



HAL
open science

Rôle de la Sémaphorine 3C motoneuronale dans la mise en place des projections motrices

Isabelle Sanyas

► **To cite this version:**

Isabelle Sanyas. Rôle de la Sémaphorine 3C motoneuronale dans la mise en place des projections motrices. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10251 . tel-00754958

HAL Id: tel-00754958

<https://theses.hal.science/tel-00754958>

Submitted on 20 Nov 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale : BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 Août 2006)

Soutenue publiquement le 9 Décembre 2011

Par

Mlle Isabelle SANYAS

Titre :

Rôle de la Sémaphorine 3C motoneuronale dans la mise en place des projections motrices.

Role of motoneuronal Semaphorin 3C during establishment of motor axon projections.

Directeur de thèse: Dr. Valérie CASTELLANI

Jury :

Mme Kathrin GIESELER	Présidente
Mme Fanny MANN	Rapporteur
Mme Andrea HUBER BRÖSAMLE	Rapporteur
M Dominique BAGNARD	Examineur
Mme Valérie CASTELLANI	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. A. Bonmartin

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De Marchi

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme le Professeur I. Daniel
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. P. Fournier
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. Pignault
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. Bernard

...Merci...

Je souhaite tout d'abord remercier Dr. Fanny Mann et Dr Andrea Huber pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également Dr. Dominique Bagnard et Dr. Kathrin Gieseler pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Ces cinq dernières années ont été pour moi l'aboutissement d'un rêve, qui remonte à bien longtemps maintenant. En effet, mon profond intérêt pour la biologie m'a rapidement permis de mettre le cap vers la recherche en biologie. Le voyage a été long, et on peut dire houleux par moments. Et ce n'est pas sans une certaine insouciance que je me suis lancée dans ces années successives de passion et de labeur qui aboutissent aujourd'hui à cette thèse!

La confiance est un élément majeur : sans elle, aucun projet n'aboutit.

Eric Tabarly

Par sa confiance, Valérie m'a ainsi permis de grandir avec mon projet, et surtout de ne pas lâcher prise, même au cœur de la tempête. Aussi je te remercie de tout cœur pour avoir cru en moi et m'avoir soutenu, particulièrement dans ces heures sombres où mon compas ne savait plus très bien où était le nord ! Merci pour ta bonne humeur constante et ta motivation contagieuse. Je remercie également Frédéric, pour le temps qu'il a passé à mes côtés, à répondre avec patience à mes innombrables questions, et pour tout ce qu'il m'a transmis tant dans le laboratoire que devant les classes d'étudiants. Merci Frédéric, tu m'as appris la rigueur et les savoir-faire sur lesquels je pourrais m'appuyer dans l'avenir pour voguer vers de nouvelles destinations.

Merci également à Julien, pour les nombreuses discussions que nous avons eu, et qui m'ont aidé à ne pas trop douter de mon cap. Et merci à Muriel, pour m'avoir tant aidé et tant appris d'un point de vue technique et humain. Merci encore à tous mes camarades moussaillons : Ahmad, Homaïra, Anne, Karima, Elise, Camille, Yohan, Florie, Ed, Karine, Julie, Arnaud. Merci à tous pour votre bonne humeur, votre joie de vivre, votre aide et nos soirées. Le voyage m'a semblé plus court à vos côtés, et c'est à regret que je change de navire aujourd'hui.

Merci également à tout le CGphiMC, pour l'aide et la présence de chacun et chacune au cours de ces dernières années.

Merci à ma famille, pour leur aide et leur soutien depuis le début de ce voyage périlleux. Vous avez tous, à votre façon, contribué à cette arrivée au port.

Enfin, un merci tout particulier à toi Ronan, mon compagnon de voyage pour les destinations les plus folles. Merci pour ton soutien sans faille au plus rude des tempêtes. Merci aussi pour le merveilleux cadeau que tu m'as fait et qui partage aujourd'hui notre vie. Ce petit rayon de soleil qui grandit chaque jour un peu plus pour ensoleiller notre voyage. Grâce à vous, je n'ai pas peur de m'engager vers de nouvelles traversées, qui seront, je l'espère, aussi riches que celle qui s'achève aujourd'hui.

Encore merci à tous, et vivement les prochaines escales, qui seront j'en suis sûre l'occasion de se retrouver et de partager nos dernières aventures!!

Table des matières

RESUMÉ FRANÇAIS	9
ENGLISH SUMMARY	11
CHAPITRE I : INTRODUCTION	13
I Les circuits sensori-moteurs.....	14
1) Organisation des circuits sensori-moteurs	14
2) Les différents partenaires du circuit sensori-moteur spinal et leur localisation	15
a. Les neurones sensoriels	15
b. Les interneurones	16
c. Les motoneurones	16
- Les circuits d'innervation des muscles axiaux	17
- Les circuits d'innervation des muscles des membres	18
d. Les muscles	19
3) Mise en place des circuits sensori-moteurs.....	19
a. Les membres du circuit sont spécifiés de manière précoce.....	20
b. Formation du patron général des projections sensorielles et motrices.	21
c. Les partenaires des circuits sensori-moteurs subissent une spécification tardive.	22
d. Sélection et consolidation des connexions	23
II Les motoneurones au sein des circuits sensori-moteurs.....	25
1) Spécification des motoneurones	25
a. Spécification des circuits des muscles axiaux et des membres.....	25
b. Spécification des circuits des membres et des ganglions sympathiques.	26
c. Spécification de l'identité des circuits neuromusculaires unitaires	28
2) Identité et structuration des motoneurones	29

3) Les étapes clés de la navigation des différentes branches motrices.....	31
a. Qu'est-ce que le guidage axonal ?.....	31
b. Les axones moteurs sortent de la moelle épinière par ses cornes ventrales.	33
c. Les tractus moteurs naviguent entre les somites.	34
d. Un premier point de choix permet la ségrégation entre la branche motrice dorsale de la MMCm et les branches motrices ventrales	35
e. Le plexus, structure de rattachement des axones moteurs avant l'invasion du membre.	38
f. Un second point de choix assure la séparation des branches motrices de la LMC dans le territoire dorsal et ventral du membre.....	39
g. Un dernier point de choix permet la ségrégation des nerfs pour l'innervation spécifique de chaque muscle du membre.....	41
III Les Sémaforines : candidats potentiels pour le guidage stéréotypé des nerfs moteurs dans le membre	43
1) Les Sémaforines participent au guidage du cône de croissance des axones	43
a. Présentation de la famille des Semaphorines.....	43
- Généralités	43
- Les Sémaforines de classe 3.....	43
b. Les complexes récepteurs des Sema	45
2) Sémaforines et guidage des motoneurones : rôles potentiels des modulations de réponse	48
a. Sema et motoneurones.....	48
- Les Sémaforines et leurs récepteurs dans les circuits moteurs	48
- Rôle des Sémaforines dans les circuits moteurs	49
b. Les modulations de réponse aux Sémaforines	52
- Modulation de réponse par la régulation de la composition des complexes récepteurs.....	53

-	Modulation de réponse par la régulation des voies de signalisation en aval des signaux de guidage.	56
-	Modulation de réponse par l'expression intrinsèque des Sémaphorines	57
c.	Rôle potentiel des modulations de réponse dans la mise en place de la branche motrice des circuits sensori-moteurs.	58
	CHAPITRE II : RESULTATS.....	61
I	Les outils d'interférence à l'ARN	62
1)	L'interférence à l'ARN et les différents outils d'interférence	62
2)	Exemple de l'interférence à l'ARN de Sema3C chez le poulet : étude comparative des différents outils utilisés	63
a.	Les différents outils	64
b.	Efficacité comparative des différents outils	65
c.	Limites des différents stratégies et effets aspécifiques.....	66
-	Effets non spécifiques.....	67
-	Durée de l'interférence	67
-	Modèles pour l'interférence à ARN.....	69
II	Etude du rôle de la Sémaphorine 3C motoneuronale au cours du développement.....	70
III	Sémaphorines et progéniteurs neuraux : mise en évidence d'un code Sema dans la zone ventriculaire.....	71
	CHAPITRE III : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	73
1)	Mécanismes de modulation de réponse par l'expression de Sema3 intrinsèque.....	74
a.	Les Sema3 intrinsèques ont-elles besoin d'être secrétées pour moduler le niveau de récepteur à la surface du cône de croissance ?	74
b.	Quel est le mécanisme de modulation du niveau de Nrp1 et Nrp2 à la surface du cône de croissance ?.....	76

c. Comment est médié le guidage des motoneurones par Sema3C environnemental ?.....	78
d. L'interaction de Sema3C avec les Neuropilines est-elle nécessaire et suffisante pour cette modulation ? D'autres partenaires du complexe récepteur entrent-ils en jeu dans ce processus ?	80
2) Rôle des Sema3 intrinsèques dans les motoneurones	81
a. Sema3C intrinsèque participe au guidage stéréotypé des motoneurones dans le membre	81
b. Les Sema3 intrinsèques participent-elles à d'autres évènements lors de la mise en place des projections motrices ?.....	83
c. Les Sémaphorines participent-elles à la connectivité spécifique des différents partenaires des circuits sensori-moteurs ?.....	84
3) Rôles putatifs d'un code Sema dans les progéniteurs neuraux.....	86
a. Les Sema3 intrinsèques participent-elles à l'identité des motoneurones?	87
b. Le code Sema3 distingue-t-il différents circuits sensori-moteurs ?	88
CHAPITRE IV : ANNEXE.....	90
Rôle de la Sémaphorine 3B dans la traversée de la ligne médiane par les axones commissuraux de la moelle épinière.....	91
BIBLIOGRAPHIE	92

Liste des abréviations

ALD : Anterior Latissimus Dorsi

AR: Acide Rétinoïque

ARN: Acide RiboNucléique

ARNm: Acide RiboNucléique
messenger

BDNF : Brain Derived Neurotrophic
Factor

bHLH: basic Helix Loop Helix factors

BMP: Bone Morphogenic Proteins

cAMP: cyclic Adenosine
MonoPhosphate

cGMP: cyclic Guanine MonoPhosphate

CMV: CytoMegalovirus promoter

Cys : cysteine

DCC: Deleted in Colorectal Cancer

DRG : Ganglion de la Racine Dorsale

dsARN : double strand ARN

EGFP: Enhanced GFP

Endo-N : endoneuraminidase

FCU : Flexor Carpi Ulnaris

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGFR: Fibroblast Growth Factor
Receptor

FR: Fasciculus Retroflexus

GDNF: Glial cell-line Derived
Neurotrophic Factor

GFP: Green Fluorescent Protein

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

HH: stades de développement du
poulet établis par Hamburger et
Hamilton

HMC : Hypaxial Motor Column

Ig : Immunoglobuline

LMC : Colonne Motrice Latérale

LMCl : partie latérale de la Colonne
Motrice Latérale

LMCm : partie médiane de la Colonne
Motrice Latérale

miARN: micro ARN

MMC : Colonne Motrice Médiane

MMCl : partie latérale de la Colonne
Motrice Médiane

MMCm : partie médiane de la Colonne
Motrice Médiane

MN : Motoneurones

NGF : Nerve Growth factor

Nrp : Neuropiline

Pec: Pectoralis

PGC : Preganglionic Motor Column

PKA: Protein Kinase A

PKG: Protein Kinase G

Plx: Plexine

PP : Plaque du Plancher

PSI : Plexin Semaphorin Integrin
domain

RAR: Récepteur à l'Acide Rétinoïque

RFP: Red Fluorescent protein

RISC: RNA Induced Silencing
Complex

Robo : Roundabout

SAC: Motoneurones des muscles
Spinaux Accessoires

Sca : Scapulohumeralis Posterior

Sema : Sémaphorine

shARN: short hairpin ARN

Shh: Sonic Hedgehog

siARN : small interfering ARN

VEGF : Vascular Endothelial Growth
Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth
Factor Receptor

ZM : Zone du Manteau

ZV : Zone Ventriculaire

RESUMÉ FRANÇAIS

La mise en place des projections axonales est une étape clé du développement des circuits de la moelle épinière qui contrôle les fonctions motrices de l'individu. Il s'agit d'un processus complexe impliquant des mécanismes de spécification des neurones moteurs et des signalisations multiples assurant le guidage spécifique de chaque axone jusqu'à sa cible d'innervation. Les Sémaphorines de classe 3 (Sema3) sont des molécules secrétées dans l'environnement qui participent notamment au guidage des axones moteurs de la moelle épinière. De manière surprenante, les motoneurones expriment également eux-mêmes des Sema3. Mon équipe a déjà montré que l'expression intrinsèque de Sema3A par les motoneurones module leur sensibilité au Sema3A de l'environnement. Ce processus s'effectue par une régulation du niveau de son récepteur à la surface du cône de croissance, la structure terminale de l'axone responsable de la perception des signaux de guidage extracellulaires (Moret et al., 2007). Quelle est la portée de ce nouveau mécanisme modulateur et peut-il être généralisé à d'autres membres de la famille des Sema3 exprimés dans les motoneurones ? Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence le rôle modulateur d'un autre membre de la famille Sema3 : Sema3C, dont l'expression est restreinte à une sous-population de motoneurones, en plus d'une expression environnementale. Par des expériences de gain et de perte de fonction dans l'embryon de poulet, nous avons montré que l'expression motoneuronale de Sema3C module de manière différentielle ses deux récepteurs Neuropiline, Nrp1 et Nrp2, à la surface du cône de croissance. Ces variations du niveau de récepteur entraînent une modulation de réponse à Sema3C mais aussi à Sema3A et Sema3F, qui se fixent respectivement sur Nrp1 et Nrp2. De plus, nous avons étudié la portée de ce mécanisme de modulation dans l'innervation des membres de l'embryon de poulet, ce modèle permettant l'étude des projections motoneuronales dans un environnement riche en Sema3. Ainsi, l'analyse *in vivo* des embryons de poulet pour lesquels l'expression intrinsèque de Sema3C dans les motoneurones a été manipulée a permis de montrer que la modulation de réponse aux Sema3 de l'environnement contribue au positionnement stéréotypé des projections motrices dans le membre antérieur. Ce travail permet donc de proposer que l'expression d'un code de Sema3 par les motoneurones confère aux différentes sous-populations une sensibilité spécifique aux gradients de Sema3 présents dans l'environnement et assure ainsi une trajectoire stéréotypée des axones moteurs jusque dans leur territoire cible.

