de Shh au chiasme permet la formation d'un canal pour les CGR et la décussation des fibres contralatérales. A : antérieur ; P : postérieur ; APO : aire pré-optique ; HV : hypothalamus ventral (adapté de [2]).



cet effet à court terme sur l'axone ? L'identification des gènes agissant en aval de Boc pourrait s'avérer une approche fructueuse pour répondre à cette question. Tel que discuté dans un article récemment publié dans *M/S* [4], il a été démontré que l'activité chimiotropique de la Nétrine-1, d'une part, fait intervenir les protéines de signalisation de la famille des Rho GTPases (guanine triphosphatases) et, d'autre part, induit une traduction locale de protéines, telle la β -actine, dans le cône de croissance [4]. Il est possible que ces deux mécanismes, qui ne sont pas nécessairement exclusifs, agissent également en aval de Shh et Boc.

Le guidage des axones des neurones commissuraux en route vers la ligne médiane n'est pas le seul rôle de guidage de Shh. Après avoir traversé la plaque basale, les axones commissuraux changent de direction et migrent vers la partie rostrale de la moelle épinière (Figure 1). Chez la souris, un gradient caudo-rostral de Wnt-4 agit comme facteur chimioattracteur pour les axones commissuraux ayant traversé la plaque basale [6], tandis que chez le poulet, un gradient rostro-caudal de Shh agit

comme facteur chimiorépulsif pour les axones commissuraux ayant traversé [7]. Bien qu'il n'ait pas été démontré que ce gradient rostro-caudal de Shh existe chez la souris, il sera intéressant de tester si Boc est requis pour le guidage des axones des neurones commissuraux selon l'axe rostro-caudal.

En plus de son rôle dans le guidage des neurones commissuraux, Shh guide les axones des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) [8, 9]. Toutefois, contrairement aux axones commissuraux, Shh induit la répulsion des axones des CGR (Figure 2). Le mécanisme moléculaire sous-jacent à cette distinction est inconnu. Bien que nos travaux établissent un rôle pour Boc dans le guidage axonal, il est envisageable que Cdon, protéine très similaire à Boc, exerce aussi un rôle dans le guidage d'autres axones du système nerveux. Il sera intéressant de déterminer si Boc et/ou Cdon sont exprimés dans les CGR et s'ils jouent un rôle dans ce phénomène.

À long terme, ces travaux pourraient non seulement contribuer à comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la formation des circuits neuronaux, mais encore à déceler de

nouvelles stratégies pour promouvoir le guidage et le re-branchement en circuits des axones endommagés par des maladies neurodégénératives et des traumatismes du cerveau et de la moelle épinière. ♦

Sonic hedgehog and Boc: a very attractive story

RÉFÉRENCES

1. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996; 274 : 1123-33.
2. Charron F, Tessier-Lavigne M. Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 2005; 132 : 2251-62.
3. Charron F, Stein E, Jeong J, et al. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 2003; 113 : 11-23.
4. Mehlen P, Rama N. Nétrine-1 et guidage axonal: Signalisation et traduction asymétrique. *Med Sci (Paris)* 2007; 23 : 311-5.
5. Okada A, Charron F, Morin S, et al. Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 2006; 444 : 369-73.
6. Lyuksytova AI, Lu CC, Milanesio N, et al. Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 2003; 302 : 1984-8.
7. Bourikas D, Pekarik V, Baeriswyl T, et al. Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat Neurosci* 2005; 8 : 297-304.
8. Trousse F, Marti E, Gruss P, et al. Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* 2001; 128 : 3927-36.
9. Kolpak A, Zhang J, Bao ZZ. Sonic Hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J Neurosci* 2005; 25 : 3432-41.



ISBN : 2-84254-105-7 248 pages

Bon de commande

À retourner à EDK, 2, rue Troyon - 92316 Sèvres Cedex
Tél. : 01 55 64 13 93 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Trisomie 21** : 15 € + 3 € de port = **18 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de **EDK**

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | |

ANNEXE 2

Article publié dans Neuron :

**VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction
through Its Receptor Flk1**

Contribution des auteurs

Premier auteur de cet article conjointement avec la Dre Ruiz de Almodovar, j'ai mis en évidence le rôle *in vitro* du VEGF en tant que molécule chimioattractrice pour les axones des neurones de moelle épinière. J'ai identifié *in vitro* le récepteur impliqué dans cet effet, ainsi que les médiateurs intracellulaires. J'ai participé à l'analyse des résultats de toutes les expériences et j'ai participé à la correction du manuscrit. C. Ruiz de Almodovar et les autres auteurs ont réalisé l'étude du rôle de VEGF et de son récepteur *in vivo* et leurs patrons d'expression. P. Carmeliet et F. Charron ont supervisé l'étude.

VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1

Carmen Ruiz de Almodovar,^{1,2,16} Pierre J. Fabre,^{3,16} Ellen Knevels,^{1,2} Cathy Coulon,^{1,2} Inmaculada Segura,^{1,2} Patrick C.G. Haddick,⁴ Liesbeth Aerts,^{1,2} Nicolas Delattin,^{1,2} Geraldine Strasser,⁴ Won-Jong Oh,⁵ Christian Lange,^{1,2} Stefan Vinckier,^{1,2} Jody Haigh,^{6,7} Coralie Fouquet,⁸ Chengua Gu,⁵ Kari Alitalo,^{9,10,11,12} Valerie Castellani,¹³ Marc Tessier-Lavigne,⁴ Alain Chedotal,¹⁴ Frederic Charron,^{3,15,*} and Peter Carmeliet^{1,2,*}

¹VIB

²KULeuven

Laboratory for Angiogenesis and the Neurovascular link, Vesalius Research Center (VRC), KULeuven, Leuven, Belgium

³Molecular Biology of Neural Development, Institut de Recherches Cliniques de Montreal (IRCM) and Department of Medicine, University of Montreal, Montreal QC H2W 1R7, Canada

⁴Genentech, South San Francisco, San Francisco, CA 94080, USA

⁵Department of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

⁶Vascular Cell Biology Unit, Department for Molecular Biomedical Research, VIB, Ghent, Belgium

⁷Department for Molecular Biomedical Research, UGent, Ghent, Belgium

⁸CNRS UMR7102, UPMC-Paris 6, 75005 Paris, France

⁹Molecular/Cancer Biology Program, Biomedicum Helsinki

¹⁰Department of Pathology, Haartman Institute

¹¹Institute for Molecular Medicine Finland

¹²Helsinki University Central Hospital

University of Helsinki, Helsinki FIN-00014, Finland

¹³University of Lyon 1, Claude Bernard Lyon 1, CGMC, UMR, CNRS, F-69000 Lyon, France

¹⁴Department of Development, INSERM, UMR_S968, Institut de la Vision, F-75012 Paris, France

¹⁵Department of Anatomy and Cell Biology, Department of Biology, Division of Experimental Medicine and Program in Neuroengineering, McGill University, Montreal QC H3A 2B2, Canada

¹⁶These authors contributed equally to this work

DOI 10.1016/j.neuron.2011.04.014

SUMMARY

Growing axons are guided to their targets by attractive and repulsive cues. In the developing spinal cord, Netrin-1 and Shh guide commissural axons toward the midline. However, the combined inhibition of their activity in commissural axon turning assays does not completely abrogate turning toward floor plate tissue, suggesting that additional guidance cues are present. Here we show that the prototypic angiogenic factor VEGF is secreted by the floor plate and is a chemoattractant for commissural axons in vitro and in vivo. Inactivation of *Vegf* in the floor plate or of its receptor *Flk1* in commissural neurons causes axon guidance defects, whereas *Flk1* blockade inhibits turning of axons to VEGF in vitro. Similar to Shh and Netrin-1, VEGF-mediated commissural axon guidance requires the activity of Src family kinases. Our results identify VEGF and *Flk1* as a novel ligand/receptor pair controlling commissural axon guidance.

INTRODUCTION

During developmental wiring of the nervous system, axons respond to attractive and repulsive guidance cues to navigate

to their targets. Surprisingly, only a small number of guidance cues have been identified so far, suggesting that additional chemoattractants and repellents remain to be discovered. A well-known model system to study axon guidance is the spinal cord ventral midline. During development, commissural neurons, located in the dorsal spinal cord, send axons that project toward and subsequently across the floor plate, a specialized structure at the ventral midline, which acts as an intermediate target and influences commissural axons by expressing attractive and repulsive cues (Dickson and Zou, 2010).

The first midline guidance cue identified, Netrin-1, has two distinct activities on precrossing commissural axons: it stimulates growth and attracts these axons toward the floor plate (reviewed in Charron and Tessier-Lavigne, 2005). Precrossing commissural axons are also guided by Sonic hedgehog (Shh), which chemoattracts commissural axons without stimulating their growth (Charron et al., 2003). Although Shh and Netrin-1 are required for normal guidance of commissural axons, intriguingly, when dorsal spinal cord explants are exposed to Netrin-1-deficient floor plates in the presence of Shh signaling inhibitors, some commissural axons are still attracted (Charron et al., 2003). This suggests that the floor plate secretes other chemoattractants than Netrin-1 and Shh. However, the molecular nature of these floor plate-derived attractant guidance cues remains unknown.

Increasing evidence indicates that vascular endothelial growth factor A (VEGF-A, termed VEGF from hereon), a prototypic

Neuron

VEGF Guides Commissural Axons to the Floor Plate

angiogenic factor, plays a key role in the nervous system (Ruiz de Almodovar et al., 2009). For instance, VEGF promotes proliferation, migration, differentiation and survival of neuroblasts (Jin et al., 2002; Wittko et al., 2009; Zhang et al., 2003), and induces axonal outgrowth of various neurons (Ruiz de Almodovar et al., 2009). By activating its signaling receptor Flk1, VEGF chemoattracts cerebellar granule cells (Ruiz de Almodovar et al., 2010). VEGF also regulates neuronal migration via binding to Neuropilin-1 (Npn1) (Schwarz et al., 2004). Initially discovered to bind some class 3 Semaphorins (Sema), Npn1 was later identified as a coreceptor of Flk1 (also termed VEGF receptor-2) that binds VEGF as well (Schwarz and Ruhrberg, 2010; Soker et al., 1998). Ligation of VEGF to Npn1 controls migration of somata of facial branchio-motor neurons, whereas interaction of Sema3A with a Npn1/PlexinA4 complex guides their axons (Schwarz et al., 2004, 2008). Flk1 also regulates axon outgrowth of neurons from the subiculum on binding of Sema3E to a Npn1/PlexinD1 complex that activates Flk1 in the absence of VEGF (Bellon et al., 2010). However, whether VEGF can function as an axonal chemoattractant remains unknown.

Here, we show that VEGF is expressed and secreted by the floor plate during commissural axon guidance, that mice lacking a single *Vegf* allele in the floor plate exhibit commissural axon guidance defects and that VEGF attracts commissural axons in vitro. We also show that the VEGF receptor Flk1 is expressed by commissural neurons and that its inhibition blocks the chemoattractant activity of VEGF in vitro. Moreover, genetic inactivation of *Flk1* in commissural neurons causes axonal guidance defects in vivo. Finally, we show that VEGF stimulates Src-family kinase (SFK) activity in commissural neurons and that SFK activity is required for VEGF-mediated chemoattraction. Taken together, our findings that VEGF acts via Flk1 as a floor plate chemoattractant for commissural axons identify a novel ligand/receptor pair controlling commissural axon guidance.

RESULTS

VEGF Is Expressed at the Floor Plate

Commissural axon chemoattractants, such as Netrin-1 and Shh, are expressed by the floor plate at the time when these axons project ventrally to the midline (Kennedy et al., 2006; Roelink et al., 1995). Netrin-1 is also expressed in the periventricular zone of the neural tube in a dorsoventral gradient (Kennedy et al., 2006; Serafini et al., 1996). Previous studies showed that VEGF is expressed at the floor plate and motor columns of the developing spinal cord at embryonic day (E)8.5–E10.5 (Hogan et al., 2004; James et al., 2009; Nagase et al., 2005), but expression at the floor plate at later stages when commissural axons cross the midline has not been analyzed. We first used in situ hybridization (ISH) to analyze VEGF mRNA expression in the spinal cord (Figures 1A and 1B). At E11.5, when commissural axons project ventrally to the midline, a VEGF signal was clearly detectable at the floor plate (Figure 1A). In addition, a weaker signal was also present in motor neurons and the ventral two thirds of the periventricular zone of the neural tube (Figure 1A).