ENGLISH SUMMARY

During spinal circuits' development, the implementation of axonal projections is a key step as it ensures the integrity of motor functions. This complex process implicates several mechanisms such as motoneuron specification and various signaling cascades in order to guide specifically each axon toward its innervation target. Class 3 Semaphorins (Sema3s) are chemotactic cues, secreted in the environment, and contributing to the guidance of spinal motor axons. Surprisingly, these Sema3s are also expressed by motoneurons themselves. Previous work in our team showed that intrinsic expression of Sema3A by motoneurons modulates their sensitivity to the environmental Sema3A. This process arises from the regulation of its receptor availability at the growth cone surface, the terminal end of the axon that enables sensing of extracellular signals (Moret et al., 2007). But in what extent can we generalize this mechanism to other members of the Sema3 family, and what impact could it have, *in vivo*, during development? My PhD work revealed the modulatory role of another Sema3, Sema3C, expressed in a restricted motoneuronal subpopulation as well as in the environment. By gain and loss of function experiments in the chick embryo, we showed that motoneuronal expression of Sema3C modulates differentially its two Neuropilin receptor levels, Nrp1 and Nrp2, at the growth cone surface. These variations of receptors' availability lead to a response modulation to extrinsic Sema3C, but also to Sema3A and Sema3F, that bind to Nrp1 and Nrp2, respectively. Moreover, we analyzed the role of such modulation mechanisms during limb innervation in the chick embryo. Indeed, this model enables the study of motor axon growth in a complex Semaphorin environment. *In vivo* analysis of chick embryos after intrinsic Sema3C manipulations revealed that response modulation to environmental Sema3s takes part in the stereotyped positioning of motor axon projections in the forelimb. Hence, this study suggest a model in which the expression of a Semaphorin code by motoneurons enables specific subpopulations to modulate their sensitivity to Sema3 gradients expressed in their environment, thus contributing to the stereotyped trajectories of motor axon projections towards their final target.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I Les circuits sensori-moteurs

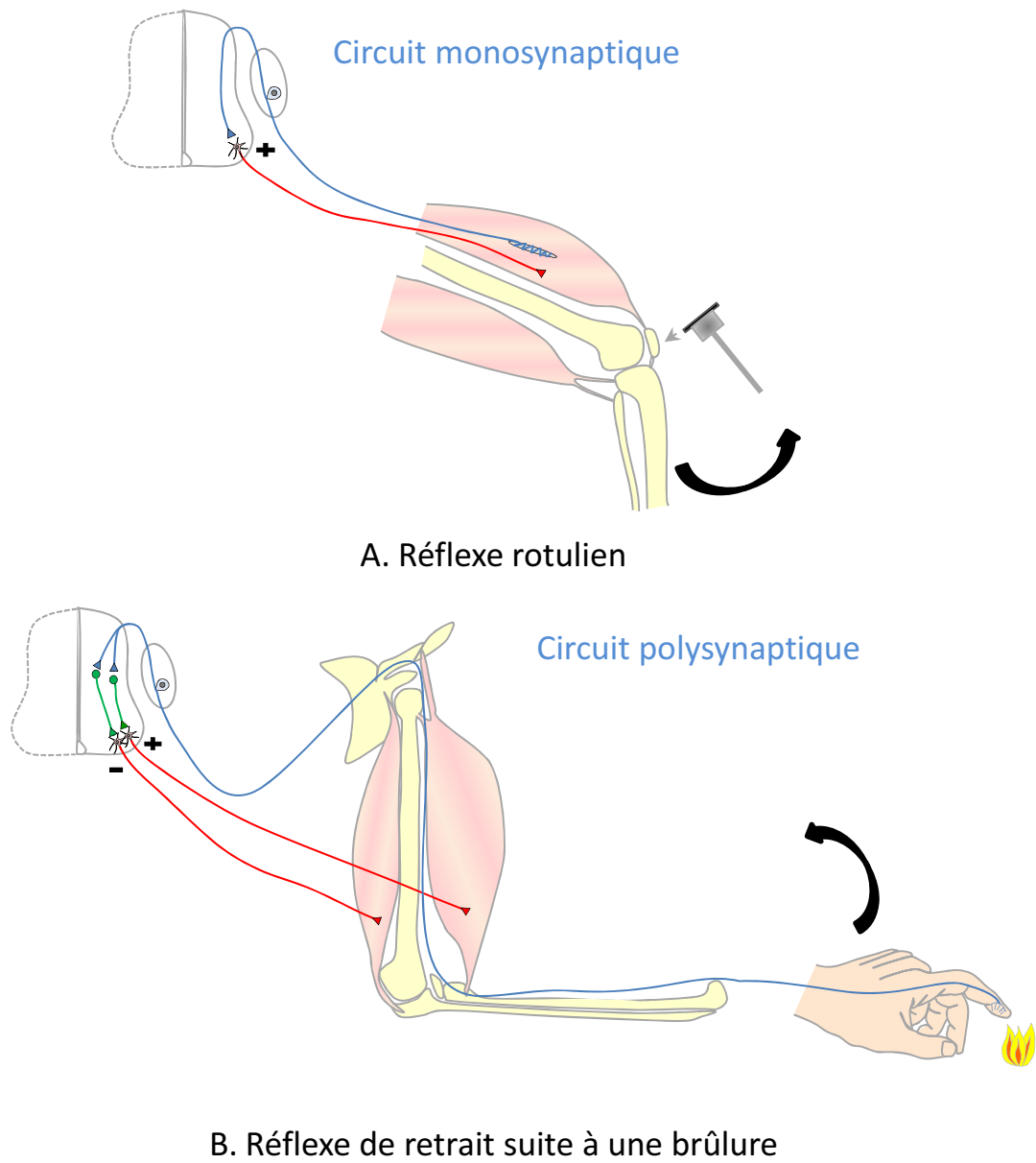
L'activité motrice est une fonction innée chez les animaux, plus ou moins opérante à la naissance mais indispensable pour la survie des espèces puisqu'elle permet notamment l'accès à la nourriture et la fuite face aux prédateurs. Cette fonction repose sur la mise en place de circuits moteurs et sensori-moteurs complexes qui assurent l'interconnexion de tissus participant à une fonction commune.

1) Organisation des circuits sensori-moteurs

Les fonctions motrices sont assurées par des circuits moteurs dédiés comprenant des circuits sensori-moteurs reliés à des réseaux descendants d'interneurones des centres supérieurs. Ces interneurones des voies descendantes du cortex moteur permettent par exemple de générer des activités rythmiques ou d'intégrer des informations issues de multiples modalités sensorielles et de la mémoire, et sont ainsi à l'origine d'activités motrices complexes et adaptées à l'environnement.

Cependant, l'étendue des capacités motrices à notre disposition nécessite également une grande diversité et une fiabilité des circuits sensori-moteurs mis en jeu. Pourtant, cette diversité des circuits repose sur un nombre limité de type de partenaires et donc sur une architecture similaire. En effet, un circuit sensori-moteur fonctionnel émerge de la mise en relation de trois à quatre effecteurs principaux : les neurones sensoriels qui assurent le transport afférent des informations sensorielles, un intermédiaire éventuel constitué d'interneurones, des motoneurones permettant le transport efférent de l'information motrice vers la cible terminale, et des muscles, véritables effecteurs du circuit (Dasen, 2009).

L'exemple d'un circuit à trois partenaires est le circuit monosynaptique du réflexe myotatique. Les neurones sensoriels de la peau ou des muscles établissent une communication synaptique directe sur les motoneurones de la moelle épinière, qui renvoie à leur tour une information motrice vers les muscles effecteurs (Butler et Hodos, 2005). Ce circuit constitue un arc réflexe qui assure une réaction motrice stéréotypée et involontaire suite à un stimulus sensoriel, par exemple l'extension de



Légende:

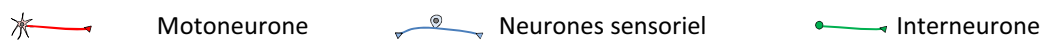


Figure 1: Exemples de circuits monosynaptique et polysynaptique. **A.** Le réflexe rotulien conduit à une flexion de la jambe suite à la communication directe d'un neurone sensoriel sur un motoneurone. **B.** Le réflexe de retrait permet le retrait de la main grâce à l'intervention d'un interneurone excitateur se projetant sur un motoneurone qui assure alors la contraction du biceps, et grâce à un interneurone inhibiteur qui se projette sur les motoneurones innervant le muscle antagoniste au biceps.

la jambe suite à la percussion du tendon rotulien, ou réflexe rotulien (Fig. 1A). Cependant, la plupart des circuits sensori-moteurs fait intervenir un ou plusieurs interneurones et constituent des circuits à quatre partenaires.

De tels circuits, dits polysynaptiques, sont par exemple mis en jeu lors du réflexe de retrait suite à une brûlure (Butler et Hodos, 2005) (Fig. 1B). Dans ce type de circuits, les neurones sensoriels de la peau se projettent sur un intermédiaire, les interneurones, qui établissent eux-mêmes des connexions synaptiques sur les motoneurones avant que ceux-ci ne se projettent sur les muscles effecteurs.

Ainsi, les différents circuits moteurs reposent sur la réutilisation de partenaires communs, clés de voûte de l'activité motrice.

2) Les différents partenaires du circuit sensori-moteur spinal et leur localisation

a. Les neurones sensoriels

Les premiers acteurs de l'activité sensori-motrice sont les neurones sensoriels qui assurent une perception de l'environnement et un relais vers le système nerveux central. Ces neurones ont une structure pseudo unipolaire singulière qui en fait des éléments clé dans le relais rapide de l'information sensorielle depuis la périphérie vers les centres nerveux. En effet, leur corps cellulaire est situé dans les ganglions de la racine dorsale (DRG) et leur axone se subdivise en deux branches, une branche périphérique qui innerve la peau et les muscles, et une branche centrale qui se projette vers la moelle épinière (H.-H. Chen et al., 2003). Les neurones sensoriels spinaux sont répartis en deux catégories selon leur fonctionnalité : les neurones sensoriels de la peau et les neurones proprioceptifs.

Les neurones sensoriels de la peau sont sensibles aux vibrations, à la pression, au toucher, etc... Parmi eux, on retrouve les neurones nociceptifs, dont les terminaisons nerveuses libres ou encapsulées innervent le derme et l'épiderme et relaient ainsi les stimuli liés à la douleur jusqu'aux interneurones de la moelle épinière, par exemple lors d'une brûlure (Dasen, 2009) (Fig. 1B).

Les neurones proprioceptifs quant à eux innervent les muscles pour relayer des informations relatives à la perception de la position du corps dans l'espace

(proprioception). Par exemple dans les muscles, ces neurones innervent des mécanorécepteurs des fuseaux musculaires, sensibles à l'état d'étirement du muscle. En plus de cette innervation périphérique, la longueur de la branche centrale de ces neurones permet de définir trois classes de neurones proprioceptifs. Les neurones proprioceptifs de classe Ia relient directement des fuseaux musculaires aux motoneurones de la corne ventrale de la moelle épinière, les neurones de classe Ib relient les mécanorécepteurs des tendons à des interneurones de la partie médiane de la moelle épinière, et finalement les proprioceptifs de type II relient surtout les fuseaux musculaires à des interneurones dans la partie dorsale de la moelle (Dasen, 2009).

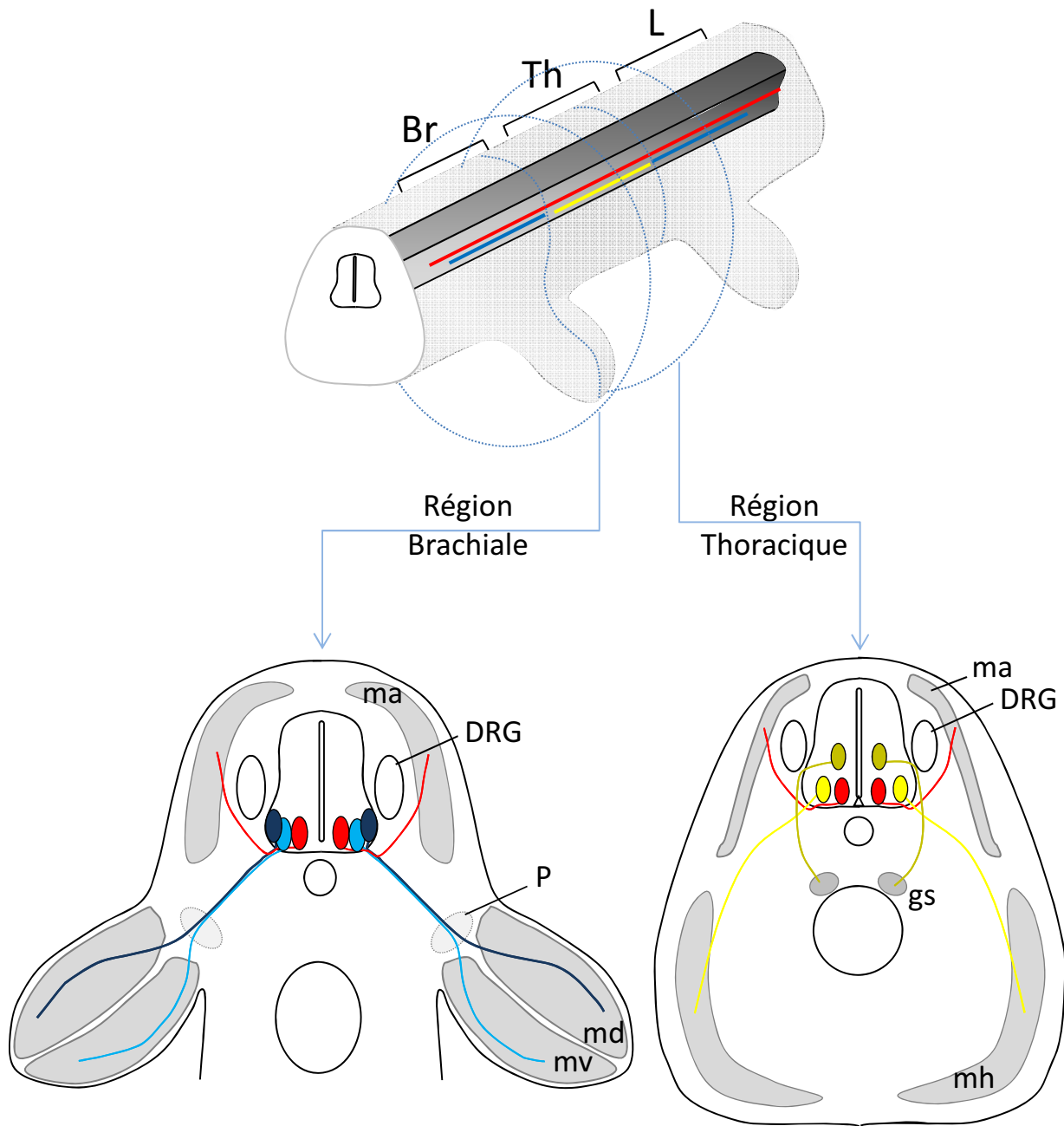
Tous ces types de neurones ramènent donc l'information sensorielle vers le système nerveux central, et la transmettent alors soit directement aux motoneurones, soit à des intermédiaires, les interneurones.

b. Les interneurones

Situés dans la moelle épinière, ces neurones sont de véritables intégrateurs sensoriels qui coordonnent l'information motrice. En effet, par leur activité excitatrice ou inhibitrice sur les motoneurones, ils raffinent les différentes activités motrices (Brownstone et Bui, 2010). Par exemple, lors du réflexe de retrait suite à une brûlure, les neurones sensoriels nociceptifs se projettent pour certains sur des interneurones excitateurs des motoneurones afin de stimuler la contraction du biceps, et pour d'autres sur des interneurones inhibiteurs dits « inhibiteurs Ia » afin d'inhiber la contraction du muscle antagoniste au biceps pour que ce dernier se contracte correctement (Fig. 1B). Le rôle intermédiaire des interneurones leur permet ainsi de moduler l'activité des motoneurones pour la rendre efficace (Squire et al., 2008).

c. Les motoneurones

Ils forment la branche effectrice des circuits sensori-moteurs. Le corps cellulaire des motoneurones est situé dans la corne ventrale de la moelle épinière, et leurs axones innervent tous les muscles de l'organisme auxquels ils peuvent donc



- Légende:
- MMCm
 - HMC
 - PGC/CT
 - LMCm
 - LMCI
- } MMCI

Figure 2: Représentation schématique des patrons de projections des différentes sous-colonnes de motoneurones.

Les motoneurones de la MMCm innervent les muscles axiaux (ma) et sont situés dans tout l'axe rostro-caudal de l'embryon. Dans les régions brachiale (Br) et lombaire (L), les motoneurones des LMCI et LMCm innervent respectivement les muscles du membre dorsal (md) et les muscles du membre ventral (mv). Au niveau thoracique (Th), les motoneurones de la HMC innervent les muscles hypaxiaux (mh) alors que ceux de la PGC/CT innervent les ganglions sympathiques (gs). DRG: Ganglion de la Racine Dorsale. P: plexus.

transmettre les informations motrices efférentes. Une grande diversité de motoneurones peut être observée au sein de la moelle épinière, et cette diversité provient de l'exécution de différents programmes transcriptionnels et à l'expression de marqueurs spécifiques. Ces motoneurones sont regroupés, selon leur identité, en noyaux pour lesquels a été décrite une grande hiérarchisation comprenant plusieurs niveaux successifs : les colonnes, sous-colonnes et pools de motoneurones. Ces pools de motoneurones, dont les axones se projettent sur un même muscle, définissent alors des unités fonctionnelles qui possèdent une identité commune, reçoivent des informations afférentes d'un même groupe de neurones sensoriels ou d'interneurones et transmettent l'information efférente à une cible unique (Guthrie, 2002).

Un premier niveau d'organisation en colonnes permet de distinguer deux grands groupes de circuits moteurs : les circuits d'innervation des muscles axiaux et les circuits d'innervation des membres.

- *Les circuits d'innervation des muscles axiaux*

Les motoneurones de ces circuits, regroupés au sein d'une même colonne appelée Colonne Motrice Médiane (MMC), innervent les muscles dorsaux ou ventraux du tronc. Ils sont subdivisés en deux sous-colonnes permettant de distinguer les circuits d'innervation des muscles épaxiaux (dorsaux) des circuits d'innervation des muscles hypaxiaux (ventraux) et des ganglions sympathiques.

La partie la plus médiane de la MMC (MMC_m) regroupe, dans tout l'axe rostro-caudal de l'embryon, les motoneurones innervant les muscles épaxiaux du tronc, constitués principalement des muscles extenseurs de la colonne vertébrale (Fig. 2). Les axones moteurs de cette sous-colonne sortent par la partie ventrale de la moelle épinière et remontent en direction du dermamyotome après avoir contourné les DRG (K W Tosney et L. T. Landmesser, 1985; K. Tosney et LT Landmesser, 1985; T M Jessell, 2000; Shirasaki et Samuel L Pfaff, 2002).

Quant à la sous-colonne latérale de la MMC, la MMC_l, elle n'est présente qu'au niveau thoracique de l'embryon. Elle contient les motoneurones innervant soit les muscles hypaxiaux du tronc, regroupés au sein de la sous-colonne HMC (Hypaxial Motor Column), soit les ganglions sympathiques, regroupés au sein de la sous-

colonne PGC (PreGanglionic motor Column) aussi appelée Colonne de Terni chez le poulet (Fig. 2). Les axones moteurs de la HMC sortent par la partie ventrale de la moelle épinière et se dirigent ventralement pour innerver les muscles abdominaux et thoraciques. Les axones moteurs de la PGC sortent de la moelle épinière plus dorsalement et vont innerver les ganglions sympathiques (T M Jessell, 2000; Shirasaki et Samuel L Pfaff, 2002).

- *Les circuits d'innervation des muscles des membres*

Les motoneurons de ces circuits appartiennent à une même colonne appelée Colonne Motrice Latérale (LMC) et sont responsables de l'innervation de tous les muscles des membres. Cette LMC n'est présente qu'aux niveaux brachial et lombaire de la moelle épinière, soit au niveau des membres antérieurs et postérieurs. Les axones moteurs issus de cette colonne sortent de la moelle épinière par ses racines ventrales et progressent en direction des membres. Avant l'entrée dans le membre, ces axones traversent un plexus, véritable carrefour d'aiguillage des axones et qui permet ainsi la séparation des axones appartenant à des circuits effecteurs différents.

Il émerge de ces plexus deux nerfs spinaux différents, composés d'axones moteurs issus de deux sous-colonnes distinctes de motoneurons. La sous-colonne latérale des LMC (LMCl) et la sous-colonne médiane des LMC (LMCm) innervent respectivement les muscles dorsaux et ventraux des membres et reflètent ainsi deux circuiteries d'innervation complémentaires pour les membres antérieurs et postérieurs (Fig. 2). Les faisceaux dorsaux et ventraux se subdivisent en faisceaux plus petits composés d'axones issus de motoneurons innervant un même muscle spécifique. Ce niveau d'organisation final au sein de ces sous-colonnes permet de regrouper les axones moteurs en pools de motoneurons qui appartiennent au même circuit moteur innervant un muscle spécifique. (L Landmesser, 1978; T M Jessell, 2000; Shirasaki et Samuel L Pfaff, 2002; Bonanomi et Samuel L Pfaff, 2010).

Finalement, les circuits décrits ci-dessus montrent que chaque branche motrice efférente possède une identité et une fonction spécifique issues de l'organisation en colonnes, sous-colonnes et pools des motoneurons associés. Cette grande hiérarchisation des motoneurons contribue à la spécificité de chaque circuit sensori-moteur.

d. Les muscles

Les muscles sont les effecteurs des circuits moteurs. Chez les amniotes, plus de cinquante groupes de muscles ont été répertoriés (Hollyday et Jacobson, 1990). Ils sont regroupés en deux catégories, les muscles striés et les muscles lisses. Ils assurent ainsi divers fonctions motrices de l'organisme, depuis la préhension volontaire des objets, au transit intestinal passif. Ils reçoivent des connexions nerveuses des motoneurones mais disposent également de capteurs sensoriels comme les neurones proprioceptifs, qui assurent la surveillance de l'état de contraction du muscle. Il s'agit donc d'un carrefour entre l'action motrice et le départ d'une nouvelle information sensorielle.

Finalement, si le nombre de partenaires dans un circuit moteur est limité, la spécificité de chacun est cruciale à une activité motrice rapide, coordonnée et efficace. Ainsi, la fonctionnalité des circuits repose sur la mise en relation de partenaires spécifiques.

3) Mise en place des circuits sensori-moteurs.

La mise en place des circuits sensori-moteurs repose sur la spécification des différents types neuronaux, qui définit la fonction de chaque partenaire et sa place dans le circuit final. C'est de cette étape que dépend la future connexion de chaque motoneurone avec les bons neurones sensoriels et le muscle cible adéquate, afin d'assurer le contrôle des mouvements (Dalla Torre di Sanguinetto et al., 2008). Ainsi, un motoneurone ne peut pas appartenir à deux circuits sensori-moteurs antagonistes. Beaucoup d'études différentes ont contribué à identifier des éléments participant à l'interconnexion spécifique des différents membres d'un même circuit. Par exemple, dans un cas original, il a été montré que les partenaires du circuit réflexe viscéral médullaire partagent tous l'expression d'un même facteur de transcription, *Phox2b*, qui définit l'identité des différents partenaires, mais est également un élément crucial pour leur spécification (J.-F. Brunet et Pattyn, 2002;

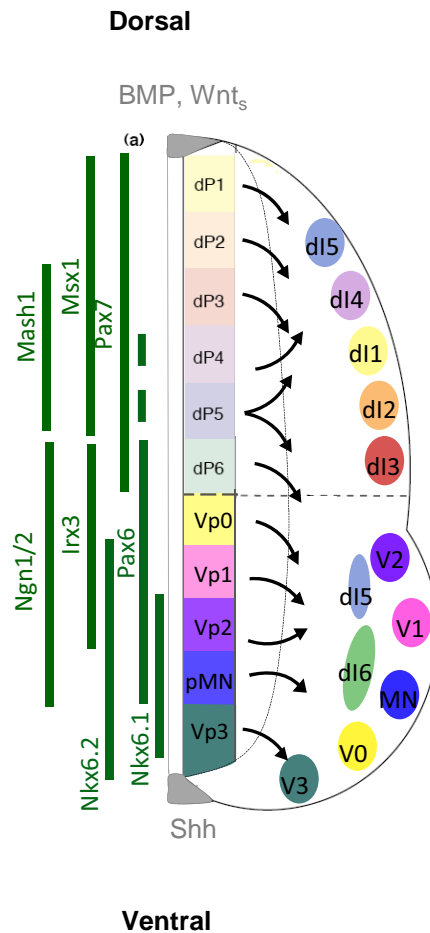


Figure 3: Les différents domaines progéniteurs de la moelle épinière sont définis par un code de facteurs de transcription. Sous l'action des morphogènes BMP, Wnt et Shh sécrétés par la plaque du plancher et la plaque du toit, des combinaisons spécifiques de facteurs de transcriptions, qualifiés de « gènes de patterning », se mettent en place. Ce code transcriptionnel permet l'apparition de onze domaines progéniteurs, à l'origine des différents lignages neuronaux de la moelle épinière.

Tiveron et al., 1996). Cependant, la mise en évidence de tels facteurs qualifiés de « facteurs maîtres » reste rare et une question clé demeure: quels sont les éléments qui déterminent l'appartenance de chaque partenaire à un même circuit et comment se met en place une telle fidélité de câblage ?

Plusieurs niveaux de contrôle de l'identité et de la mise en place des connexions ont été mis en évidence.

a. Les membres du circuit sont spécifiés de manière précoce

Tout d'abord, l'appartenance à un circuit donné est en partie définie par une spécification précoce et indépendante de chaque membre du circuit. En effet, les différents neurones sensoriels, interneurones et motoneurones sont issus de groupes uniques de progéniteurs neuraux qui suivent des programmes transcriptionnels leur permettant d'acquérir des caractéristiques d'identité et de connectivité spécifique.

Pour ce qui est des motoneurones et des interneurones, les morphogènes Sonic hedgehog (shh), Bone Morphogenic Proteins (BMP) et Wnt permettent l'expression de combinaisons spécifiques de facteurs de transcription basic Helix Loop Helix (bHLH) dans les progéniteurs neuraux le long de l'axe dorso-ventral de la moelle épinière (Fig. 3). Ils assurent alors l'apparition de onze domaines de progéniteurs spécifiques le long de cet axe dorso-ventral, chaque domaine donnant naissance à un type neuronal particulier (Briscoe et al., 2000; Helms et J. E. Johnson, 2003; T M Jessell, 2000) (Fig. 3). Dans l'axe antéro-postérieur, l'expression segmentaire des gènes Hox complètent la combinatoire de facteurs de transcription définissant des limites rostro-caudales des colonnes et spécifient les multiples pools de motoneurones (Dasen et al., 2005). Après la différenciation de ces progéniteurs, chaque domaine post-mitotique conserve son identité par l'expression d'une combinaison précise de facteurs de transcription comme par exemple les facteurs à homéodomains LIM ou les facteurs ETS (H. H. Chen et E Frank, 1999; Lin et al., 1998).

b. Formation du patron général des projections sensorielles et motrices.