To confirm the ISH data, we also used a VEGF-LacZ reporter line (*Vegf^{LacZ}*). In this strain, an IRES-LacZ reporter cassette has been knocked into the noncoding region of the last exon of the

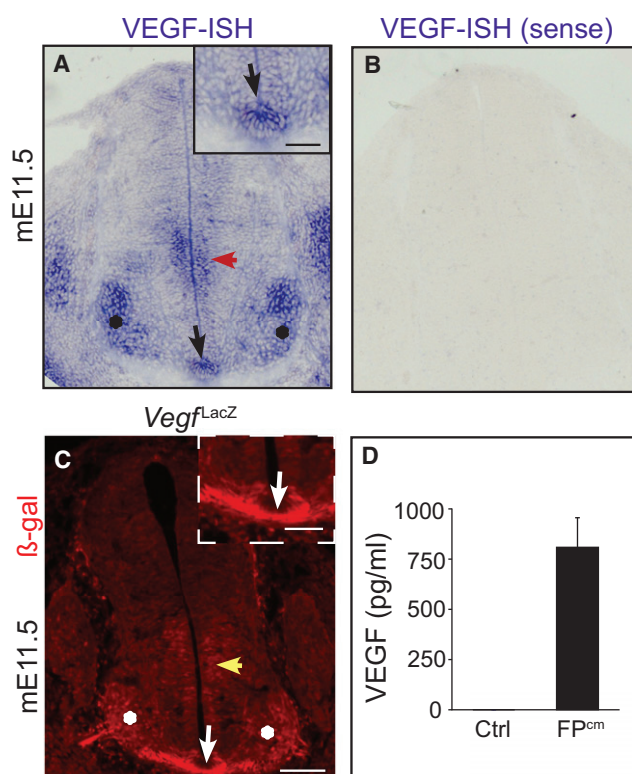


Figure 1. VEGF Is Expressed at the Floor Plate

(A) In situ hybridization of VEGF mRNA on a E11.5 mouse spinal cord transverse section showing expression of VEGF at the floor plate (black arrow; also shown at higher magnification in inset), in the ventral spinal cord (red arrow), and in the motor columns (asterisks).

(B) A sense probe, used as negative control, did not give any background signal.

(C) β -Gal immunostaining (red) of a E11.5 *Vegf^{LacZ}* mouse spinal cord transverse section at low and high (inset) magnification, revealing expression of β -Gal in the ventral spinal cord (yellow arrow), motor columns (asterisks), and floor plate (white arrow).

(D) Bar graphs showing VEGF protein levels (mean \pm standard error of the mean [SEM]), released in floor plate conditioned medium (FP^{cm}) from E11.5 WT mouse embryos, but not in control medium (Ctrl). Scale bars represent 100 μ m (A–C); 50 μ m (insets, A and C).

Vegf gene (Miquerol et al., 2000). Because this line expresses LacZ from the endogenous *Vegf* gene locus, the spatio-temporal expression pattern of the β -galactosidase (β -Gal) marker reliably mimics that of the endogenous *Vegf* mRNA (Miquerol et al., 1999; Ruiz de Almodovar et al., 2010; Storkebaum et al., 2010). In accordance with the ISH results, β -Gal immunostaining and enzymatic staining (X-gal) of spinal cord cross-sections from E11.5 *Vegf^{LacZ}* mouse embryos revealed a clear signal at the floor plate (Figure 1C; see Figure S1A available online) and a weaker signal in motor neurons and the ventral two-thirds of the periventricular zone of the neural tube (Figure 1C; Figure S1A).

To test whether VEGF was secreted, we microdissected floor plates from E11.5 mouse embryos, cultured them individually, and analyzed their conditioned medium by ELISA. These individual floor plate explant cultures released detectable levels of VEGF in the conditioned medium (Figure 1D). For comparison,

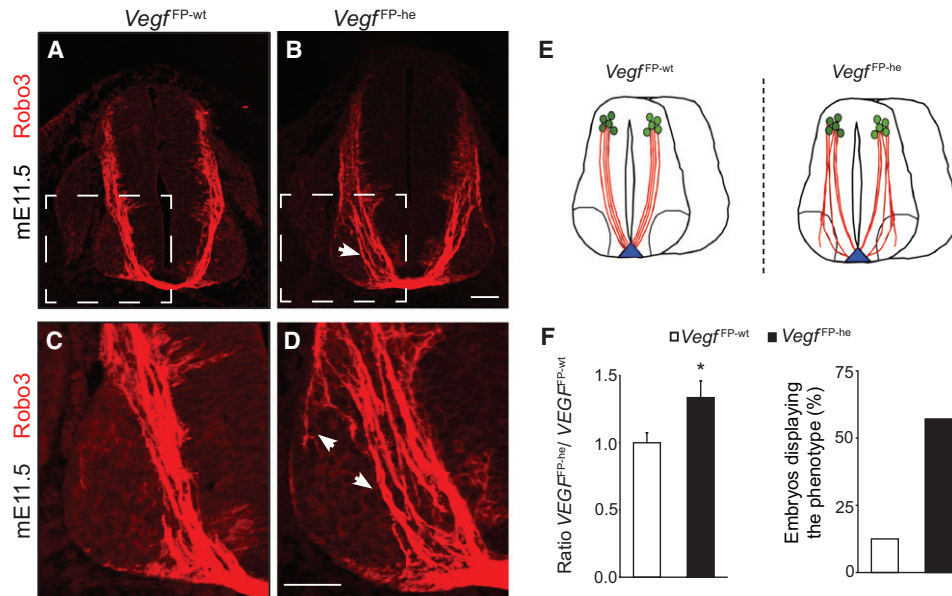


Figure 2. Inactivation of VEGF in the Floor Plate Causes Axon Guidance Defects In Vivo

(A–D) Robo3 immunostaining (red) in embryos with inactivation of one allele of *Vegf* in the floor plate (*Vegf^{FP-he}*; generated by crossing *Hoxa1-Cre* with *Vegf^{lox/lox}* mice) and in control embryos (*Vegf^{FP-wt}*). Compared to *Vegf^{FP-wt}* embryos (A) and (C), commissural axons in *Vegf^{FP-he}* embryos are defasciculated and some axons project near the lateral edge of the spinal cord (white arrows) (B) and (D). (C) and (D) are higher magnification of the insets in (A) and (B). (E) Scheme depicting the observed phenotypes. Left: normal commissural axons (red) project from the dorsal spinal cord to the floor plate (blue) in *Vegf^{FP-wt}* embryos. Right: in *Vegf^{FP-he}* embryos, axons project in a highly disorganized and defasciculated manner. (F) Left: histogram shows the quantification of the area occupied by commissural axons (% of total spinal cord area), normalized to the values obtained in *Vegf^{FP-wt}* embryos (mean ± SEM; see Experimental Procedures). **p* = 0.03, Student's *t* test; *n* = 8 *Vegf^{FP-wt}* and *n* = 7 *Vegf^{FP-he}*. Right: histogram showing the penetrance of the axon guidance phenotype (%); *n* = 8 *Vegf^{FP-wt}*; *n* = 7 *Vegf^{FP-he}*. Scale bars represent 100 μm (A and B); 20 μm (C and D).

released Shh levels in the same conditioned media were 22.7 ± 4.2 pg/ml (*n* = 7). RT-PCR analysis of freshly microdissected floor plates from E11.5 mice confirmed the production of mRNA transcripts (expressed as mRNA copies/ 10^5 mRNA copies β-actin (mean ± standard error of the mean [SEM]; *n* = 5) for VEGF (35 ± 1), Shh (81 ± 2), and Netrin-1 (358 ± 37). Thus, VEGF is produced and secreted by the floor plate during the developmental window when commissural axons are chemoattracted to the midline.

Floor Plate VEGF Is Required for Commissural Axon Guidance In Vivo

Heterozygous VEGF deficient (*Vegf^{+/-}*) mice die early during embryonic development ~E9.0–E9.5 due to severe vascular malformations and thus cannot be used for later analysis of commissural axon guidance at the midline (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Thus, in order to analyze the role of floor plate-derived VEGF in commissural axon guidance, we inactivated *Vegf* specifically in the floor plate by crossing the *Hoxa1-Cre* driver line with mice carrying a floxed *Vegf* allele (Gerber et al., 1999). In this line, the Cre recombinase is expressed in the floor plate of the spinal cord to about rhombomere level 5 in the hindbrain (C.F. and A.C., unpublished data) (Li and Lufkin, 2000). In accordance with previous findings that deficiency of a single VEGF allele can already cause phenotypic defects (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996), most of *Hoxa1-Cre⁺;Vegf^{lox/lox}* embryos were growth-retarded,

exhibited abnormal development, and did not survive till E11.5 (the precise reason of the lethality remains to be further determined). We therefore analyzed commissural axon navigation at E11.5 in *Hoxa1-Cre⁺;Vegf^{lox/wt}* (*Vegf^{FP-he}*) embryos, carrying one wild-type and one inactivated allele, and in their corresponding *Hoxa1-Cre⁻;Vegf^{lox/wt}* (*Vegf^{FP-wt}*) littermates. PCR analysis confirmed correct excision of the floxed *Vegf* allele in *Vegf^{FP-he}* embryos (data not shown).

We first confirmed that VEGF secretion was lower in floor plates from *Vegf^{FP-he}* than *Vegf^{FP-wt}* embryos. Measurements of VEGF protein levels secreted in the conditioned media by individual floor plates indeed revealed that VEGF secretion by *Vegf^{FP-he}* floor plates was reduced as compared to *Vegf^{FP-wt}* floor plates (pg/ml: 809 ± 147 for *Vegf^{FP-wt}* versus 344 ± 93 for *Vegf^{FP-he}*; *n* = 7–3; *p* = 0.02). When expressed relative to the protein levels of Shh in the conditioned media, the VEGF/Shh ratio was also lower in *Vegf^{FP-he}* than *Vegf^{FP-wt}* mice (37.7 ± 7.0 in *Vegf^{FP-wt}* versus 12.4 ± 4.3 in *Vegf^{FP-he}*; mean ± SEM, *n* = 7–3; *p* = 0.015).

Immunostaining of spinal cord cross-sections from *Vegf^{FP-he}* embryos for Robo3 to identify precrossing commissural axons revealed that these axons exhibited abnormal pathfinding, were defasciculated and projected to the lateral edge of the ventral spinal cord (Figures 2A–2E). Such aberrant commissural axon pathfinding was rarely observed in *Vegf^{FP-wt}* control embryos (Figures 2A and 2C). Quantitative analysis confirmed that the area occupied by Robo3⁺ axons was larger and that these

Neuron

VEGF Guides Commissural Axons to the Floor Plate

guidance defects were more frequent in *Vegf^{FP-he}* than *Vegf^{FP-wt}* embryos (Figure 2F). Thus, floor plate-derived VEGF is necessary for normal guidance of precrossing spinal commissural axons in vivo. The commissural axon guidance defects in *Vegf^{FP-he}* embryos were not secondary to altered expression of Netrin-1 or Shh, because ISH analysis at E11.5 showed that the pattern and level of expression of Netrin-1 and Shh were comparable in *Vegf^{FP-he}* and *Vegf^{FP-wt}* embryos (Figures S2A–S2D).

Commissural Neurons Express VEGF Receptor Flk1

Because VEGF signals via Flk1 to regulate cerebellar granule cell migration (Ruiz de Almodovar et al., 2010) and axon outgrowth (Ruiz de Almodovar et al., 2009), we assessed whether commissural neurons expressed this receptor. It is well established that neurons express Flk1 at much lower levels than endothelial cells, rendering in situ detection of Flk1 in neurons challenging (Ruiz de Almodovar et al., 2009, 2010; Storkebaum et al., 2005). Nonetheless, genetic and pharmacological loss- and gain-of-function studies established that Flk1 signals important biological processes in neurons (Bellon et al., 2010; Ruiz de Almodovar et al., 2009, 2010). In fact, it has been postulated that this differential expression of VEGF receptors allows VEGF to exert effects on neurons without inducing angiogenesis (Storkebaum et al., 2005; Zacchigna et al., 2008). To maximize detection of Flk1 expression in neurons, we used a panel of techniques.

We first determined the expression of Flk1 in precrossing commissural axons by taking advantage of anti-Flk1 antibodies (#SC6251 and #SC504) that detect Flk1 selectively in neurons but not in endothelial cells, presumably because of different posttranslational modifications of the receptor in these different cell types (Marko and Damon, 2008; Ruiz de Almodovar et al., 2010; Storkebaum et al., 2010). Spinal cord sections from E13 rat embryos (corresponding to E11.5 in mouse embryos) were double-immunostained for Flk1 and Robo3, using a sensitive detection method. This analysis confirmed the expression of low levels of Flk1 in Robo3⁺ precrossing commissural axons in vivo (Figures 3A–3L).

Finally, we microdissected dorsal spinal cord tissue from E13 rat embryos, as this tissue contains a highly enriched population of commissural neurons (Langlois et al., 2010; Yam et al., 2009). RT-PCR and ELISA confirmed that Flk1 was expressed at the mRNA (0.19 ± 0.05 copies Flk1 mRNA/ 10^3 copies β -actin, $n = 3$) and protein level (0.2 ng Flk1 per mg protein; measurement on a pool of three samples, each containing ~ 10 embryos). Moreover, we purified commissural neurons from E13 rat embryos and, after 16 hr in culture, double-immunostained them for Flk1 and either Robo3 or TAG-1 (another marker of precrossing commissural axons). This analysis confirmed that commissural neurons express Flk1 (Figures 3M–3R). Quantification revealed that the large majority (93%, $n = 138$) of commissural neurons coexpressed TAG-1 and Flk1. Taken together, these results indicate that precrossing commissural axons express low levels of Flk1, capable of binding VEGF.

VEGF Chemoattracts Commissural Axons In Vitro via Flk1

To assess whether VEGF can directly chemoattract commissural axons, we analyzed the response of commissural axons to

a gradient of VEGF using the Dunn chamber axon guidance assay (Yam et al., 2009). Purified commissural neurons isolated from E13 rat embryos, which express Flk1 (see above), were exposed to a control (buffer containing BSA) or a VEGF gradient. Commissural axons continued to grow without any deviation from their original trajectory when exposed to a control gradient (Figures 4A–4C and 4E), but actively turned toward the VEGF gradient (Figures 4A, 4B, 4D, and 4E; Movie S1). Even axons with growth cones oriented nearly in the opposite direction of the VEGF gradient were able to turn toward the VEGF gradient (Figures 4B and 4D). When measuring the turning response of these axons, a significant positive turning (attraction) was observed within 1.5 hr of VEGF gradient formation (Figure 4E), indicating that VEGF is a chemoattractant for commissural axons.

To assess which receptor mediated the chemoattractive effect of VEGF, we performed turning experiments in the presence of receptor-neutralizing antibodies. Consistent with Flk1 being the receptor mediating the guidance activity of VEGF on commissural axons, VEGF-mediated chemoattraction was completely abolished when Flk1 was blocked by a neutralizing anti-Flk1 monoclonal antibody (Figure 4E). Although Npn1 can modulate axonal growth and neuronal migration (Cheng et al., 2004; Schwarz et al., 2004), we and others failed to detect expression of Npn1 in commissural neurons (Figure S1B) (Chen et al., 1997). To exclude the possibility that very low levels of Npn1 (e.g., below the detection threshold) could contribute to the chemoattractive effect of VEGF, we also performed Npn1 antibody-blocking experiments. In contrast to inhibiting Flk1, blockage of Npn1 had no significant effect on the ability of VEGF to attract commissural axons in vitro (Figure 4E). Taken together, these results indicate that VEGF chemoattracts commissural axons through Flk1.

Flk1 Is Required for Commissural Axon Guidance In Vivo

To analyze whether Flk1 also functionally regulated commissural axon guidance in vivo, we inactivated *Flk1* specifically in commissural neurons by crossing *Flk1^{lox/LacZ}* mice with the Wnt1-Cre driver line, which induces Cre-mediated recombination in commissural neurons in the dorsal spinal cord (Charron et al., 2003). We and others previously described that intercrossing *Flk1^{lox/lox}* mice with various Cre-driver lines resulted only in incomplete inactivation of Flk1 (Maes et al., 2010; Ruiz de Almodovar et al., 2010). In order to increase the efficiency of Flk1 excision and to obtain complete absence of Flk1 in commissural neurons, we intercrossed Wnt1-Cre mice with *Flk1^{lox/LacZ}* mice that carry one floxed and one inactivated *Flk1* allele in which the *LacZ* expression cassette replaces the first exons of *Flk1* (Ema et al., 2006). PCR analysis confirmed that the floxed *Flk1* allele was correctly inactivated in the spinal cord from E11.5 Wnt1-Cre⁽⁺⁾; *Flk1^{lox/LacZ}* embryos (referred to as *Flk1^{CN-ko}* embryos) (data not shown).

Spinal cord sections from E11.5 *Flk1^{CN-ko}* embryos immunostained for Robo3 revealed that precrossing commissural axons exhibited abnormal pathfinding, projected to the lateral edge of the ventral spinal cord, invaded the motor columns and were defasciculated (Figures 5A–5G). Such aberrant axon pathfinding was only very rarely observed in control E11.5 Wnt1-Cre⁽⁻⁾; *Flk1^{lox/LacZ}* (*Flk1^{CN-wt}*) embryos, which still express

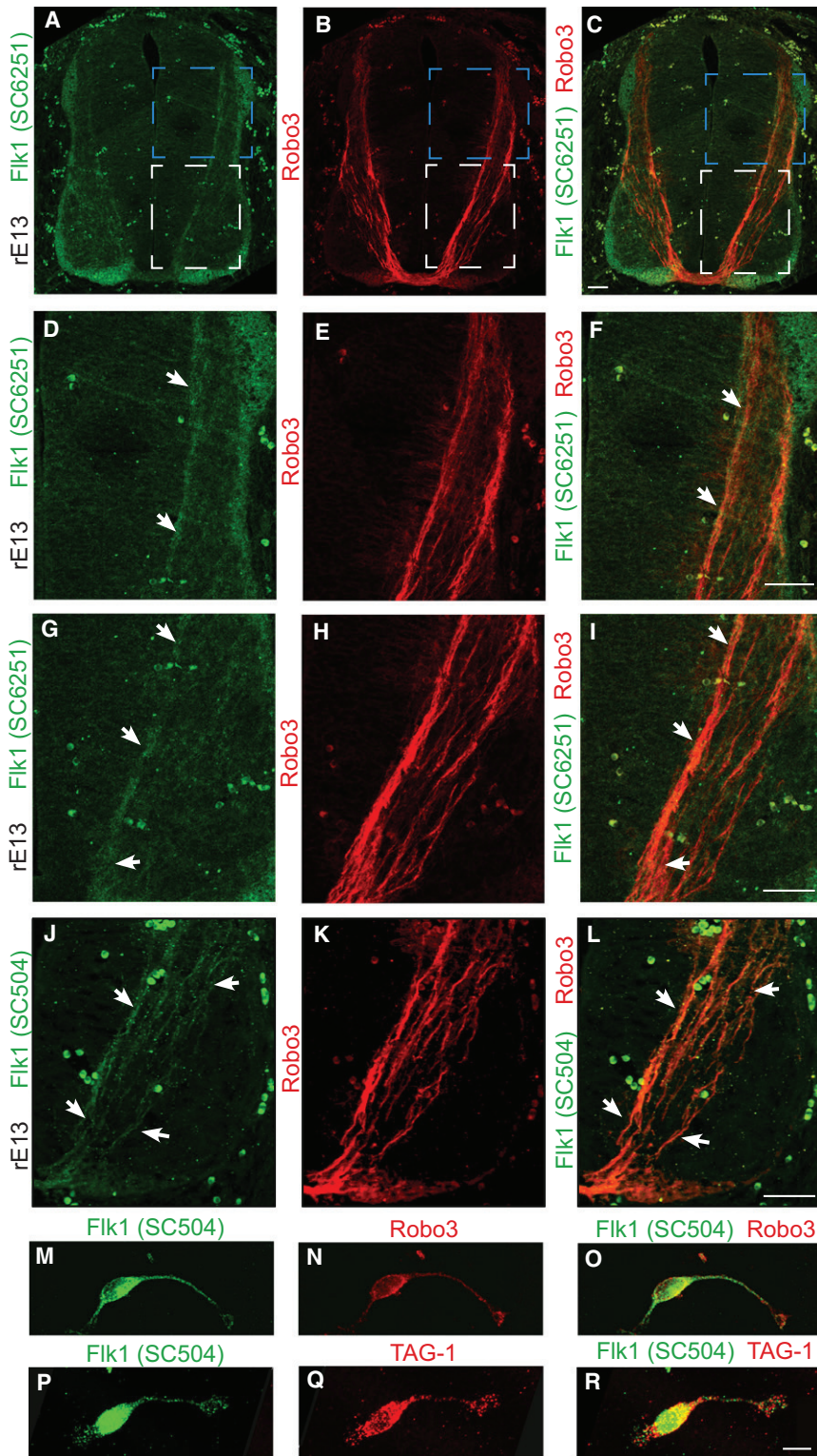


Figure 3. Flk1 Is Expressed in Commissural Neurons

(A–L) Double immunostaining for Flk1 (A, D, G, and J: green) and Robo3 (B, E, H, and K: red) in E13 rat embryo sections using two different anti-Flk1 antibodies known to label Flk1 in neurons (#SC6251 [A–I] and #SC504 [J–L]), showing Flk1 expression in pre- and postcrossing commissural axons; (C), (F), (I), and (L) show the merged images. (D)–(F) and (G)–(I) are higher magnification of the blue and white insets, respectively, shown in (A)–(C). The arrows (D, F, G, I, J, and L) point to Flk1⁺ commissural axons.

(M–R) Double immunostaining for Flk1 (green in M and P) and Robo3 (red in N) or TAG-1 (red in Q) in dissociated commissural neurons showing expression of Flk1 in the cell body, axon and growth cone of commissural neurons; (O) and (R): merged images. Scale bars represent 50 μ m (A–L); 10 μ m (M–R).

frequent in *Flk1*^{CN-ko} than *Flk1*^{CN-wt} embryos (Figure 5H). Similar to what we found in *Vegf*^{FP-he} mouse embryos, the pattern and level of expression of Netrin-1 and Shh were comparable between *Flk1*^{CN-ko} and their corresponding wild-type littermates (Figures S3A–S3D), indicating that Flk1 cell-autonomously controls guidance of precrossing commissural axons in vivo.

Other VEGF Homologs and Flk1-Ligands Are Redundant with VEGF-A

To assess how specific the role of VEGF and Flk1 in commissural axon guidance is, we analyzed the expression and role of additional VEGF homologs that can bind to murine Flk1 (VEGF-C) or indirectly activate Flk1 (Sema3E) (see Introduction). ISH revealed that VEGF-C was not expressed at the floor plate or ventral spinal cord at the time of commissural axon guidance (Figure S1C). In addition, VEGF-C did not induce turning of commissural axons in the Dunn chamber assay (Figure S4A). Consistent with these in vitro findings, homozygous VEGF-C deficiency did not cause commissural axon guidance defects in vivo (data not shown).

Through binding Npn1/PlexinD1, which forms a signaling complex with Flk1, Sema3E is capable of activating Flk1 independently of VEGF (Bellon et al.,

2010). Sema3E is expressed at the floor plate at the time of midline crossing (Figure S1D), but was found not to be required for pre- or postcrossing commissural axon outgrowth (Zou et al.,

2010). Sema3E is expressed at the floor plate at the time of midline crossing (Figure S1D), but was found not to be required for pre- or postcrossing commissural axon outgrowth (Zou et al.,

Neuron

VEGF Guides Commissural Axons to the Floor Plate

2000), but its possible role in guidance of precrossing commissural axons was never investigated. However, a Sema3E gradient failed to induce turning of commissural axons in the Dunn chamber turning assay (Figure S4A). Altogether, these results suggest that Flk1-dependent commissural axon guidance in vivo does not occur via Sema3E and that VEGF, but not VEGF-C, is the guidance cue responsible for this effect.