Les axones émis par les neurones spécifiés suivent ensuite des grandes voies d'innervation balisées par de nombreuses molécules de guidage et se ségrègent progressivement au niveau de zones de choix directionnel pour aller innover des territoires spécifiques. Ces zones de tri sont considérées comme des cibles intermédiaires où chaque axone peut réévaluer sa position par rapport à sa cible finale grâce à de nombreux signaux de guidage et ainsi s'orienter correctement vers sa destination terminale. Les branches nerveuses sont alors ségréguées grâce à la perception des molécules de guidage qui les entourent, par leurs axones, qui répondent selon leur identité et donc selon le lignage auxquels ils appartiennent.

C'est donc de l'identité précédemment spécifiée que dépend notamment la formation de connexions spécifiques avec d'autres membre du circuit moteur. En effet, plusieurs groupes ont montré que la perte de l'expression des gènes Hox par les motoneurones conduit à de sévères défauts des projections axonales sur les muscles cibles et à des problèmes moteurs chez les animaux concernés (Dasen et al., 2005; Tiret et al., 1998; Wu et al., 2008). Ces études ont fait des gènes Hox des déterminants primaires de la connectivité des motoneurones puisqu'en perdant leur spécification dépendante des facteurs Hox, les motoneurones ne sont plus capables de reconnaître leur cible et de constituer la branche efférente de l'information motrice.

Au sein des neurones sensoriels, l'expression spécifique de certains facteurs de transcription, à la fois dans les progéniteurs avec les bHLH *ngn1* et *ngn2*, et dans les neurones post-mitotiques avec les LIM (*Isl1* and *Isl2*), les POU (*Brn3a*) et les bHLH (*NeuroD*), permet de distinguer les différents lignages proprioceptifs et nociceptifs ainsi que leurs cibles de projection. En effet, l'étude du double mutant *Brn3a^{-/-}/Isl1^{-/-}* a montré que si certains neurones sensoriels sont encore générés, leurs projections axonales sont raccourcies et ne parviennent pas à atteindre leur cible finale (Dykes et al., 2011). Ainsi, ces facteurs spécifiques de lignage post-mitotiques jouent un rôle dans la capacité de connectivité des neurones sensoriels sur leurs cibles respectives.

Finalement, les spécifications précoces des différents lignages neuronaux contribuent à la capacité et à la spécificité de connectivité des différents partenaires des circuits moteurs entre eux.

c. Les partenaires des circuits sensori-moteurs subissent une spécification tardive.

Une spécification plus tardive, dite « cible dépendant », a également été mise en évidence lors de la mise en place des circuits sensori-moteurs. En effet, une fois que les neurones sensoriels et moteurs ont atteint leur muscle cible, un second programme de spécification, dépendant de la cible, se met en place. Ainsi, l'expression des facteurs ETS par les motoneurones et des Runx par les neurones sensoriels dépend de la présence dans les muscles cibles de facteurs neurotrophiques. En effet, il a été montré que l'ablation précoce du membre chez l'embryon de poulet conduit à une perte de l'expression du facteur ETS PEA3 par les motoneurones et que cette modification de l'identité finale des motoneurones est imputable à l'absence de signaux trophiques présents dans le membre, dont le GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) (Lin et al., 1998; Helmbacher et al., 2003). Dans le cas des neurones sensoriels, il a été montré que l'axone dit « central » dépend des informations rapportées par la fibre périphérique préalablement formée. Ainsi, l'ablation du membre chez le poulet au cours du développement précoce a également permis d'observer une très forte diminution des projections centrales de certains neurones sensoriels (Oakley et al., 1997). De même, l'inactivation du facteur Runx3 chez la souris, dont l'expression a été montrée comme dépendante de l'innervation de la cible, conduit à une perte de la branche « centrale » des neurones proprioceptifs (Inoue et al., 2002). Or, l'étude d'une lignée de souris *Bax^{-/-}*, pour laquelle la mort cellulaire est bloquée, a montré que les neurones sensoriels ne dépendent pas de leur cible uniquement pour survivre grâce à des facteurs trophiques, mais également pour acquérir leur morphologie bipolaire. En effet, des neurones sensoriels mis en culture par Lentz et collaborateurs n'émettent plus qu'une branche axonale. Par contre, l'application des neurotrophines NT3 et NGF sur ces mêmes neurones en culture permet l'apparition d'un second axone (Lentz et al., 1999). Les auteurs ont donc conclu que les neurones sensoriels

dépendent notamment de leur cible pour établir leurs morphologies caractéristiques et ainsi assurer la bonne transmission de l'information sensorielle afférente. La spécification tardive des neurones sensoriels contribue ainsi à la mise en place de la connectivité des circuits formés.

Enfin, il est possible de proposer un autre mécanisme participant à la connectivité spécifique des circuits sensori-moteurs. En effet, on peut émettre l'hypothèse que la projection des motoneurones et des neurones sensoriels sur un même muscle pourrait engendrer une spécification terminale commune, à l'origine de l'expression d'un même facteur, qui serait alors une véritable carte d'identité et d'appartenance à un même circuit, à l'image des circuits réflexes viscéraux avec le facteur commun *Phox2b* (J.-F. Brunet et Pattyn, 2002; Tiveron et al., 1996).

d. Sélection et consolidation des connexions

Il a également été proposé que la sélection et la consolidation des connexions établies selon leur fonctionnalité permettent d'achever ce patron de connectivité spécifique et raffiné entre un neurone sensoriel, un interneurone, un motoneurone et un muscle spécifique. En effet, un processus de mort cellulaire programmé a été décrit pour les motoneurones et participerait à la sélection des connectivités, notamment pour limiter des redondances de ces dernières (Sendtner et al., 2000). De plus, les travaux de Vinay et collaborateurs ont montré que l'activité électrique détectée dans les circuits moteurs, peu après la naissance, permettrait notamment de sélectionner les connexions motrices les plus efficaces et contribueraient ainsi à un raffinement des circuits moteurs mis en place (Vinay et al., 2000).

En conclusion, plusieurs programmes et évènements développementaux contribuent à la mise en place et au raffinement des circuits moteurs. La connectivité spécifique de ces circuits est un processus complexe et finement régulé mettant en jeu tant l'identité de chaque membre du circuit que l'adéquation des différents partenaires entre eux. Cependant, si les processus décrits ci-dessus détaillent notamment les éléments transcriptionnels contrôlant ces comportements neuronaux,

comment s'effectue le guidage spécifique des axones ainsi spécifiés et quelles sont les molécules mises en jeu?

En vue d'identifier les effecteurs de la mise en place de cette circuiterie, la spécification de l'identité et des projections axonales des motoneurones vers les membres ont été particulièrement étudiés.

II Les motoneurones au sein des circuits sensori-moteurs

1) Spécification des motoneurones

Si tous les motoneurones spinaux sont issus d'un unique domaine ventral de progéniteurs neuraux s'étendant tout le long de l'axe antéro-postérieur, ils acquièrent des identités différentes au cours du développement. Cette spécification progressive permet une ségrégation successive des motoneurones de même identité en clusters de plus en plus spécialisés comme il a été décrit précédemment.

La spécification des motoneurones débute dès leur dernier cycle cellulaire, et ce grâce à des facteurs diffusibles exprimés par la plaque du plancher de la moelle épinière (PP) et par le mésoderme paraxial entourant la moelle. On distingue quatre grandes familles de molécules : Sonic hedgehog (Shh), la famille des Wnt, la famille des FGF et l'Acide Rétinoïque (AR). Si ces facteurs contribuent d'abord à la spécification de l'identité générique des motoneurones à partir d'un pool de progéniteurs, leur action plus tardive et spécifique dans le temps et dans l'espace permet de faire émerger la hiérarchisation de motoneurones en colonnes, sous colonnes et pools.

a. Spécification des circuits des muscles axiaux et des membres.

Le premier acteur de la spécification est la famille des Wnt par l'action de ses membres Wnt4, Wnt5a et Wnt5b. En effet, leur sécrétion à partir de la PP et de ses tissus environnants permet le maintien de l'expression de deux facteurs LIM, Lhx3 (ou Lim3) et Lhx4 (ou Gsh4) dans une partie seulement des motoneurones, leur conférant ainsi une identité de sous colonne MMCm (Fig. 5). Les autres motoneurones, considérés à ce moment-là comme Lhx3/4⁻ se destinent à former les autres sous colonnes de MN. En effet, la surexpression des Wnt4/5 dans tous les motoneurones conduit à un maintien de l'expression de Lhx3/4 dans tous ces derniers, qui sont alors spécifiés majoritairement en MMCm (D. Agalliu et al., 2009). A l'inverse, l'étude de lignées de souris invalidées pour la quasi-totalité des copies des trois facteurs Wnt4/5, la souris Wnt4^{-/-}/Wnt5a^{-/-}/Wnt5b^{+/-} a permis de mettre en évidence une très forte diminution de la proportion de motoneurones de la MMCm au

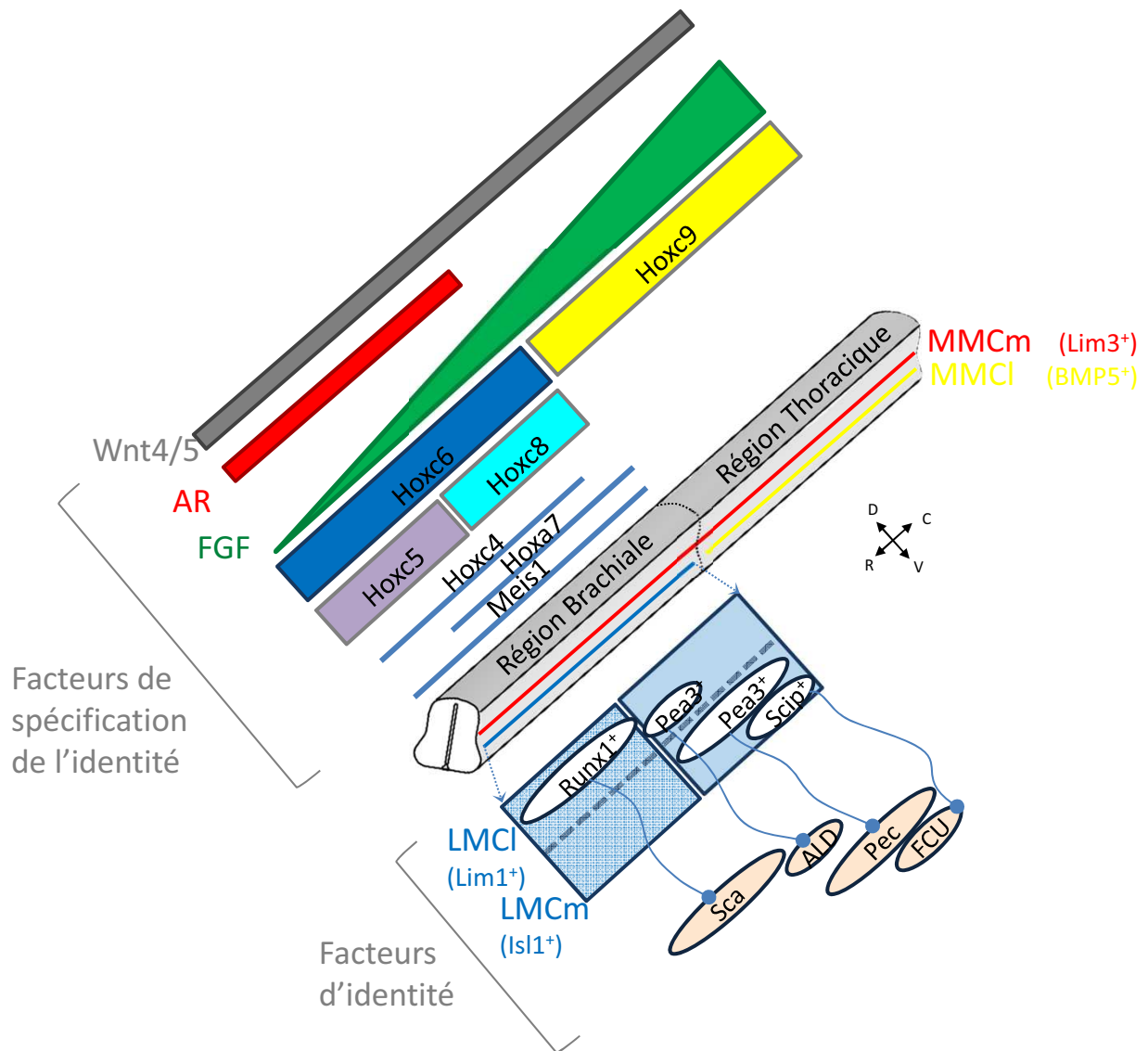


Figure 4: Représentation schématique de la spécification de l'identité des sous-colonnes latérales et de leurs pools respectifs de motoneurones. Les facteurs Wnt, FGF, l'Acide rétinoïque (AR) et les facteurs Hox spécifient l'identité des sous-colonnes motrices latérales (LMC) dans la région brachiale et de la sous-colonne latérale de la MMC (MMCI) dans la région thoracique. La combinatoire des Hox dans la région brachiale permet de spécifier l'identité moléculaire des pools de motoneurones qui innervent chacun un muscle particulier comme le muscle scapulothoracalis postérieur (Sca), le muscle pectoralis (Pec), le muscle Flexor carpi Ulnaris (FCU) et le muscle anterior latissimus dorsi (ALD). D'après Dasen et al., 2003 et Dasen et al., 2005

sein de la population totale de motoneurones. Cependant, cette spécification a lieu dans une fenêtre de temps bien régulée puisqu'une expression ectopique de *Wnt4/5* trop tardive n'a pas de conséquence sur la spécification de l'identité des colonnes et sous-colonnes motrices (D. Agalliu et al., 2009). Ainsi, le maintien de l'identité des motoneurones repose sur l'expression de facteurs spécifiques, mais également sur une régulation fine de la temporalité d'expression de ces facteurs.

b. Spécification des circuits des membres et des ganglions sympathiques.

Une fois la spécification de la MMCm initiée, le reste de motoneurones, *Lhx3/4*, va être spécifié par l'action conjuguée de deux facteurs diffusibles. Il s'agit de l'Acide Rétinoïque (AR) et du Fibroblast Growth Factor (FGF), tous deux provenant du mésoderme paraxial entourant la moelle épinière. A ce stade du développement, l'AR est fortement exprimé dans la région brachiale de l'embryon et spécifie particulièrement l'identité de la colonne LMC (Fig. 4). Ainsi, le blocage de la signalisation de l'AR par l'électroporation, dans la région brachiale de l'embryon de poulet, d'un dérivé du récepteur à l'AR, RAR, dépourvu d'un domaine de transactivation (RAR403), conduit à une perte du lignage LMC (Sockanathan et al., 2003). Des résultats similaires ont été observés par l'inactivation de l'enzyme responsable de la synthèse de l'AR, RALDH2 chez la souris *RALDH2^{-/-}* (Ji et al., 2006). Plus tardivement, l'expression de l'AR se généralise à tout l'axe rostro-caudal. Or il a été montré que l'activation précoce de la signalisation de l'AR dans la région thoracique conduit à une mort des motoneurones de la MMCI et de la PGC (Sockanathan et al., 2003). Pourtant, un peu plus tardivement, l'expression de l'AR par une partie des LMC (la future MMCm) permet la spécification de l'identité de la sous colonne LMCI (Sockanathan et Thomas M. Jessell, 1998). Ainsi, la régulation temporelle et spatiale des signalisations apparaît là encore comme un élément important de la spécification.

En parallèle de cette spécification dépendante de l'acide rétinoïque, le FGF participe à la spécification des identités des LMC mais aussi des PGC (la sous-population des MMCI qui innervent les ganglions sympathiques). En effet, le FGF est présent dans le mésoderme paraxial de l'embryon selon un gradient rostro-caudal croissant. Cette expression en gradient est importante pour la spécification des

motoneurones puisque les différents niveaux de FGF permettent la mise en place de l'expression d'un code de facteurs Hox dans l'axe rostro-caudal de l'embryon, facteurs clés de l'identité hiérarchisée des motoneurones (Fig. 4). Ainsi, Dasen et collaborateurs ont montré par des expériences de surexpression du facteur FGF8 chez le poulet que de fortes concentrations de FGF8 permettent l'expression du facteur Hoxc9 dans la région thoracique de l'embryon et ainsi l'émergence de l'identité de la PGC. Au contraire, le faible niveau d'expression de FGF8 dans la région brachiale permet l'expression du facteur Hoxc6 à l'origine de l'identité LMC des motoneurones qui s'y trouvent (Dasen et al., 2003). De manière intéressante, les auteurs ont également mis en évidence une activité inhibitrice croisée de ces deux facteurs Hox, qui permet alors de marquer la frontière entre la région de résidence des LMC (région brachiale) et celle des PGC (région thoracique) (Dasen et al., 2003). Par ailleurs, la restriction spatiale des domaines d'expression des facteurs Hox dans l'axe rostro-caudal est à l'origine de la localisation précise des différentes colonnes. En effet, la colonne LMC n'est présente qu'aux niveaux brachiaux et lombaires de l'embryon. Chez l'embryon de poulet, des transpositions de mésoderme paraxial brachial dans la région thoracique, effectuées par Ensini et collaborateurs, conduisent à une altération de la position rostro-caudale à laquelle sont générés les motoneurones de la LMC (Ensini et al., 1998). La répartition spatiale des sous-colonnes de motoneurones dans l'axe rostro-caudal est donc le résultat d'une expression localisée et d'une ségrégation active des facteurs de spécification de l'identité.

Enfin, le reste de la population des motoneurones, qui n'a été ni spécifiée par l'AR, ni par le FGF, se destine à une identité HMC, indépendamment de l'expression des gènes Hox (Rouso et al., 2008).

Ces divers programmes de spécification permettent ainsi de définir les grandes familles de circuits moteurs : celle des muscles épaxiaux par l'identité de la sous-colonne MMCm, celle des muscles hypaxiaux par l'identité de la HMC, celle des muscles des membres par l'identité de la colonne LMC et celle des ganglions sympathiques par l'identité de la PGC.

c. Spécification de l'identité des circuits neuromusculaires unitaires

Une spécification complémentaire au niveau des pools de motoneurones permet de définir l'identité des circuits à l'échelle d'un seul muscle. Les circuits moteurs innervant l'un des cinquante groupes de muscles d'un amniote sont contrôlés par des combinaisons spécifiques de facteurs Hox, responsables de l'identité de pools intrasegmentaires dans l'axe rostro-caudal de l'embryons. Cette notion de spécification de l'identité de pools a été particulièrement étudiée dans le cas des pools de LMC innervant des muscles spécifiques du membre. Ainsi, l'expression caudale de Hoxc8 dans la région brachiale de l'embryon, sous l'influence du FGF, permet la spécification de deux pools Pea3⁺ et Scip⁺ innervant respectivement le muscle Pectoralis (Pec) et le muscle Flexor Carpi Ulnaris(FCU) (Fig. 4). L'invalidation de l'expression de Hoxc8 par interférence à l'ARN chez l'embryon de poulet conduit ainsi à un changement de spécification de l'identité des motoneurones concernés. Ces derniers deviennent alors dépendants de l'expression du facteur Hoxc5, ce qui conduit à l'apparition d'un pool de motoneurones Runx1⁺ innervant le muscle Scapulohumeralis Postérieur (Sca) (Dasen et al., 2005). L'acquisition de cette nouvelle identité se fait par un élargissement du domaine d'expression de Hoxc5, normalement restreint à la région rostrale de la zone brachiale de l'embryon. De plus, un niveau de complexité supplémentaire est ajouté par l'expression localisée d'autres facteurs Hox dans ces régions, qui permettent ainsi la mise en place d'une véritable combinatoire d'expression spécifique à chaque pool de motoneurone (Fig. 4). Par exemple, la combinatoire Hoxc8/Hoxa7 définit le pool innervant le muscle FCU tandis que la combinatoire Hoxc8/Hoxa4 définit le pool de motoneurones innervant le muscle Pec (Dasen et al., 2005). Les territoires d'expression de ces facteurs Hox étant légèrement décalés dans l'axe rostro-caudal et leurs activités régulées par des inhibitions réciproques, il apparaît là encore que la régulation rostro-caudale de leurs domaines d'expression permet la localisation spécifique de chaque pool de motoneurones.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux montre que l'action conjuguée de facteurs diffusibles issus des régions proches des précurseurs de motoneurones permet la mise en place d'un code de facteurs Hox dans l'axe rostro-caudal de

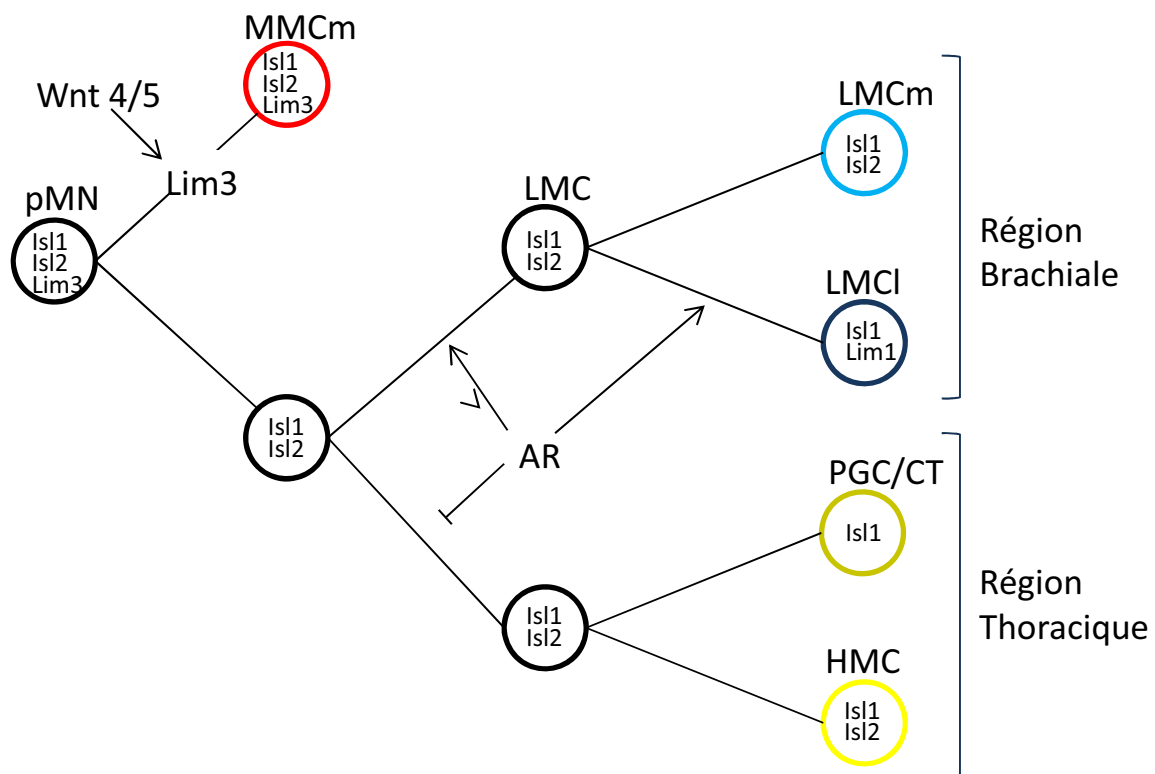


Figure 5: Spécification des identités des différentes sous-colonnes de motoneurones.

Sous l'action conjuguée des facteurs Wnt et de l'Acide rétinoïque (AR), les progéniteurs de motoneurones (pMN) sont spécifiés pour acquérir différentes identités, hiérarchisées en colonnes et sous-colonnes, et caractérisées par l'expression d'une combinatoire spécifique de facteurs LIM. LMCI: sous colonne latérale de la Colonne Motrice Latérale; LMCm: sous-colonne médiane de la Colonne Motrice Latérale; PGC/CT: Colonne Motrice Préganglionnaire/Colonne de Terni; HMC: Colonne Motrice Hypaxiale; MMCm: sous-colonne médiane de la Colonne Motrice Médiane; MMCI: sous-colonne latérale de la colonne Motrice Médiane. D'après Sockanathan et al., 2003.

l'embryon, qui collaborent pour la mise en place des différentes identités de colonnes, sous-colonnes et pools de motoneurones. De plus, la régulation temporelle et spatiale de l'expression de ces facteurs apparaît comme cruciale puisqu'elle permet la spécification du groupe de motoneurones adéquat dans une fenêtre de développement correcte. Cependant, les acteurs moléculaires d'une telle régulation restent très mal connus à ce jour. On peut tout de même imaginer que des activateurs ou des inhibiteurs de gènes sont à l'œuvre pour assurer une telle régulation spatio-temporelle, comme il a été montré pour la régulation de la spécification des progéniteurs de motoneurones (S. K. Lee et S L Pfaff, 2001; S. Lee et al., 2008).

2) Identité et structuration des motoneurones

La spécification des motoneurones permet notamment l'acquisition par chaque niveau d'organisation d'une identité propre qui se traduit par des profils d'expression de facteurs LIM et ETS différents (Fig. 5). Ainsi, sous l'action des facteurs *wnt3/4*, la sous-colonne MMCm prend une identité *isl1⁺/isl2⁺/Lhx3/4⁺*. Puis, sous l'action conjuguée de l'AR, du FGF et des facteurs Hox, la sous-colonne LMCm acquiert une identité *isl1⁺/isl2⁺*, la sous-colonne LMCI perd son expression transitoire de *isl1* et gagne l'expression du facteur *Lim1* afin d'acquérir une identité *isl2⁺/Lim1⁺*, et la sous-colonne PGC perd l'expression de *isl2* et possède alors une identité *isl1⁺*. Enfin, la sous-colonne HMC maintient l'expression des deux facteurs génériques aux motoneurones et possède ainsi une identité *isl1⁺/isl2⁺* (T. Tsuchida et al., 1994). Par la suite, le maintien de l'expression des facteurs Hox et du FGF permet aux sous-colonnes d'acquérir une identité de pools, spécifique à chaque muscle, dont quelques exemples ont été mentionnés précédemment (Dasen et al., 2005).

Il est important de noter que l'acquisition d'une identité par les motoneurones se fait précocement, alors qu'ils sont encore mélangés et sortent tout juste du cycle cellulaire. Pourtant le rôle de ces facteurs « spécifiant » va au-delà de simples marqueurs de l'identité. En effet, plusieurs études permettent de les impliquer dans la ségrégation des motoneurones en noyaux distincts à l'origine de l'organisation en colonnes, sous-colonnes et pools. L'étude de nombreuses lignées de souris mutantes pour ces facteurs d'identité, comme la souris *Lhx3^{-/-}/Lhx4^{-/-}*, la souris

isl1^{cond.KO}, la souris isl2^{-/-}, la souris Pea3^{-/-}, la souris Nkx6.1^{-/-}, a mis en évidence des défauts de regroupement des somas de motoneurones et donc l'absence d'une organisation hiérarchisée de ces derniers (Sharma et al., 1998; Thaler et al., 2004; Liang et al., 2011; Livet et al., 2002; N. V. De Marco Garcia et Thomas M. Jessell, 2008). Des molécules d'adhésion comme les cadhérines ont également été impliquées dans ce processus de « tri » des motoneurones. En effet, Price et collaborateurs ont montré que les pools de motoneurones expriment chacun un répertoire spécifique de cadhérines. Par des expériences d'invalidation et des expressions ectopiques d'une cadhérine spécifique d'un pool (MN-cad), les auteurs ont mis en évidence le rôle de chaque membre de la famille de cadhérines pour le regroupement entre eux des motoneurones appartenant à un même pool (Price et al., 2002; Guthrie, 2002). De manière intéressante, les auteurs ont montré que cette expression spécifique de cadhérines dans les motoneurone est directement liée à l'identité du pool. En effet, l'expression ectopique du facteur ETS Er81 dans les motoneurones conduit à l'expression ectopique de MN-cad par ces derniers (Price et al., 2002).