Src Family Kinase Activity Is Required for VEGF-Mediated Axon Guidance

Floor plate-derived guidance cues such as Netrin-1 and Shh induce local changes at the growth cone in a transcriptionally independent manner (Li et al., 2004; Yam et al., 2009). In particular, Src family kinases (SFKs) are expressed by commissural neurons and activated in their growth cones (Yam et al., 2009). Moreover, SFKs are known to participate in the guidance of axons by Netrin-1 and Shh (Li et al., 2004; Yam et al., 2009), whereas VEGF stimulates endothelial cell migration via SFK activation (Eliceiri et al., 2002; Olsson et al., 2006). Because of all these reasons, we explored whether SFKs also participated in VEGF-mediated axon guidance. Notably, VEGF stimulation of isolated commissural neurons elevated the levels of active SFKs, as measured by immunoblotting when using an antibody specifically recognizing the phosphorylated tyrosine residue Y418 in SFKs (Figure 6A). Moreover, immunostaining revealed that SFKs were activated in the growth cone (Figure 6B). Morphometric quantification revealed that VEGF, at concentrations that induced axon turning, increased the levels of phospho-SFKs in commissural neuron growth cones (Figure 6B).

We next tested whether activation of SFKs is required for VEGF-mediated axon guidance. We therefore exposed commissural neurons in the Dunn chamber to a gradient of VEGF in the presence of PP2 (a widely used SFK inhibitor) or its inactive analog (PP3). Analysis of growth cone turning revealed that neurons in the presence of PP3 turned normally in response to VEGF (Figures 6C, 6D, and 6F). However, when neurons were exposed to a VEGF gradient in the presence of PP2, axons did no longer turn toward the VEGF gradient (Figures 6C, 6E, and 6F). Altogether, these results indicate that VEGF activates SFKs in commissural neurons and that SFK activity is required for VEGF-mediated commissural axon guidance.

DISCUSSION

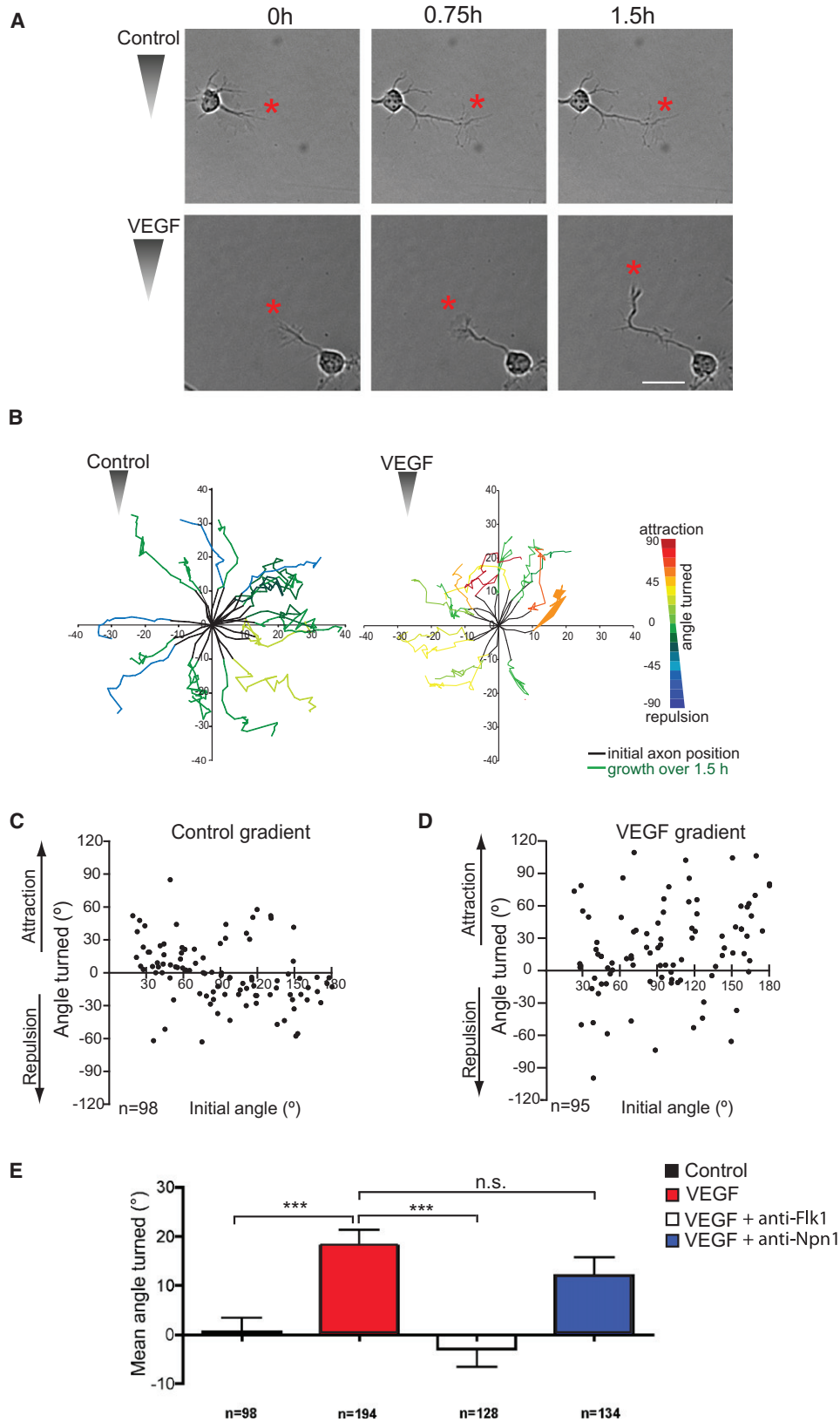
In order to reach the floor plate, commissural axons need to grow and navigate from the dorsal to the ventral spinal cord. Whereas Netrin-1 seems to account for the majority of the growth-promoting activity of the floor plate (Serafini et al., 1996), chemoattraction of precrossing commissural axons to the floor plate is controlled by both Netrin-1 and Shh (Charron et al., 2003). In the present study, we identified VEGF as an additional commissural axon chemoattractant at the floor plate.

Our findings indicate that the prototypic endothelial growth factor VEGF is an axonal chemoattractant. VEGF is expressed at the floor plate and ventral spinal cord at the time when commissural axons navigate to the midline, reminiscent of the spatio-temporal expression pattern of Netrin-1 and Shh, i.e., other guidance cues for commissural axons (Dickson and Zou,

2010). VEGF is not only detectable at the mRNA level, but is also released by floor plate cells into the extracellular milieu. Similarly to Shh (Yam et al., 2009), VEGF induces commissural axon turning in the Dunn chamber. Furthermore, loss-of-function of *Vegf* at the floor plate induced commissural axon guidance defects, indicating that it has a nonredundant activity as a guidance cue. Its importance in this process is further supported by findings that inactivation of only a single *Vegf* allele already sufficed to cause navigation defects. VEGF is well known to have gene dosage-dependent effects and haplo-insufficient phenotypes in vascular development have been documented (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Moreover, even reductions of VEGF levels by less than 50% suffice to impair neuronal survival or migration (Oosthuysen et al., 2001; Ruiz de Almodovar et al., 2010).

This guidance effect of VEGF on commissural axons is mediated by Flk1. Indeed, Flk1 is expressed by purified commissural neurons in vitro and detectable at low levels by various complementary methods in precrossing commissural axons in the developing spinal cord in vivo. Furthermore, a neutralizing anti-Flk1 antibody completely blocked the VEGF-mediated chemoattraction of commissural axons in the Dunn chamber. Moreover, inactivation of *Flk1* in commissural neurons using the Wnt1-Cre driver line showed that Flk1 is essential for commissural axon guidance in vivo. When *Flk1* was inactivated, commissural axon trajectories were defective. Many axons failed to turn appropriately toward the ventral midline as they entered the ventral spinal cord, and instead projected aberrantly and invaded the motor columns. Because the Wnt1-Cre driver does not induce recombination in the ventral spinal cord (Charron et al., 2003), these results suggest a cell-autonomous requirement for Flk1 signaling in commissural axon guidance in vivo. Overall, the observed phenotype was similar to the one observed in floor plate-specific heterozygous VEGF deficient mice. Based on the expression of VEGF at the floor plate and on the ability of VEGF to attract commissural axons in a Flk1-dependent manner in vitro, we propose that, in vivo, commissural axons lacking *Flk1* exhibit pathfinding errors and deviate from their normal trajectory because of a failure to detect the floor plate chemoattractant VEGF. Of interest, *Flk1*-mutant commissural axons also exhibit a defasciculated phenotype in the ventral spinal cord. Whether fasciculation of commissural axons is an additional Flk1-dependent effect distinct from its effect in mediating axon turning needs further investigation.

Interestingly, floor plate-specific *Vegf* haplo-deficient and commissural neuron-specific *Flk1* null embryos display a phenotype that is similar to that of embryos lacking the Shh receptor *Boc* or of embryos with conditional inactivation of the Shh signaling component *Smoothed* (*Smo*) in commissural neurons (Charron et al., 2003; Okada et al., 2006). Indeed, in these mutant embryos, precrossing commissural axons were able to reach the midline, but occupied a larger area in the ventral spinal cord and invaded the motor columns, thus showing primarily a guidance defect and not an axonal growth defect. Also, the magnitude of the in vitro turning effect of VEGF is comparable to that of Shh (Yam et al., 2009). Loss-of-function of VEGF did not, however, alter the expression pattern and levels of Netrin-1 or Shh, further supporting the concept that Flk1



transmits the VEGF guidance cue signals directly to commissural axons. SFKs are key players in the regulation of growth cone dynamics and cytoskeleton rearrangement (Liu et al., 2007; Robles et al., 2005) and graded SFK activity in the growth cone is known to mediate axon turning, with growth cones turning toward the side of higher SFK activity (Robles et al., 2005; Yam et al., 2009). Interestingly, similar as two other floor plate-derived guidance cues, i.e., Netrin-1 and Shh (Liu et al., 2004, 2007; Meriane et al., 2004; Yam et al., 2009), VEGF also chemoattracts commissural axons via activation of SFKs in their growth cones. This may suggest a model whereby distinct molecular guidance cues utilize the same intracellular signaling machinery (e.g., SFKs) to generate an integrated navigation response to the midline.

Similar to Shh, VEGF was unable to induce outgrowth of E13 rat dorsal spinal cord explants (Figure S5B–S5E) and, if anything, slightly reduced axonal extension of purified commissural neurons in the Dunn chamber assay (Figure S5F). The lack of a growth-promoting effect of VEGF on precrossing commissural axons differs from its ability to promote axonal outgrowth of superior cervical and dorsal root ganglia, cortical neurons and retinal ganglion cells (Böcker-Meffert et al., 2002; Jin et al., 2002; Rosestein et al., 2003; Sondell and Kanje, 2001; Sondell et al., 1999) and suggests cell-type specific contextual activities for VEGF.

Previous studies documented that VEGF can affect wiring of the brain in a context-dependent pattern via effects on Npn1 (Schwarz et al., 2004). In accordance with previous findings that failed to detect Npn1 in commissural neurons (Chen et al., 1997), a neutralizing Npn1 blocking antibody was ineffective in blocking the VEGF induced commissural axons turning in the Dunn chamber assay. Moreover, we could not find any evidence that VEGF-C, another ligand of Flk1 (Lohela et al., 2009) or Semaphorin 3E, another ligand of Npn1 that indirectly activates Flk1 signaling in other types of neurons (Bellon et al., 2010), control commissural axon navigation. VEGF-D, another ligand of Flk1 in humans but not in mice (Baldwin et al., 2001), is not expressed in the ventral spinal cord (Avantaggiato et al., 1998). Thus, VEGF chemoattracts commissural axons through Flk1, with a negligible or redundant role for other Flk1 ligands (VEGF-C) or activators (Semaphorin 3E), or VEGF receptors (Npn1).