Ainsi, les facteurs d'identité et certaines molécules d'adhésion assurent la mise en place de l'identité de chaque groupe de motoneurones, notamment par le regroupement des motoneurones semblables en vue de l'établissement de l'organisation hiérarchisée décrite précédemment. De manière intéressante, les études précédentes montrent la corrélation d'expression des répertoires de cadhérines entre les motoneurones et les neurones sensoriels proprioceptifs interconnectés (Guthrie, 2002; Price et al., 2002). Ainsi, les auteurs suggèrent que l'acquisition de l'identité par ces différents types de neurones, qui est notamment établi grâce à des signaux présents dans la cible musculaire, pourrait conduire indirectement à la sélectivité de connexion des différents partenaires des circuits sensori-moteurs. On peut alors se demander si un tel processus de « reconnaissance » entre des partenaires pourrait se généraliser à l'expression d'autres types de molécules issues de la spécification.

En conclusion, lors des étapes de spécification, les motoneurones acquièrent une identité spécifique qui leur confère une connectivité particulière. Mais la mise en place de cette connectivité passe par de nombreuses étapes finement régulées afin

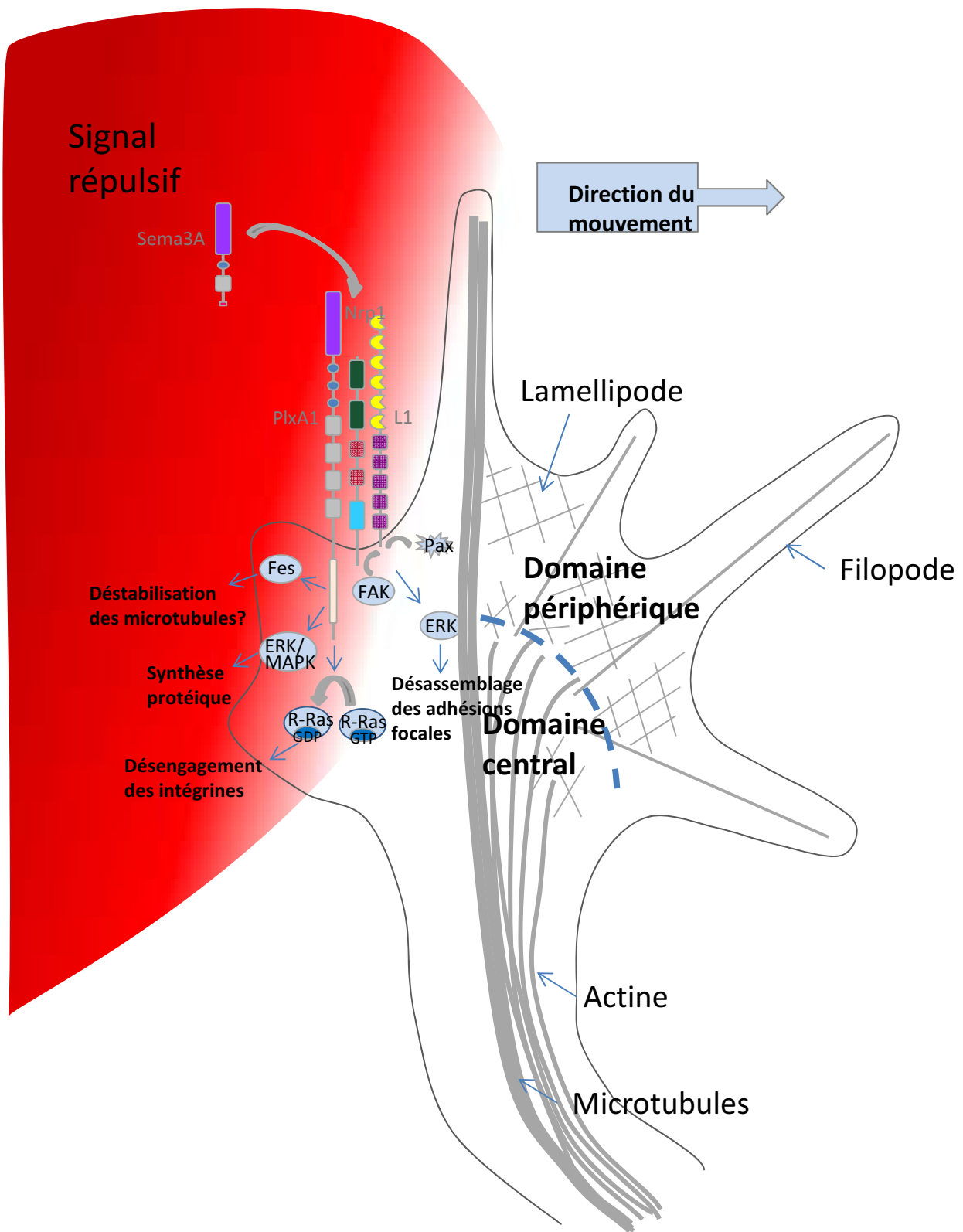


Figure 6: Représentation schématique de la structure du cône de croissance et des mécanismes impliqués dans son collapse en présence du répulsif Sema3A. La présence d'un signal répulsif, ici Sema3A, dans l'environnement du cône de croissance permet l'engagement des complexes récepteurs composés ici du récepteur Neuropilin 1 (Nrp1), du co-récepteur PlexinA1 (PlxA1) et d'un partenaire de la famille des IgSF CAM, L1. La fixation de Sema3A sur son récepteur Nrp1 active le co-récepteur PlxA1 qui va assurer, avec L1, une désorganisation du réseau d'actine et une dépolymérisation des microtubules, conduisant à la rétraction des filopodes exposés au signal. La progression du cône de croissance s'effectue donc grâce aux filopodes présents à l'opposée du facteur répulsif. D'après Bouquet et al., 2007; Krüger et al., 2005; Bechara et al., 2007; Gherardi et al., 2004

d'assurer la croissance des axones et la séparation des différentes branches des circuits moteurs, avant d'atteindre leur cible finale.

3) Les étapes clés de la navigation des différentes branches motrices

Comme il a été précédemment décrit, la spécification des motoneurones permet la mise en place de leurs différentes identités. Mais comment établir le lien entre identité et spécificité de la connectivité lors de la mise en place des circuits ? Plusieurs études ont montré que ces identités assurent l'expression, au sein de chaque colonne, sous-colonne et pool de motoneurones, d'une combinaison spécifique de molécules et récepteurs, véritables effecteurs de la ségrégation des différents circuits moteurs. En effet, par un processus de guidage spécifique, ces molécules et récepteurs permettent de définir les trajectoires axonales qui composent les différents circuits moteurs

a. Qu'est-ce que le guidage axonal ?

La navigation des axones dans l'espace se fait grâce à l'interprétation des signaux moléculaires qu'ils rencontrent au fur et à mesure. Pour cette opération, l'axone est muni à son extrémité d'une structure très motile et extrêmement sensible appelée cône de croissance. Ce cône de croissance permet une perception rapide et intégrative des différents signaux moléculaires présents dans son environnement proche afin d'orienter l'axone jusqu'à sa cible finale. Le cône de croissance est composé d'un domaine central rattaché au corps de l'axone et d'un domaine périphérique très dynamique formé de filopodes et de lamellipodes (Bouquet et Nothias, 2007). Ces structures sont riches en microfilaments d'actine et en microtubules qui forment un réseau dense et dynamique par des jeux de polymérisation et dépolymérisation, permettant ainsi l'extension et la rétractation des filopodes nécessaires à l'exploration de l'environnement (Bouquet et Nothias, 2007; Dickson, 2002) (Fig. 6).

La présentation de ligands, solubles ou transmembranaires, à l'axone permet leur fixation sur des récepteurs surtout présents sur des filopodes du cône de croissance.

En aval de ces récepteurs, plusieurs voies de signalisation comme la voie des Rho GTPases ou la signalisation calcique assurent la motilité du cône. Cette liaison active une signalisation dans le cône de croissance qui *in fine* régule l'actine et les microtubules et ainsi la formation ou rétractation polarisée des filopodes (Dickson, 2002) (Fig. 6).

L'étude des mécanismes de guidage axonal met en lumière deux propriétés clés du cône de croissance : d'une part sa capacité d'intégration de signaux multiples et d'autre part sa capacité de modulation de réponse à un même signal. La capacité d'intégration du cône de croissance est réalisée grâce à des complexes récepteurs variés regroupés dans des radeaux lipidiques dédiés, qui permettent la fixation de plusieurs ligands simultanément. L'intégration des signaux se fait également grâce à la convergence des différentes voies de signalisation vers des voies canoniques communes qui engendrent des messages simples à interpréter pour le cône de croissance (Yu et Bargmann, 2001; Wen et Zheng, 2006). Ainsi, le cône de croissance peut engager une réponse coordonnée aux différents signaux moléculaires qui l'entourent. Par ailleurs, le cône de croissance peut également moduler sa réponse à un même signal. De nombreuses voies ont été décrites, comme la régulation des niveaux de nucléotides cycliques (cAMP, cGMP, ou les enzymes qui les utilisent comme PKA ou PKG), une traduction locale dans le cône de croissance, des interactions inhibitrices de récepteurs entre eux, une régulation de la composition des récepteurs, ou encore l'intervention de protéases pour la régulation de la disponibilité de certains récepteurs. Le cône de croissance dispose ainsi de nombreuses stratégies pour moduler sa réponse dans le temps et dans l'espace (Shewan et al., 2002; Campbell et C E Holt, 2001; E Stein et M Tessier-Lavigne, 2001; Nawabi et al., 2010).

Ces capacités du cône de croissance à intégrer les multiples signaux qui l'entourent, mais également à moduler sa réponse à un signal donné selon le contexte spatio-temporel dans lequel il se trouve, permettent en partie de comprendre un des points clés du guidage axonal à savoir comment assurer une grande diversité de réponses et de guidage à partir d'un répertoire limité de signaux et de récepteurs.

En effet, pour l'instant, dans le cas des motoneurones, quatre familles principales de molécules de guidage ont été mises en évidence : les Nétrines, les Slits, les Ephrines et les Sémaphorines (Dickson, 2002). Si d'autres facteurs de guidage et récepteurs sont encore en cours d'identification, ces familles de molécules se distinguent par leur grande récurrence dans les événements de guidage du système nerveux en développement. Les Nétrines et les Slits sont des molécules secrétées, attractives ou répulsives, et qui se fixent respectivement sur les récepteurs Unc40 (de la famille des récepteurs DCC) et Unc5 et sur les récepteurs de la famille Roundabout (Robo). Les Ephrines sont des molécules transmembranaires, principalement répulsives, et qui se lient sur les récepteurs de la famille Eph. Enfin, les Sémaphorines sont des molécules secrétées ou transmembranaires, surtout connues pour leurs rôles répulsifs, et qui se lient sur des complexes récepteurs de Plexin, Neuropilin et quelques autres composants variables (cf. détails en III).

Ces molécules de guidage créent un environnement moléculaire permettant au cône de croissance d'effectuer des choix directionnels par attraction ou répulsion, et ainsi de suivre des trajectoires stéréotypées jusqu'à sa cible finale. Dans le cadre des circuits sensori-moteurs, plusieurs molécules de guidage ont été impliquées dans la ségrégation des différentes branches spécifiques. Cette ségrégation est effectuée à des points qualifiés de « points de choix » pour les axones moteurs.

- b. Les axones moteurs sortent de la moelle épinière par ses cornes ventrales.

Tous les axones moteurs, à l'exception de ceux des motoneurones des muscles spinaux accessoires (SAC), sortent de la moelle épinière par sa corne ventrale, sans envahir les territoires adjacents, parmi lesquels se trouve la plaque du plancher (PP). Ce lieu de sortie des axones moteurs est un trait d'identité conféré par l'expression des facteurs Lhx3/Lhx4. En effet, l'étude des souris mutantes Lhx3^{-/-}/Lhx4^{-/-} a montré que l'ensemble des motoneurones étaient alors spécifiés en motoneurones SAC et empruntaient une voie de sortie plus dorsale de la moelle épinière (Sharma et al., 1998). Ainsi, l'expression (même transitoire pour la LMC et la MMCI) de ces facteurs confère aux motoneurones une identité associée à un trajet de projection précoce ventral pour la sortie de la moelle épinière.

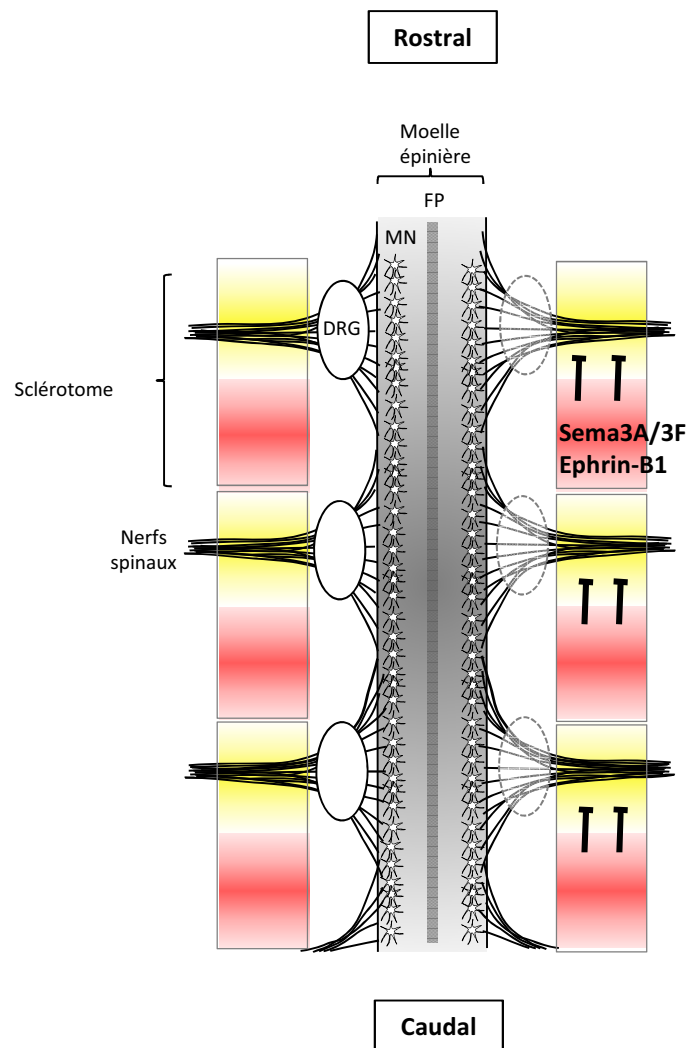


Figure 7: Guidage des axones moteurs dans le sclérotome rostral. Après leur sortie de la moelle épinière, le parcours des nerfs spinaux est contraint dans la partie rostrale (jaune) de chaque segment de sclérotome. En effet, la présence de Sema3A, Sema3F et EphrinB1 dans l'hémisclérotome caudal (rouge) confère une nature non permissive à ce territoire, et les axones moteurs sont ainsi déviés de manière stéréotypée vers le sclérotome rostral. D'après Bonanomi et al., 2010.

Plus récemment, des facteurs de la PP ont été impliqués dans ce guidage des axones moteurs vers la corne ventrale de la moelle épinière. De manière intéressante, les neurones commissuraux, situés dans la partie dorsale de la moelle épinière, sont tout d'abord attirés par la PP grâce à l'expression de l'attractant Netrin1, puis en sortent par répulsion du facteur Slit. Or ce changement de sensibilité est permis par l'interaction du récepteur de Slit, Robo, avec le récepteur de Netrin1, DCC. Cette interaction Robo/DCC conduit alors à une perte de sensibilité à l'attractant Netrin1 et à une prévalence de la répulsion du facteur Slit qui permet aux axones commissuraux de sortir de la PP. Une étude récente a proposé un système similaire pour les motoneurones. En effet, la co-expression dans les motoneurones des éléments Robo, DCC et Slit suggère la possibilité d'un mécanisme actif de désensibilisation des MN au Netrin1 attractif de la PP (G. Bai et al., 2011). Ainsi, l'électroporation, dans les motoneurones, d'une forme dominante négative du récepteur Robo induit l'attraction des motoneurones vers des cellules COS surexprimant Netrin1. Les auteurs ont alors proposé l'existence d'une auto-inhibition de l'attraction de la PP par les motoneurones eux-mêmes, permettant alors la sortie de leurs axones par la corne ventrale de la moelle épinière (G. Bai et al., 2011). Précédemment, Brose et collaborateurs avaient pour leur part mis en évidence une réponse répulsive des motoneurones à Slit2, présent dans la PP (Brose et al., 1999). Ces deux études vont dans le sens de mécanismes actifs de sortie ventrale de la moelle épinière par les axones moteurs, bien que le processus exact de guidage des motoneurones hors de la corne ventrale reste à établir. Les motoneurones éviteraient donc la PP pour sortir par la corne ventrale de la moelle épinière et poursuivre leur trajet vers leur cible finale.

c. Les tractus moteurs naviguent entre les somites.

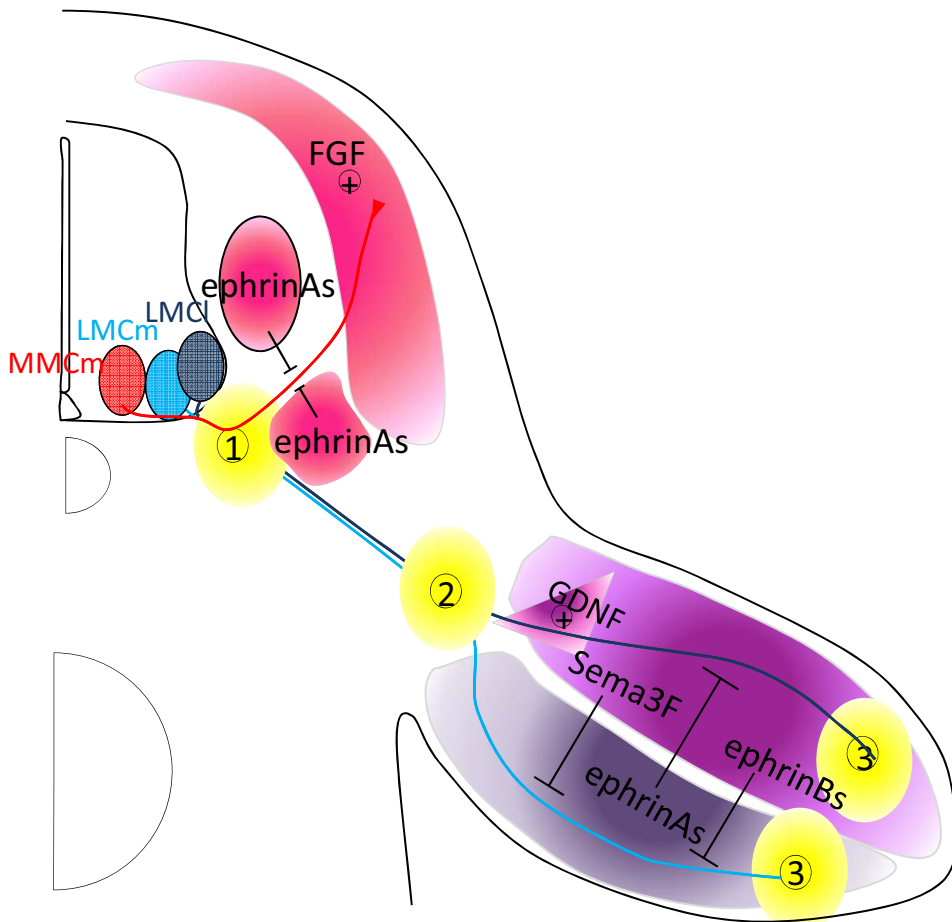
Une fois sortis de la moelle épinière, les axones moteurs évoluent dans le sclérotome et sont regroupés sous forme de tracts nerveux indépendants. Or les nerfs spinaux, tout comme les DRG, sont organisés de manière segmentaire dans l'axe rostro-caudal de l'embryon et ne sont présents qu'au niveau du sclérotome rostral de chaque segment (R J Keynes et Stern, 1984; Oakley et K W Tosney, 1993) (Fig. 7).

L'identité des motoneurones contribue à cette segmentation rostro-caudale. En effet, une étude a montré que chez le mutant $isl2^{-}/Hb9^{-}$ (qui permet non seulement d'invalider l'expression de $isl2$ notamment dans les motoneurones, mais également de diminuer leur expression de $isl1$ grâce à l'invalidation de $Hb9$), des axones moteurs traversent les limites inter-segmentaires normalement dépourvues d'axones (Thaler et al., 2004). Ces résultats suggèrent que l'identité précoce $isl1^{+}/isl2^{+}$ de tous les motoneurones serait à l'origine de l'expression de récepteurs spécifiques de signaux de guidage du sclérotome.

Le rôle des facteurs de guidage dans cette segmentation rostro-caudale a notamment été montré pour des membres de la famille des Ephrines et des Sémaphorines (M. M. Vermeren et al., 2000; H. U. Wang et D. J. Anderson, 1997). Plusieurs études ont en effet mis en évidence une compartimentation, dans la moitié caudale de chaque segment de sclérotome, de molécules de guidage répulsives comme Ephrine B1, Sema3A et Sema3F (Koblar et al., 2000; Roffers-Agarwal et Gammill, 2009). Ainsi, les motoneurones qui expriment les récepteurs à ces signaux répulsifs, respectivement EphB2, Nrp1 et Nrp2, sont contraints de n'envahir que la moitié rostrale de chaque segment, sous la forme de tracts nerveux fasciculés (Fig. 7). De manière intéressante, la fonction de ces différents signaux semble redondante puisque les invalidations des récepteurs EphB2, Nrp1^{Sema^{-/-}} (perte de son rôle dans la voie sémaphorine) ou Nrp2 n'induisent que des défauts partiels de guidage segmentaire des nerfs spinaux comme par exemple une hyperfasciculation des nerfs spinaux chez le mutant Nrp1^{Sema^{-/-}} ou une sortie uniforme des racines nerveuses dans l'axe rostro-caudal chez le mutant Nrp2^{-/-} (Roffers-Agarwal et Gammill, 2009).

Ainsi, le guidage des motoneurones dans l'axe rostro-caudal de l'embryon permet l'établissement d'un patron de sortie segmentaire des axones moteurs à des points précis de la moelle épinière et assure un niveau de fasciculation des axones entre eux approprié à la formation des tracts nerveux. Cependant, la contribution et la diversité exacte des différents signaux de guidage pour cette segmentation de l'embryon restent à déterminer (V. A. Schneider et Granato, 2003).

- d. Un premier point de choix permet la ségrégation entre la branche motrice dorsale de la MMCm et les branches motrices ventrales



Légende:

- MMCm: Nrp1⁺, EphA4⁺, FGFR1⁺ ■ Sclérotome rostral + dermamyotome
- LMCm: Nrp1⁺, Nrp2⁺, EphB1⁺ ■ Membre dorsal
- LMCI: Nrp1⁺, EphA4⁺, Ret⁺ ■ Membre ventral

① Point de choix pour les axons moteurs

Figure 8: Guidage des axons moteurs au cours du développement. Selon leur identité, les axons moteurs sont guidés vers leur cible finale grâce à des molécules de guidage comme le FGF et les ephrines. Les axons sont ségrégués progressivement lorsqu'ils arrivent à différents points de choix. Tout d'abord les axons de la MMCm sont attirés par le FGF émanant du dermamyotome (point de choix n°1). Puis les axons des LMC se ségréguent pour innervent les muscles du membre dorsal ou ventral et ce grâce à la présence d'ephrines sélectivement répulsives (point de choix n°2). Enfin, les axons moteurs se regroupent selon le pool auquel ils appartiennent pour aller innervent un muscle spécifique (choix n°3). D'après Bonanomi et al., 2010.

Une fois que les tracts moteurs ont été guidés jusque dans le sclérotome, d'autres molécules de guidage prennent le relais afin de ségréger spécifiquement la branche motrice dorsale des branches ventrales. Ce point de ségrégation peut être considéré comme un premier point de choix pour les motoneurones, qui doivent ainsi sélectionner soit une trajectoire d'innervation dorsale, soit un cheminement vers des cibles ventrales (Fig. 8).

Deux études complémentaires ont révélé le lien entre l'identité des motoneurones de la MMCm et leur guidage spécifique vers des cibles musculaires épaxiales. Comme il a été décrit précédemment, la sous-colonne MMCm est caractérisée par l'expression de deux facteurs LIM : Lhx3/4 et *isl1*. Sharma et collaborateurs ont analysé la lignée murine *Lhx3^{Kl}*, qui permet d'attribuer de manière ectopique une identité Lhx3 à tous les motoneurones. Les auteurs ont alors observé une innervation prépondérante des muscles dorsaux épaxiaux de l'embryon par une grande majorité des motoneurones (Sharma et al., 2000) (Fig. 9). Une seconde étude a montré que l'invalidation conditionnelle d'*isl1* dans les neurones chez la souris entraîne une absence d'innervation des muscles dorsaux des embryons. Les auteurs ont donc montré que l'identité *isl1⁺* de la sous-colonne MMCm confère un patron de projection spécifique à ses axones (Liang et al., 2011). Ainsi, ces deux études ont mis en évidence le lien qui existe entre l'identité des motoneurones et la capacité de ces derniers à établir un patron de projection qui leur est propre.

En complément de ces résultats, les expériences pionnières de Tosney ont montré que l'ablation expérimentale du dermamyotome dans l'embryon de poulet conduit à une absence de projection dorsale de la branche des MMCm, ou bien à une projection sur le dermamyotome adjacent à la zone d'ablation (K W Tosney, 1987). Ces expériences ont ainsi révélé la présence, dans le dermamyotome, de molécules de guidage des motoneurones, et donc spécifiques au guidage de la MMCm au regard des expériences de modification d'identité citées ci-dessus. Depuis, plusieurs molécules ont été identifiées.