Curiously, motor columns express *Vegf* mRNA, yet neither vessels nor commissural axons invade these structures (James et al., 2009). It is possible that motor neurons make the *Vegf* message (mRNA), but do not secrete the protein from their cell body, and target it to their axonal compartment (as is thought to occur for *Slit2*; M.T.-L. and A. Jaworski, unpublished data). Another alternative explanation is that additional signals prevent

blood vessels and commissural axons from entering the motor columns.

VEGF was originally discovered as a key angiogenic factor. Only subsequent studies revealed that this factor can affect neurons directly, independently of its angiogenic activity (Rosestein et al., 2010; Ruiz de Almodovar et al., 2009, 2010; Tam and Watts, 2010). In the developing spinal cord, VEGF orchestrates the formation of the neurovascular plexus and subsequent vessel sprouting from this plexus into the avascular neural tube (James et al., 2009). Interestingly, however, even though vascularization of the neural tube occurs at the same time as commissural axon midline crossing, our conditional *Flk1* inactivation studies in commissural neurons and in vitro turning assays establish that VEGF chemoattracts these axons independently of any VEGF-related vascular activity. To the best of our knowledge, this is the first report documenting an angiogenesis-independent effect of VEGF on axon guidance.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

The *VEGF^{LacZ}* mouse line was kindly provided by A. Nagy and was previously described (Miquerol et al., 1999). VEGF-C knockout mice were previously described (Karkkainen et al., 2004), and the *VEGF^{lox/lox}* mouse line was kindly provided by D. Anderson and previously described (Gerber et al., 1999). The transgenic Wnt1-Cre mouse line was kindly provided by A. McMahon. The transgenic Hoxa1-Cre mouse line was generated by A. Chedotal using a previously described cDNA (Li and Lufkin, 2000). The *Flk1^{lox/LacZ}* mouse line was generated by crossing *Flk1^{lox/lox}* mice (Haigh et al., 2003) with *Flk1^{LacZ/+}* mice (Maes et al., 2010). For each transgenic line, WT littermate embryos were used. Wistar or Sprague Dawley rat embryos (E13) were used for explant outgrowth assays, purification of commissural neurons and for immuno-histochemistry. All animals were treated according to the guidelines approved by the Animal Care Committees of the K.U.Leuven (Belgium) and of the IRCM (Canada).

Commissural Neuron Culture

Commissural neurons were prepared from the dorsal fifth of E13 rat neural tubes as described (Langlois et al., 2010; Yam et al., 2009). Purified commissural neurons were plated on poly-Lysine coated coverslips (for immunostaining) or square 3D coverslips (for Dunn chamber assay) at low density in neurobasal medium supplemented with 10% FBS and 2 mM L-Glutamine (Invitrogen). After 20 hr, the medium was replaced with Neurobasal medium, supplemented with 2% B27 (Invitrogen) and 2 mM L-Glutamine. Commissural neurons were then used for the Dunn chamber axon guidance assay (40 hr after plating) or fixed for immunostaining (30 hr after plating).

Histology and Immunohistochemistry

Mouse and rat embryos were dissected and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4°C (mouse embryos) or 2 hr at room temperature (rat embryos). Transverse serial cryosections of dissected embryos were cut at

Figure 4. VEGF Induces Commissural Axon Turning in a Flk1-Dependent Manner

(A) Representative images of commissural neurons subjected to a control gradient (BSA, top) or a VEGF gradient (25 ng/ml, bottom) showing no change of direction in commissural axons exposed to the control gradient (red asterisks in top), but a significant turning toward increasing concentrations of VEGF in neurons exposed to a VEGF gradient (red asterisks in bottom) over the course of 1.5 hr. Increasing gradient concentrations (from bottom to top) are represented by a wedge. Scale bar represents 20 μ m.

(B) Trajectory plots of a sample of 20 axons in control (left) or 16 axons in 25 ng/ml VEGF (right) gradient. All trajectories have been rotated so that the gradient increases along the y axis. The initial axon position is shown in black and the axon growth over 1.5 hr is colored according to the angle turned (scale is shown on the right).

(C and D) Scatter plots of the angle turned versus initial angle for commissural axons in a control (C) or a VEGF gradient (25 ng/ml in the outer well) (D).

(E) Histogram representing the mean angle turned (\pm SEM) for initial angles $>20^\circ$ in response to a control gradient (black bar), a VEGF gradient (25 ng/ml; red bar), a VEGF gradient (25 ng/ml) in the presence of anti-Flk1 (100 ng/ml) (white bar), or a VEGF gradient (25 ng/ml) in the presence of anti-Npn1 (10 μ g/ml) (blue bar) (one way ANOVA with Bonferroni posttest, *** $p < 0.001$; ns: not significant).

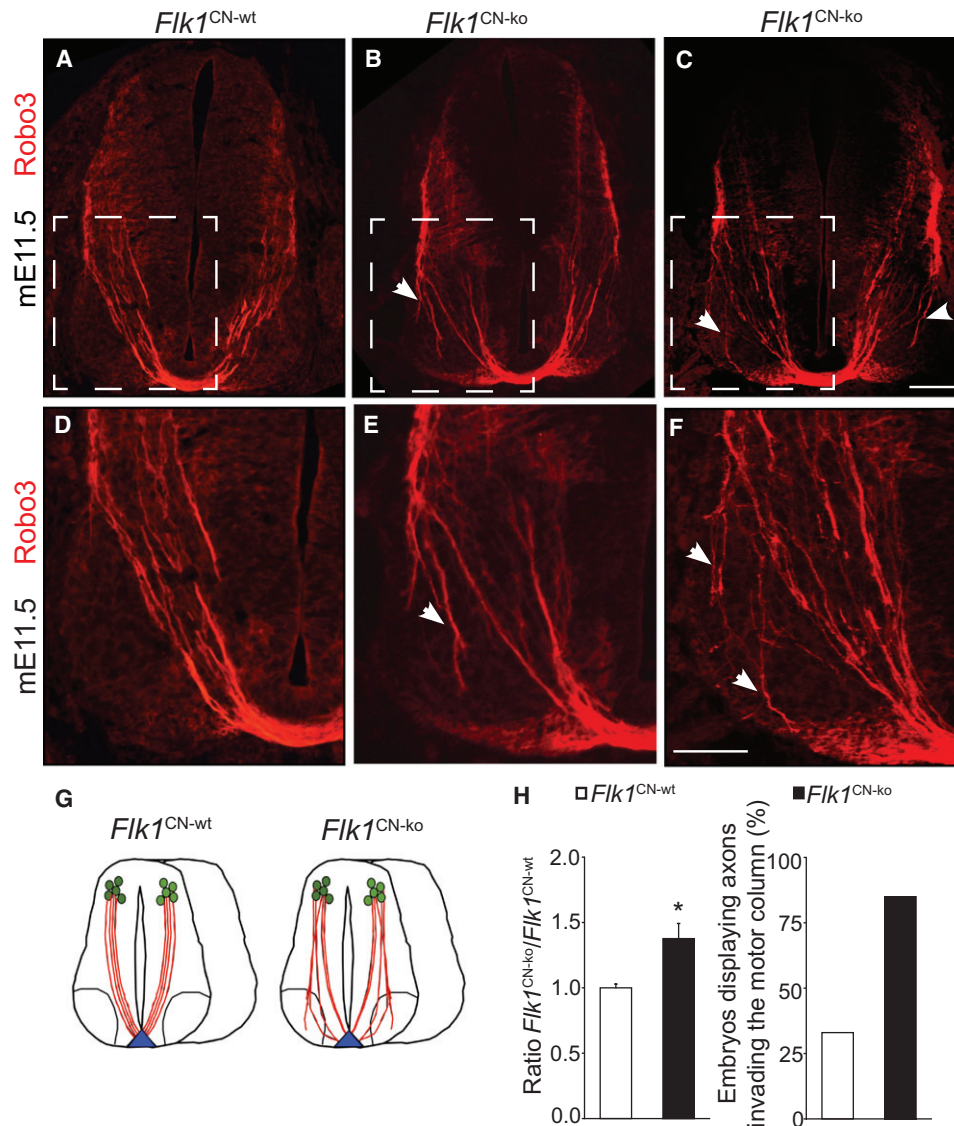


Figure 5. Inactivation of Flk1 Causes Commissural Axon Guidance Defects In Vivo

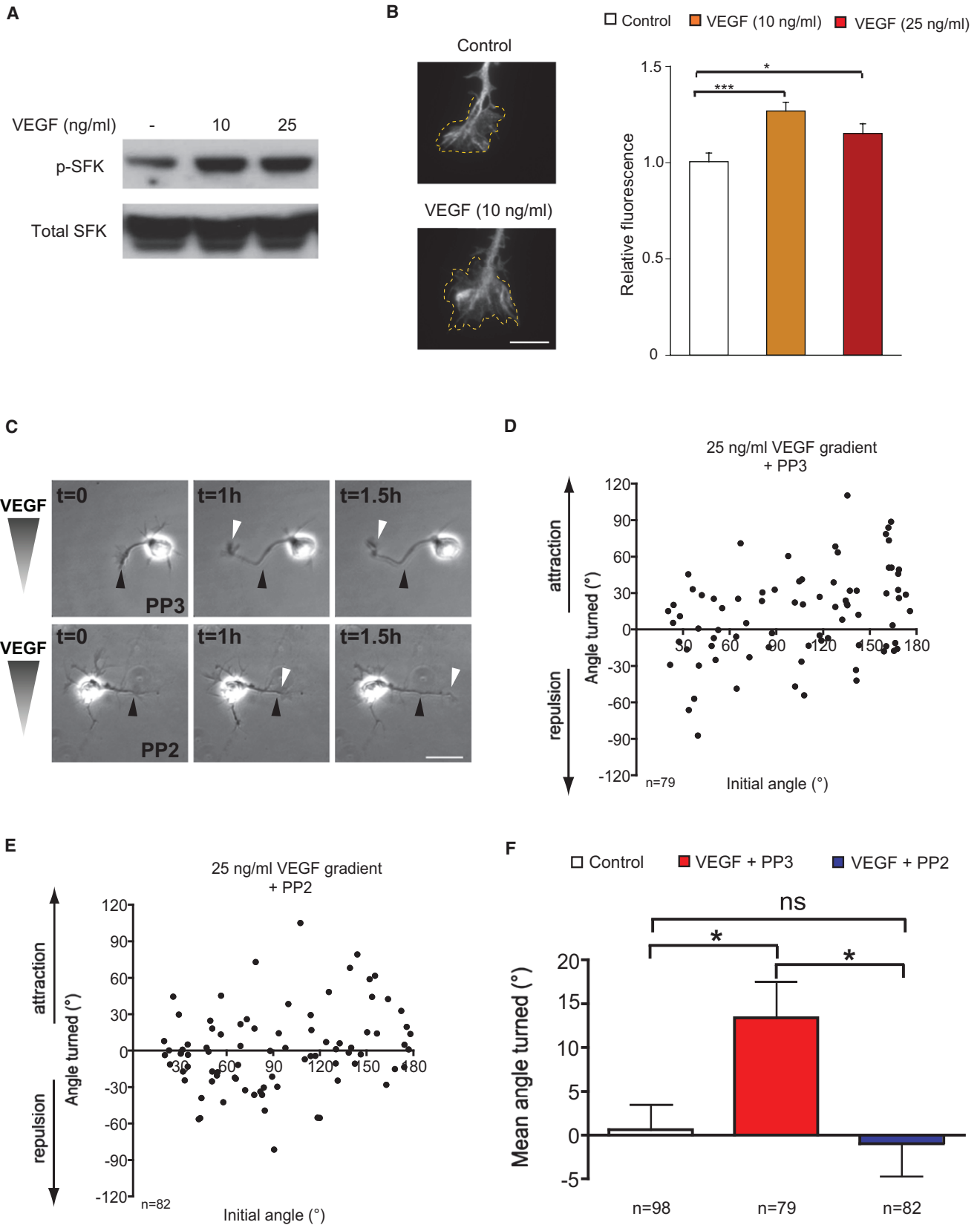
(A–F) Robo3 immunostaining (red) in embryos with selective inactivation of *Flk1* in the dorsal spinal cord (*Flk1^{CN-ko}*; generated by crossing *Wnt-1-Cre* with *Flk1^{lox/LacZ}* mice) and in control embryos (*Flk1^{CN-wt}*). Compared to *Flk1^{CN-wt}* embryos (A and D), commissural axons in *Flk1^{CN-ko}* embryos are defasciculated and some axons project near the lateral edge of the spinal cord and invade the motor columns (white arrows) (B, C, E, and F). (D–F) Higher magnification of the insets in (A–C). (B) and (E) and (C) and (F) are representative images from two different mutant embryos.

(G) Scheme depicting the observed phenotype. Left: normal commissural axons (red) project from the dorsal spinal cord to the floor plate (blue) in *Flk1^{CN-wt}* embryos. Right: in *Flk1^{CN-ko}* embryos, axons project in a highly disorganized and defasciculated manner and invade the motor columns.

(H) Left: histogram shows the quantification of the area occupied by commissural axons (% of the total spinal cord area, mean ± SEM). **p* = 0.03, Student's *t* test; *n* = 5 *Flk1^{CN-wt}*; *n* = 8 *Flk1^{CN-ko}*. Right: histogram showing the penetrance of the phenotype (%); *n* = 13 *Flk1^{CN-wt}*; *n* = 12 *Flk1^{CN-ko}*. Differences in the penetrance of the phenotype between *Flk1^{CN-wt}* and *Vegf^{FP-wt}* might be due to their different genetic background. Scale bars represent 10 μm (A–C); 20 μm (D–F).

10–20 μm thickness. Purified commissural neurons were fixed in 4% PFA for 15 min on ice before processed for immunostaining. Dorsal spinal cord explants were fixed in 4% PFA overnight at 4°C. For immunohistochemistry, the following antibodies were used: anti-β-galactosidase (Cappel-55976), anti-CD31 (PharMingen-557355), anti-TAG-1 (clone 4D7, Developmental studies Hybridoma bank, DSHB), anti-Flk1 (Santa-Cruz, SC-6251 and SC-504), and anti-Robo3 (R&D systems, AF3076). Sections were subsequently incubated with fluorescently conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Alexa-488 or -546) for anti-TAG-1 and anti-Robo3, or with peroxidase-labeled

IgGs (Dako), followed by amplification with tyramide-signal-amplification-system (Cy3-PerkinElmer-LifeSciences or FT-PerkinElmer-Life Sciences) for anti-GFP, anti-Flk1 (SC504) and anti-β-galactosidase. For immunostaining with anti-Flk1 (SC-6251), sections were subsequently incubated with peroxidase-labeled IgGs followed by amplification with Envision+System-HRP Labeled Polymer Anti-Mouse (Dako, K4000). Immunostainings were examined using Imager Z1 and Axioplan 2, and Axiovert 200M. Zeiss microscopes equipped with epifluorescence illumination or confocal system (Zeiss multiphoton CLSM510 Meta NLO, 0.5–1.0 μm optical sections).



In Situ Hybridization

VEGF, Netrin-1, Shh, VEGF-C, Semaphorin 3E, Npn1, sense, and antisense riboprobes were DIG labeled by *in vitro* transcription (Roche) of cDNA encoding for their respective sequences. In situ hybridization in embryo cryosections was carried out as described in Marillat et al. (2002).

β -Gal Enzymatic Staining

E11.5 VEGF^{LacZ} embryos were fixed for 30 min in 0.2% glutaraldehyde in PBS buffered containing 2 mM MgCl₂ and 5 mM EGTA. After rinse, samples were embedded in 5% agarose and 100 μ m vibratome floating sections were made. β -gal enzymatic activity was revealed with a developing solution containing 1 mg/ml X-gal (Invitrogen), 5 mM K₄[Fe(CN)₆], and 5 mM K₃[Fe(CN)₆].

Dunn Chamber Axon Guidance Assay and Analysis

Dunn chamber axon guidance assay was performed and analyzed as described (Yam et al., 2009). After Dunn chamber assembly and addition of VEGF, Semaphorin 3E, or VEGF-C (all at 25 ng/ml) to the outer well, time-lapse phase contrast images were acquired for 1.5 hr. Neutralizing anti-Flk1 (DC101) and anti-Npn1 (R&D systems, #AF566) antibodies were used at 100 ng/ml and 10 μ g/ml, respectively. PP2 and PP3 (Calbiochem) were applied to the bath at a concentration of 800 nM. The angle turned was defined as the angle between the original direction of the axon and a straight line connecting the base of the growth cone from the first to the last time point of the assay period.

SFK and Phospho-SFK Immunostaining and Immunoblotting

Commissural neurons were cultured for 24 hr *in vitro* and subsequently stimulated with VEGF (10 or 25 ng/ml, R&D systems, #493-MV) for 30 min. For immunostaining, neurons were fixed in 4% PFA/4% sucrose (complemented with proteinase and phosphatase inhibitors [Roche]) for 15 min at room temperature. Immunostaining for P-SFK was performed using a Rabbit (polyclonal) anti-Src (pY418) phosphorylation site specific antibody (Invitrogen, #44660G) followed by an Alexa-488 conjugated secondary antibody. For immunoblotting, neurons were lysed in RIPA buffer complemented with proteinase and phosphatase inhibitors (Roche). An anti-Phospho-Src Family antibody (Cell Signaling, #2101) was used to probe the western blots. Subsequently blots were stripped and reprobed with an anti-Src (36D10) antibody (Cell Signaling, #2109).

Quantification of Phospho-SFK Fluorescence at Growth Cones

The average of the phospho-SFK fluorescence signal was measured for each growth cone using Image J and normalized to the average fluorescence signal in control growth cones. At least 50 growth cones were analyzed in two independent experiments (performed in triplicates) and statistical differences were assessed by unpaired t test versus control conditions.

Quantification of VEGF, Flk1, and Shh protein levels by ELISA

Floor plates (FPs) isolated from E11.5 mouse embryos were cultured in three dimensional rat tail collagen in B27-supplemented Neurobasal medium.

Conditioned medium from FPs (explants from a single FP were cultured in 300 μ l) or control medium were collected after 48 hr and processed for further measurements of VEGF and Shh protein concentration using the commercial Quantikine human VEGF ELISA kit (R&D Systems) and Shh ELISA kit (Abcam, ab100639), respectively. Flk1 protein expression was determined in lysates of E13 rat dorsal spinal cord tissue using the commercial mouse Flk1 ELISA kit (R&D Systems, Quantikine MVR200B).

Quantitative Real-Time RT-PCR

Expression levels were quantified by real-time RT-PCR, relative to the expression level of β -actin, using the following forward (F) and reverse primers (R) and probes (P), labeled with fluorescent dye (FAM) and quencher (TAMRA). β -actin: F, 5'-AGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3'; R, 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'; P, 5'-FAMCACTGCCGATCCTCTTCTCCCTAMRA-3'; Flk1: F, 5'-ACTGCAGTGATTGCCATGTTCT-3'; R, 5'-TCATTGGCCCGCTTAACG-3'; P, 5'-FAMTGGCTCCTTCTTGTCTTGTCTACGGATAMRA-3'; Vegf: F, 5'-AGTCCCATGAAGTGATCAAGTTCA-3'; R, 5'-ATCCGCATGATCTGCATGG-3'; P, 5'-FAMTGGCCACGTGAGAGCAACATCACTAMRA-3'. Reference numbers for primer sequences for mShh and mNetrin-1 are Mm00436528_m1 and Mm00500896_m1, respectively (Applied Biosystems).

Quantification of the Area Occupied by Commissural Axons

The percentage of the area occupied by precrossing commissural axons to the total spinal cord area was quantified based on a previously described method (Charron et al., 2003). Briefly, precrossing commissural axon area and total spinal cord area were measured on E11.5 embryo cross-sections by quantifying the area encompassed by Robo-3⁺ axons and the edges of the spinal cord, respectively. Measurements were performed using the NIH Image J software. Values were normalized to values obtained for the control group for each litter.

Collagen Outgrowth Assays

E13 rat dorsal spinal cord explants were dissected and embedded in three-dimensional collagen matrices as described (Charron et al., 2003) and cultured in F12:DMEM (1:1), 10% heat-inactivated horse serum, 40 mM glucose, 2 mM glutamax, 100 μ g/ml streptomycin sulfate, and 100 U/ml penicillin for 16 hr. Where indicated, Netrin-1 (50 or 100 ng/ml) or VEGF (10, 50, or 100 ng/ml) were added to the medium.

Quantification of Commissural Axon Outgrowth in Explants

Commissural axons were detected by TAG-1 immunostaining and the total length of axon bundles per explant (for outgrowth) was quantified as described previously (Charron et al., 2003).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes four figures and one movie and can be found with this article online at doi:10.1016/j.neuron.2011.04.014.

Figure 6. VEGF-Induced Growth Cone Turning Requires SFK Activation

(A) Immunoblot for anti-phospho-SFK (Y418) (top) and total SFK (bottom) of dissociated rat commissural neurons incubated with 0, 10, or 25 ng/ml of VEGF for 30 min.

(B) Dissociated rat commissural neurons were incubated with vehicle (control) (top) or 10 ng/ml of VEGF (bottom) for 30 min, and then fixed and immunostained with anti-phospho-SFK (Y418). Dotted lines delineate growth cones. VEGF stimulation leads to an increase in phospho-SFKs in the growth cone. Graph: mean relative levels (\pm SEM) of phospho-SFK fluorescence in control and VEGF-stimulated (10 or 25 ng/ml) growth cones. The average phospho-SFK fluorescence signal was measured for each growth cone and normalized to the mean signal in control-stimulated growth cones. n = 129 for control, n = 167 for VEGF (10 ng/ml) and n = 107 for VEGF (25 ng/ml), were measured in two independent experiments. ***p < 0.0001; *p < 0.05 (unpaired t test).

(C) Axons of dissociated commissural neurons in a 25 ng/ml VEGF gradient in a Dunn chamber, in the presence of bath-applied PP2 (0.8 μ M) or PP3 (0.8 μ M). Inhibition of SFK activity by PP2 inhibits VEGF-mediated turning. PP3 did not inhibit the ability of axons to turn up a VEGF gradient. Black arrowhead points to the initial position of the growth cone; white arrowhead points to its final position.

(D–F) Scatter plot of the angle turned versus initial angle (D and E) and mean angle turned (F) (\pm SEM) for initial angles >20°, show that SFK inhibition by PP2 (E and F), but not by PP3 (D and F), inhibits commissural axon turning toward VEGF (p < 0.05; p = 0.73, respectively, in unpaired t test). Axon turning up a VEGF gradient is not perturbed by PP3 and was significantly different from the control or the PP2 condition (p < 0.05, initial angle >20°); one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison post-test, *p < 0.05; ns: not significant. Scale bars represent 10 μ m (B); 20 μ m (C).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Schmucker and L. Moons for helpful advice and discussions, A. McMahon (Harvard University) for providing the Wnt1-Cre mouse line to A.C., A. Nagy for providing the VEGF^{LacZ} mice, D. Anderson for providing the VEGF^{lox/lox} mice, and C. Henderson for providing the Sema3E probe for ISH. The authors also thank N. Dai, M. De Mol, A. Manderveld, B. Vanwetswinkel, K. Peeters, L. Goddé, A. Bouché, P. Vanwesemael, J. Van Dijck, S. Morin, and P.T. Yam for assistance. This study was supported by “Long-term structural Methusalem funding by the Flemish Government,” the Fund for Scientific Research-Flemish Government (FWO) (G.0319.07, G.0677.09, G.02010.07, G.0676.09, 1.5.210.10.N.00 [Krediet aan navorsers]), Concerted Research Activities K.U. Leuven (GOA/2006/11), and the Belgian Science Policy (IUAP-P6/20 and IUAP-P6/30), the Association Française contre les myopathies (AFM), Geneeskundige stichting Koningin Elisabeth, and MND/A grant 70/130. C.R.A. is postdoctoral fellow of the FWO (1.2.545.09.N.00, V.4.332.10.N.01). C.C. is a fellow of the Flemish Institute for the promotion of scientific research (IWT), Belgium. I.S. is a postdoctoral fellow of the European Union Seventh framework program. C.L. is supported by an EMBO long-term postdoctoral fellowship. A.C. is supported by grants from the “Fondation pour la recherche médicale” (programme Equipe FRM) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-MNPS-030-01). F.C. is a Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) Scientist. Work performed in the Charron laboratory was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

Accepted: April 15, 2011

Published: June 8, 2011

REFERENCES

- Avantaggiato, V., Orlandini, M., Acampora, D., Oliviero, S., and Simeone, A. (1998). Embryonic expression pattern of the murine *figf* gene, a growth factor belonging to platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Mech. Dev.* 73, 221–224.
- Baldwin, M.E., Catimel, B., Nice, E.C., Roufail, S., Hall, N.E., Stenvers, K.L., Karkkainen, M.J., Alitalo, K., Stacker, S.A., and Achen, M.G. (2001). The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-d is different in mouse and man. *J. Biol. Chem.* 276, 19166–19171.
- Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Chauvet, S., and Mann, F. (2010). VEGFR2 (KDR/Fik1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron* 66, 205–219.
- Böcker-Meffert, S., Rosenstiel, P., Röhl, C., Warneke, N., Held-Feindt, J., Sievers, J., and Lucius, R. (2002). Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2021–2026.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439.
- Charron, F., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 132, 2251–2262.
- Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A.P., and Tessier-Lavigne, M. (2003). The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113, 11–23.
- Chen, H., Chédotal, A., He, Z., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19, 547–559.
- Cheng, L., Jia, H., Löhr, M., Bagherzadeh, A., Holmes, D.I., Selwood, D., and Zachary, I. (2004). Anti-chemorepulsive effects of vascular endothelial growth factor and placental growth factor-2 in dorsal root ganglion neurons are mediated via neuropilin-1 and cyclooxygenase-derived prostanoid production. *J. Biol. Chem.* 279, 30654–30661.
- Dickson, B.J., and Zou, Y. (2010). Navigating intermediate targets: the nervous system midline. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2, a002055.
- Eliceiri, B.P., Puente, X.S., Hood, J.D., Stupack, D.G., Schlaepfer, D.D., Huang, X.Z., Sheppard, D., and Cheresh, D.A. (2002). Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin $\alpha(v)\beta5$ in vascular endothelial growth factor signaling. *J. Cell Biol.* 157, 149–160.
- Ema, M., Takahashi, S., and Rossant, J. (2006). Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted *Fik1-lacZ* allele reveals *Fik1* expression in multipotent mesodermal progenitors. *Blood* 107, 111–117.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O’Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439–442.
- Gerber, H.P., Hillan, K.J., Ryan, A.M., Kowalski, J., Keller, G.A., Rangell, L., Wright, B.D., Radtke, F., Aguet, M., and Ferrara, N. (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126, 1149–1159.
- Haigh, J.J., Morelli, P.I., Gerhardt, H., Haigh, K., Tsien, J., Damert, A., Miquelot, L., Muhlner, U., Klein, R., Ferrara, N., et al. (2003). Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev. Biol.* 262, 225–241.
- Hogan, K.A., Ambler, C.A., Chapman, D.L., and Bautch, V.L. (2004). The neural tube patterns developmentally using the VEGF signaling pathway. *Development* 131, 1503–1513.
- James, J.M., Gewolb, C., and Bautch, V.L. (2009). Neurovascular development uses VEGF-A signaling to regulate blood vessel ingression into the neural tube. *Development* 136, 833–841.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11946–11950.
- Karkkainen, M.J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T.V., Jeltsch, M., Jackson, D.G., Talikka, M., Rauvala, H., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* 5, 74–80.
- Kennedy, T.E., Wang, H., Marshall, W., and Tessier-Lavigne, M. (2006). Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord. *J. Neurosci.* 26, 8866–8874.
- Langlois, S.D., Morin, S., Yam, P.T., and Charron, F. (2010). Dissection and culture of commissural neurons from embryonic spinal cord. *J. Vis. Exp.* (39) 10.3791/1773.
- Li, X., and Lufkin, T. (2000). Cre recombinase expression in the floorplate, notochord and gut epithelium in transgenic embryos driven by the *Hoxa-1* enhancer III. *Genesis* 26, 121–122.
- Li, W., Lee, J., Vikis, H.G., Lee, S.H., Liu, G., Aurandt, J., Shen, T.L., Fearon, E.R., Guan, J.L., Han, M., et al. (2004). Activation of FAK and Src are receptor-proximal events required for netrin signaling. *Nat. Neurosci.* 7, 1213–1221.
- Liu, G., Beggs, H., Jürgensen, C., Park, H.T., Tang, H., Gorski, J., Jones, K.R., Reichardt, L.F., Wu, J., and Rao, Y. (2004). Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. *Nat. Neurosci.* 7, 1222–1232.
- Liu, G., Li, W., Gao, X., Li, X., Jürgensen, C., Park, H.T., Shin, N.Y., Yu, J., He, M.L., Hanks, S.K., et al. (2007). p130CAS is required for netrin signaling and commissural axon guidance. *J. Neurosci.* 27, 957–968.
- Lohela, M., Bry, M., Tammela, T., and Alitalo, K. (2009). VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 154–165.
- Maes, C., Goossens, S., Bartunkova, S., Drogat, B., Coenegrachts, L., Stockmans, I., Moermans, K., Nyabi, O., Haigh, K., Naessens, M., et al. (2010). Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. *EMBO J.* 29, 424–441.
- Marillat, V., Cases, O., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., and Chédotal, A. (2002). Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 442, 130–155.

- Marko, S.B., and Damon, D.H. (2008). VEGF promotes vascular sympathetic innervation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *294*, H2646–H2652.
- Meriane, M., Tcherkezian, J., Webber, C.A., Danek, E.I., Triki, I., McFarlane, S., Bloch-Gallego, E., and Lamarche-Vane, N. (2004). Phosphorylation of DCC by Fyn mediates Netrin-1 signaling in growth cone guidance. *J. Cell Biol.* *167*, 687–698.
- Miquerol, L., Gertsenstein, M., Harpal, K., Rossant, J., and Nagy, A. (1999). Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele. *Dev. Biol.* *212*, 307–322.
- Miquerol, L., Langille, B.L., and Nagy, A. (2000). Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* *127*, 3941–3946.
- Nagase, T., Nagase, M., Yoshimura, K., Fujita, T., and Koshima, I. (2005). Angiogenesis within the developing mouse neural tube is dependent on sonic hedgehog signaling: possible roles of motor neurons. *Genes Cells* *10*, 595–604.
- Okada, A., Charron, F., Morin, S., Shin, D.S., Wong, K., Fabre, P.J., Tessier-Lavigne, M., and McConnell, S.K. (2006). Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* *444*, 369–373.
- Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling—in control of vascular function. *Nat. Rev.* *7*, 359–371.
- Oosthuysse, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., et al. (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* *28*, 131–138.
- Robles, E., Woo, S., and Gomez, T.M. (2005). Src-dependent tyrosine phosphorylation at the tips of growth cone filopodia promotes extension. *J. Neurosci.* *25*, 7669–7681.
- Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A., and Jessell, T.M. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* *81*, 445–455.
- Rosenstein, J.M., Krum, J.M., and Ruhrberg, C. (2010). VEGF in the nervous system. *Organogenesis* *6*, 107–114.
- Rosenstein, J.M., Mani, N., Khaibullina, A., and Krum, J.M. (2003). Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons. *J. Neurosci.* *23*, 11036–11044.
- Ruiz de Almodovar, C., Coulon, C., Salin, P.A., Knevels, E., Chounlamountri, N., Poesen, K., Hermans, K., Lambrechts, D., Van Geyte, K., Dhondt, J., et al. (2010). Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *J. Neurosci.* *30*, 15052–15066.
- Ruiz de Almodovar, C., Lambrechts, D., Mazzone, M., and Carmeliet, P. (2009). Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol. Rev.* *89*, 607–648.
- Schwarz, Q., Gu, C., Fujisawa, H., Sabelko, K., Gertsenstein, M., Nagy, A., Taniguchi, M., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., Shima, D.T., and Ruhrberg, C. (2004). Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes Dev.* *18*, 2822–2834.
- Schwarz, Q., and Ruhrberg, C. (2010). Neuropilin, you gotta let me know: should I stay or should I go? *Cell Adh. Migr.* *4*, 61–66.
- Schwarz, Q., Waimey, K.E., Golding, M., Takamatsu, H., Kumanogoh, A., Fujisawa, H., Cheng, H.J., and Ruhrberg, C. (2008). Plexin A3 and plexin A4 convey semaphorin signals during facial nerve development. *Dev. Biol.* *324*, 1–9.
- Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* *87*, 1001–1014.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* *92*, 735–745.
- Sondell, M., and Kanje, M. (2001). Postnatal expression of VEGF and its receptor flk-1 in peripheral ganglia. *Neuroreport* *12*, 105–108.
- Sondell, M., Lundborg, G., and Kanje, M. (1999). Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* *19*, 5731–5740.
- Storkebaum, E., Lambrechts, D., Dewerchin, M., Moreno-Murciano, M.P., Appelmans, S., Oh, H., Van Damme, P., Rutten, B., Man, W.Y., De Mol, M., et al. (2005). Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat. Neurosci.* *8*, 85–92.
- Storkebaum, E., Ruiz de Almodovar, C., Meens, M., Zacchigna, S., Mazzone, M., Vanhoutte, G., Vinckier, S., Miskiewicz, K., Poesen, K., Lambrechts, D., et al. (2010). Impaired autonomic regulation of resistance arteries in mice with low vascular endothelial growth factor or upon vascular endothelial growth factor trap delivery. *Circulation* *122*, 273–281.
- Tam, S.J., and Watts, R.J. (2010). Connecting vascular and nervous system development: angiogenesis and the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* *33*, 379–408.
- Wittko, I.M., Schänzer, A., Kuzmichev, A., Schneider, F.T., Shibuya, M., Raab, S., and Plate, K.H. (2009). VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J. Neurosci.* *29*, 8704–8714.
- Yam, P.T., Langlois, S.D., Morin, S., and Charron, F. (2009). Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* *62*, 349–362.
- Zacchigna, S., Ruiz de Almodovar, C., and Carmeliet, P. (2008). Similarities between angiogenesis and neural development: what small animal models can tell us. *Curr. Top. Dev. Biol.* *80*, 1–55.
- Zhang, H., Vutskits, L., Pepper, M.S., and Kiss, J.Z. (2003). VEGF is a chemo-attractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J. Cell Biol.* *163*, 1375–1384.
- Zou, Y., Stoeckli, E., Chen, H., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell* *102*, 363–375.

ANNEXE 3

Revue publiée dans médecine/sciences :

**VEGF, un facteur responsable de la formation des
vaisseaux sanguins au service de la connectique
neuronale**

types d'anomalies de *TET2* observées dans les lymphomes T sont semblables à ceux qui sont observés dans les hémopathies myéloïdes. De plus, chez certains patients, les mutations observées dans les cellules lymphomateuses ont également été identifiées dans des cellules hématopoïétiques immatures, exprimant l'antigène CD34 et capables de se différencier vers les lignées myéloïdes. Ces données indiquent que les anomalies de *TET2* peuvent survenir dans une cellule à potentialité lymphoïde et myéloïde, voire une cellule souche hématopoïétique, et entraîner le développement aussi bien d'hémopathies myéloïdes que lymphoïdes.

Le gène *TET2* est donc bien un gène de type suppresseur de tumeur. Des variations, même faibles, de l'activité ou de l'expression de *TET2* confèrent aux cellules hématopoïétiques un avantage compétitif vis-à-vis des cellules sauvages. Elles provoquent des anomalies de l'hématopoïèse mais n'entraînent pas directement la transformation cellulaire. Le développement d'hémopathies malignes myéloïdes ou lymphoïdes résulterait plutôt de la

survenue d'autres mutations. Ces deux types de pathologies pourraient donc se développer à partir d'une même atteinte du compartiment des cellules souches hématopoïétiques. ♦

In cauda venenum or the importance of TET(2)

REMERCIEMENTS

Le travail effectué dans les équipes des auteurs a été financé par l'Inserm, l'Institut national du cancer (INCa), la Ligue nationale contre le cancer (LNCC), l'Association pour la recherche contre le cancer (ARC), la Fondation Gustave Roussy.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009 ; 324 : 930-5.
2. Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 2011 ; 477 : 606-10.
3. Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, et al. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell* 2011 ; 9 : 166-75.

4. Nabel CS, Kohli RM. Molecular biology. Demystifying DNA demethylation. *Science* 2011 ; 333 : 1229-30.
5. Guo JU, Su Y, Zhong C, et al. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle* 2011 ; 10 : 2662-8.
6. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 946-50.
7. Münzel M, Globisch D, Carell T. 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011 ; 50 : 6460-8.
8. Bernard OA, Delhommeau F, Fontenay M, Vainchenker W. Mutations du gène *TET2* dans les hémopathies myéloïdes humaines. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 785-8.
9. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 2011 ; 20 : 11-24.
10. Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2011 ; 20 : 25-38.
11. Li Z, Cai X, Cai C, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* 2011 ; 118 : 4509-18.
12. Ko M, Bandukwala HS, An J, et al. Ten-eleven-translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 14566-71.
13. Viguie F, Aboura A, Bouscary D, et al. Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement? *Leukemia* 2005 ; 19 : 1411-5.

NOUVELLE

VEGF, un facteur responsable de la formation des vaisseaux sanguins au service de la connectique neuronale

Pierre J. Fabre, Frédéric Charron

Laboratoire de biologie moléculaire du développement neuronal, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM) et Département de médecine, Université de Montréal, 110, avenue des Pins Ouest, Montréal, Québec, H2W 1R7 Canada.

► Lors du développement des circuits nerveux et du système vasculaire, l'embryon devient une véritable carte qui indique les positions et les chemins à suivre pour permettre la croissance orientée des axones et des vaisseaux sanguins.

Les neurones se connectent entre eux en suivant de façon très précise les voies délimitées par des molécules attractives et répulsives, qui guident les axones un peu comme les panneaux de signalisation nous guident sur les routes. La découverte des principes généraux sous-

jacents au câblage du système nerveux en développement a fourni les bases génétiques et moléculaires permettant de comprendre comment un ensemble relativement restreint de signaux de guidage suffit à l'assemblage de réseaux nerveux très complexes.



Dans la moelle épinière, il a ainsi été montré que deux composés diffusibles, la nétrine-1 et Sonic hedgehog (Shh) collaborent pour attirer les axones des neurones commissuraux vers la plaque basale de la moelle épinière (Figure 1) [1, 2]. La nétrine-1 et Shh sont sécrétées par la plaque basale, tandis que les récepteurs

pour ces molécules, DCC (*deleted in colorectal cancer*) et Boc (*brother of Cdon*), respectivement, sont localisés à la surface des axones. Lorsque ces récepteurs sont inactivés, la plupart des axones ne parviennent plus à rejoindre la plaque basale (cible) et se perdent dans les colonnes motrices [3-5].

Toutefois, lorsque les signalisations de ces deux molécules sont abolies, certains axones arrivent tout de même à rejoindre leur cible [2]. Cette observation suggérerait qu'un troisième acteur était mis en jeu pour attirer les axones commissuraux vers la plaque basale.

Nos travaux ont montré que, contre toute

attente, ce n'est pas une molécule classique du système nerveux qui joue ce rôle d'attractant. En effet, c'est en collaborant avec l'équipe du Dr P. Carmeliet, spécialiste des facteurs qui influencent la formation des vaisseaux sanguins, que nous avons récemment identifié le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) comme un troisième intervenant coordonnant la trajectoire des axones commissuraux [6]. Ce facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires était un très bon candidat pour jouer ce rôle puisqu'il est exprimé au bon endroit (la plaque basale) et au bon moment (au 11^e jour embryonnaire chez la souris, lors de la croissance des axones commissuraux). Pour mettre en évidence son rôle, nous avons montré que le VEGF est bel et bien sécrété par la plaque basale. Ensuite, en inactivant génétiquement soit le gène codant pour le VEGF, celui codant pour son récepteur Flk1, nous avons observé des défauts de guidage des axones commissuraux. Enfin, en filmant en temps réel des cultures de neurones commissuraux [7], nous avons observé que l'ajout de VEGF induisait

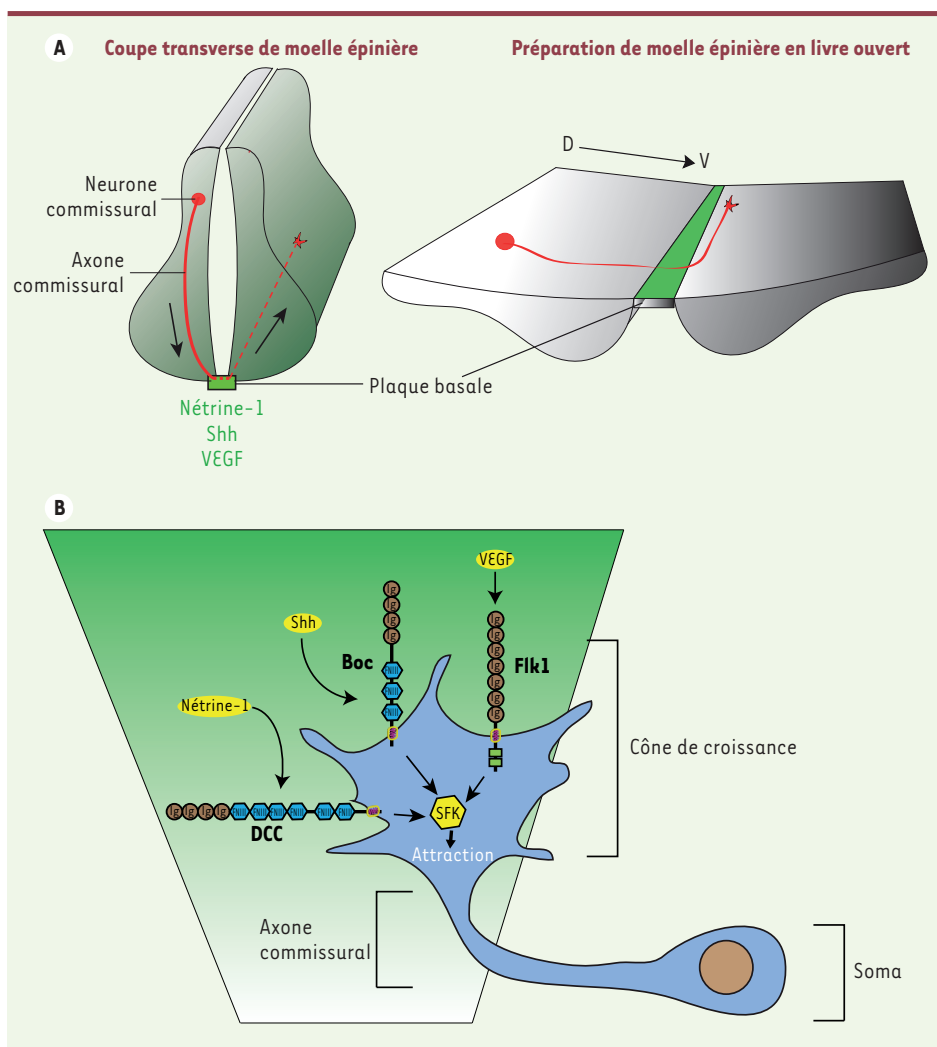


Figure 1. Guidage axonal par VEGF dans la moelle épinière. **A.** Représentations de la moelle épinière en développement. À gauche, une coupe transverse de la moelle épinière. Les corps cellulaires des neurones commissuraux (en rouge) sont localisés dans la partie dorsale (en haut) (D) de la moelle épinière. Ils envoient leur axone vers la plaque basale qui exprime le VEGF, la nétrine-1 et Shh. Ces molécules diffusibles forment des gradients (en vert). À droite, une préparation en « livre ouvert » de la moelle épinière permet de visualiser le croisement de la plaque basale par les axones commissuraux (en rouge). **B.** Illustration de la signalisation attractive au niveau du cône de croissance d'un neurone commissural. Les gradients de VEGF, Shh et nétrine-1 sont schématisés en vert. Le cône de croissance, qui exprime les récepteurs Flk1, Boc et DCC à sa surface, peut « lire » ce gradient et réoriente la trajectoire de l'axone commissural dans cette direction. Les trois récepteurs convergent pour activer les kinases de la famille Src (SFK), ce qui conduit au remaniement du cytosquelette et au processus attractif.

l'attraction des axones vers la source de VEGF [6], démontrant que l'effet de cette molécule sécrétée était bien direct, et non indirect *via* le remodelage des vaisseaux sanguins. De plus, nous avons cherché à définir par quelle voie moléculaire le signal du VEGF était relayé pour induire l'attraction axonale. Ainsi, en bloquant l'activité des kinases de la famille Src (SFK), nous avons observé que le VEGF perdait son effet attractif. Cette famille de kinases est aussi requise pour transmettre les effets attractifs de la nétrine-1 [8] et de Shh [9]. L'activité des SFK est donc la condition requise pour le guidage axonal commissural, conférant à ces kinases une position centrale dans l'intégration du signal attractif.

En parallèle, le rôle attractif du VEGF a également été identifié dans le système visuel [10]. Dans ce système, il y a deux populations de cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) qui projettent vers le cerveau. Une partie envoie des axones du côté ipsilatéral. Ceux-ci sont repoussés par le chiasma, et l'autre partie envoie les axones controlatéraux, qui croisent la ligne médiane du chiasma pour rejoindre la partie controlatérale du cerveau. L'expression du VEGF au niveau du chiasma optique guide les axones controlatéraux en les attirant. Cet effet attractif ne dépend pas du récepteur Flk1, comme dans la moelle

épineière, mais met en jeu le récepteur neuropiline-1, qui est exprimé spécifiquement à la surface des axones controlatéraux. Il est curieux d'observer que, dans ce système, la nétrine-1 n'est pas présente à ce niveau. La voie Shh, quant à elle, guide de façon répulsive les axones ipsilatéraux qui expriment spécifiquement le récepteur Boc [11]. Il sera intéressant de voir si les CGR transmettent ces signaux par le biais des SFK, et si des spécificités dans les voies moléculaires en aval des récepteurs peuvent expliquer les effets ambivalents (attraction *versus* répulsion) et le recrutement de différents récepteurs (Flk-1 et neuropiline-1) dans les systèmes visuel et spinal.

Chez l'homme, plusieurs études ont commencé à identifier des mutations dans les gènes responsables du guidage axonal au niveau de la ligne médiane [12]. La découverte du rôle du VEGF comme molécule attractive à ce niveau aidera non seulement à mieux comprendre ces conditions, mais permettra aussi d'ouvrir de nouvelles portes quant à l'élaboration de stratégies visant à promouvoir le rebranchement conjoint des circuits nerveux et sanguins lors de lésions ou de maladies dégénératives. ♦

**VEGF guides commissural axons:
a classic blood vessel trophic factor
on the nerve's service**

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, et al. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 1996 ; 87 : 1001-14.
2. Charron F, Stein E, Jeong J, et al. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 2003 ; 113 : 11-23.
3. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, et al. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 1997 ; 386 : 796-804.
4. Okada A, Charron F, Morin S, et al. Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 2006 ; 444 : 369-73.
5. Fabre P, Morin S, Charron F. Une histoire de guidage axonal très attirante. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 129-31.
6. Ruiz de Almodovar C, Fabre PJ, Knevels E, et al. VEGF mediates commissural axon chemoattraction through its receptor Flk1. *Neuron* 2011 ; 70 : 966-78.
7. Langlois SD, Morin S, Yam PT, Charron F. Dissection and culture of commissural neurons from embryonic spinal cord. *J Vis Exp* 2010 ; 39 : 1773.
8. Liu G, Beggs H, Jurgensen C, et al. Netrin requires focal adhesion kinase and Src family kinases for axon outgrowth and attraction. *Nat Neurosci* 2004 ; 7 : 1222-32.
9. Yam PT, Langlois SD, Morin S, Charron F. Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* 2009 ; 62 : 349-62.
10. Erskine L, Reijntjes S, Pratt T, et al. VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. *Neuron* 2011 ; 70 : 951-65.
11. Fabre PJ, Shimogori T, Charron F. Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. *J Neurosci* 2010 ; 30 : 266-75.
12. Izzi L, Charron F. Midline axon guidance and human genetic disorders. *Clin Genet* 2011 ; 80 : 226-34.