Tout d'abord, il a été montré que le dermamyotome exprime un chémoattractant, le Fibroblast Growth Factor (FGF), notamment FGF8 et que les motoneurones de la MMCm expriment le récepteur de type 1 aux FGF, FGFR1. Or les souris dans lesquelles le récepteur FGFR1 a été supprimé de la lignée neuronale

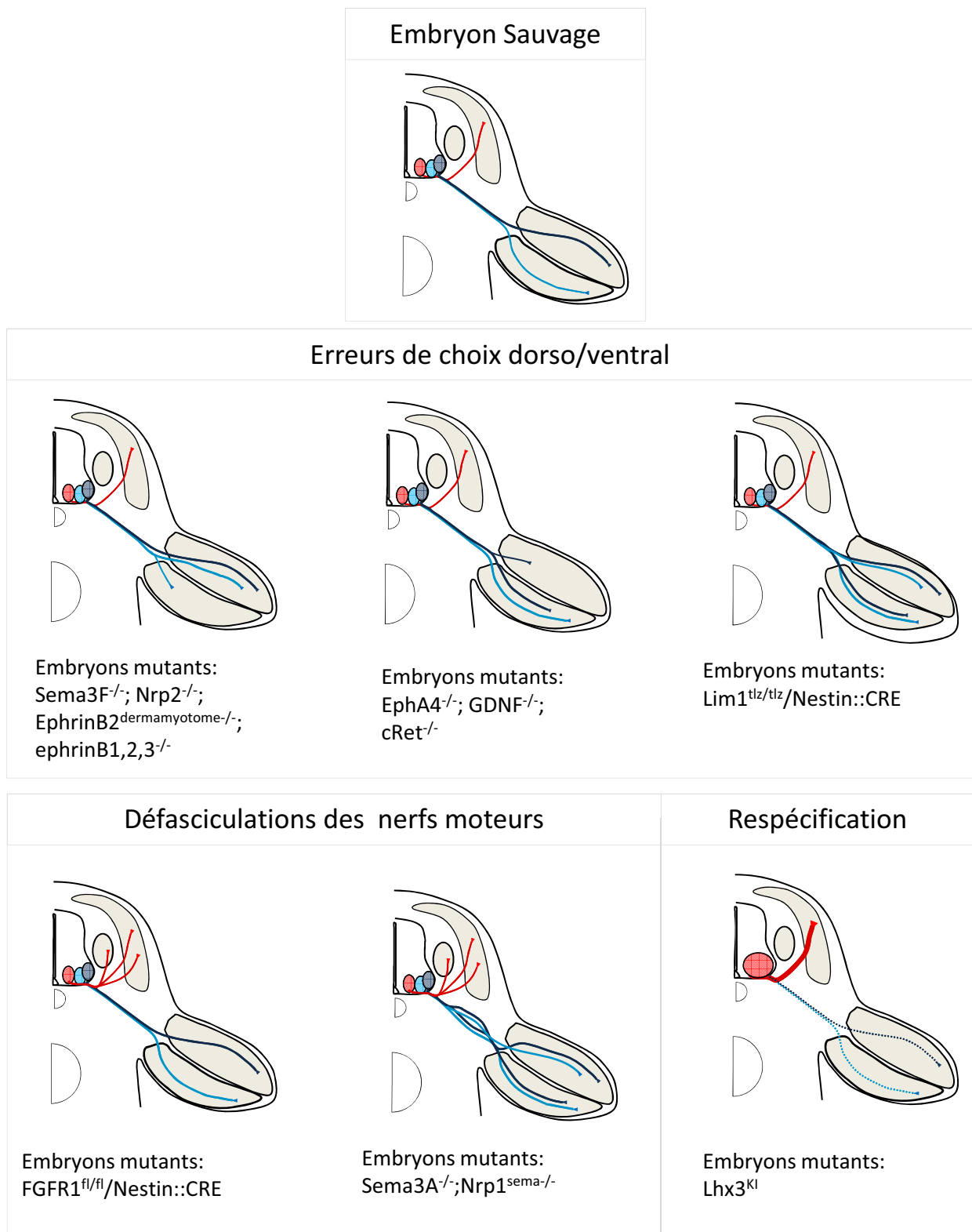


Figure 9: Récapitulatif des défauts observés chez les principaux modèles de souris mutantes de guidage des axones moteurs. Plusieurs catégories de défauts ont été répertoriées. Tout d'abord, les erreurs de choix dorso/ventral regroupent les mutants pour lesquels le ciblage spécifique de la région dorsale ou ventrale du membre est altérée voire randomisée. Ensuite, il est possible de regrouper les mutants pour lesquels des défauts importants de défasciculation des nerfs moteurs ont été décrits. Enfin, la respécification des motoneurones a permis de décrire l'innervation d'une nouvelle cible par les motoneurones, faisant alors le lien entre identité des motoneurones et identité de la cible à innover. D'après Bonanomi et al., 2010.

(FGFR1^{fl/fl}/nestin::CRE /Hb9::GFP) présentent des défauts d'innervation des muscles épaxiaux dorsaux avec notamment beaucoup d'erreur de guidage commises par les motoneurones de la MMCm (Shirasaki et al., 2006) (Fig. 9). Des tests *in vitro* complémentaires ont également révélé que le FGF8 appliqué sur des explants de motoneurones promeut sélectivement la croissance des axones de la MMCm, marquée par l'expression de GFP. Ainsi, les motoneurones de la MMCm se dirigent vers le dermamyotome en partie grâce à l'action chémoattractive du FGF8. Cette attraction sélective de la MMCm est notamment imputable à son identité Lhx3⁺. En effet, lorsque des motoneurones, LMC ou MMCm, issus de la lignée Lhx3^{KI} (pour laquelle tous les motoneurones expriment le facteur Lhx3), sont mis en culture *in vitro*, ils sont presque tous attirés par une source de FGF8 et présentent majoritairement une expression du récepteur FGFR1 (Shirasaki et al., 2006). Ces résultats suggèrent que l'acquisition d'une identité Lhx3⁺ ectopique par les motoneurones de la LMC leur a permis d'exprimer un récepteur au FGF et ainsi les a rendu sensibles au guidage par ce chémoattractant. Alors, l'identité Lhx3⁺ de la colonne MMCm lui permet une expression spécifique du récepteur au chémoattractant du dermamyotome.

Enfin, il a été montré une expression tardive du récepteur EphA4 par les axones moteurs de la MMCm participant à la formation des racines spinales. Cette expression du récepteur aux Ephrines leur permettrait de répondre au signal EphrineA5 présent dans la moitié rostrale de chaque segment de sclérotome pour y être confiné (Eberhart et al., 2004). En effet, l'expression précoce du récepteur EphA4 dans les motoneurones de la MMCm conduit à l'invasion ectopique de territoires EphrineA5⁺, tel que le DRG par ces axones moteurs. De manière originale, le guidage des motoneurones de la MMCm par le système EphA/EphrineA semble donc ici se faire de façon positive, par attraction. Cependant, le rôle exact de ce guidage EphA/EphrineA sur la MMCm n'est pas totalement compris puisqu'il participerait également à la fasciculation du tract nerveux à la manière d'une molécule répulsive (Eberhart et al., 2004). Cette ambivalence d'action des Ephrines sur les axones moteurs illustre le large potentiel de réponse de guidage suscité par un répertoire limité de molécules. Cette concomitance entre un nombre de signaux de guidage restreint et un grand nombre d'axones à diriger peut ainsi se faire

notamment par l'usage réitéré des mêmes molécules dans des contextes spatio-temporels différents.

Ainsi, l'identité de la colonne MMCm lui permet d'acquérir une capacité de réponse à des facteurs de guidage spécifiques dans le temps et l'espace, qui contribuent alors à la ségrégation de la branche motrice dorsale du reste des nerfs spinaux, peu de temps après la sortie de la moelle épinière.

- e. Le plexus, structure de rapprochement des axones moteurs avant l'invasion du membre.

Si peu de choses sont connues sur le guidage des branches motrices innervant les muscles hypaxiaux ventraux et les ganglions sympathiques, il a été montré qu'au niveau brachial, les axones moteurs de la colonne LMC, issus de plusieurs racines ventrales cervicales et brachiales, se regroupent, à l'entrée du membre, en un plexus.

Au sein de ce plexus, les axones de la LMC subissent une réorganisation et un rapprochement grâce à une régulation fine des molécules d'adhérence telles que PSA-NCAM ou L1. Cette modulation de la fasciculation des axones entre eux pourrait, par exemple, contribuer à leur guidage en leur permettant un accès aux molécules de guidage présentes dans le membre (Tang et al., 1994, 1994; Allan et Greer, 1998). On peut aussi envisager que cette étape de réorganisation permette aux axones provenant de régions différentes de la moelle épinière, mais destinés à innerver une même cible, de s'apparier avant de procéder à une innervation groupée du muscle. Si le rôle de ce tri des axones de la LMC n'est pas encore totalement compris, il apparaît cependant comme une étape clé pour les motoneurones avant d'envahir sélectivement le membre dorsal ou ventral. En effet, il a été montré que l'augmentation de la fasciculation, qui suit la délétion de PSA-NCAM dans le membre par injection d'une endoneuraminidase (endo-N), conduit à des défauts de guidage des axones moteurs dans le membre (Tang et al., 1994).

- f. Un second point de choix assure la séparation des branches motrices de la LMC dans le territoire dorsal et ventral du membre.

Les deux identités de sous-colonnes spécifiées au sein de la LMC permettent aux deux branches motrices qui envahissent le membre d'innervier sélectivement le mésenchyme dorsal ou ventral selon le code de molécules de guidage qui s'y trouve respectivement. Ainsi les motoneurones de la sous-colonne LMCm innervent le membre ventral, alors que ceux de la sous-colonne LMCI innervent le membre dorsal (Fig. 8). Des expériences de rotation chirurgicale ou des délétions altérant le patron dorso-ventral du membre conduisent à des changements compensatoires dans les patrons de projections des motoneurones des LMCm et LMCI (Artur Kania et Thomas M Jessell, 2003; Luria et Laufer, 2007; Luria et al., 2008). Ces expériences révèlent la présence de molécules de guidage spécifiques à chaque branche motrice dans le membre.

A ce jour, les molécules de guidages identifiées dans le membre ont été décrites selon l'organisation dorso-ventrale suivante : le mésenchyme dorsal exprime globalement les ligands ephrine-B2 et Sema3F mais aussi du GDNF dans sa partie proximale, et le mésenchyme ventral exprime le ligand EphrineA5 (Fig. 8). Ainsi, les nerfs dorsaux et ventraux sont confrontés à différentes molécules de guidage pour assurer leur ségrégation.

Les axones de la sous-colonne des LMCI expriment le récepteur cRet au GDNF et seraient ainsi attirés par le mésenchyme dorsal. En effet, les souris pour lesquelles soit GDNF, soit son récepteur cRet sont invalidés présentent une innervation ventrale au lieu de dorsale des axones de la LMCI (Kramer et al., 2006; Dudanova et al., 2010). Simultanément, l'expression sélective du récepteur EphA4 par les axones de la LMCI les empêche d'envahir le membre ventral qui exprime le répulsif ephrineA5. Là encore, les souris pour lesquelles l'expression du récepteur EphA4 a été invalidée présentent des défauts d'innervation ventrale des axones de la LMCI (Artur Kania et Thomas M Jessell, 2003) (Fig. 9). Similairement à ce qui a été montré pour l'expression spécifique de FGFR1 par les axones de la MMCm, l'expression spécifique d'EphA4 par les axones de la LMCI est directement liée à leur identité $Lim1^+/Isl1^+$. En effet, des expériences de gain de fonction chez le poulet ont montré que l'expression ectopique de Lim1 et/ou Isl1 dans les LMC conduit à une

augmentation de la population EphA4⁺ au sein des motoneurones et à un enrichissement de l'innervation dorsale du membre par les LMC. A l'inverse, la perte de l'expression de Lim1 par les motoneurones dans les mutants Lim1^{tlz/tlz}/Nestin::CRE conduit à une diminution de la population de motoneurones EphA4⁺ et à une randomisation du patron de projection dorso-ventrale (A Kania et al., 2000; Artur Kania et Thomas M Jessell, 2003) (Fig. 9). Ces travaux montrent donc l'existence d'un lien direct entre l'identité des motoneurones et l'expression de récepteurs de guidage spécifiques.

Les axones de la sous-colonne LMCm quant à eux expriment spécifiquement les récepteurs EphB1 et Neuropilin2 (Nrp2). Ainsi, ces axones sont contraints d'innover le mésenchyme ventral puisqu'ils sont exclus du mésenchyme dorsal qui exprime les ligands répulsifs ephrineB2 et Sema3F (A. B. Huber et al., 2005; Luria et al., 2008) (Fig. 8). La souris triple mutante pour les récepteurs EphB, EphB1^{-/-}/EphB2^{-/-}/EphB3^{-/-}, présente en effet une projection des axones de la LMCm dans la partie dorsale du membre puisqu'ils ne sont alors plus sensibles au répulsif ephrineB2 (Luria et al., 2008) (Fig. 9). Les souris Nrp2^{-/-} et Sema3F^{-/-} phénotypent ce phénotype (A. B. Huber et al., 2005) (Fig. 9). Dans ce cas encore, l'identité des motoneurones de la sous-colonne LMCm, isl1⁺, a été directement impliquée dans leur expression du récepteur EphB1 par des expériences de gain de fonction chez l'embryon de poulet (Luria et al., 2008). Cependant l'expression ectopique de isl1 seul par les motoneurones de la LMCI ne suffit pas à les rediriger vers le mésenchyme ventral, montrant ainsi l'importante force de répulsion du ligand ventral ephrineA5 et le processus complexe d'intégration de l'ensemble des signaux de guidage qui sont effectués au niveau du cône de croissance de chaque axone moteur (Luria et al., 2008).

Parallèlement à cette ségrégation des nerfs dorsaux et ventraux, les axones de la LMC se fasciculent entre eux puis se ségrégent pour aller innover un muscle spécifique. Une étude a proposé que l'expression du récepteur Nrp1 par les axones moteurs de la LMC participe à cette fasciculation grâce à la répulsion du ligand Sema3A présent dans le membre. En effet, l'inactivation du récepteur Nrp1 dans la signalisation Sémaphorine, Nrp1^{Sema^{-/-}}, conduit à une défasciculation des nerfs dorsaux et ventraux dans le membre (A. B. Huber et al., 2005) (Fig. 9).

Les signalisations GDNF, Ephrines et Sémaphorines coopèrent ainsi dans le membre pour ségréger de manière stéréotypée les motoneurones selon leur identité et donc le panel de récepteurs qu'ils expriment. Dès leur entrée dans le membre, les motoneurones de la LMC sont donc confrontés à un nouveau choix qui leur permet d'établir le patron de projection pour lequel ils ont été spécifiés (Fig. 8). Cependant, au sein de chaque nerf ventral et dorsal, les axones moteurs doivent effectuer un choix final afin de se diriger précisément sur le muscle que leur identité de pool leur dicte d'innervier.

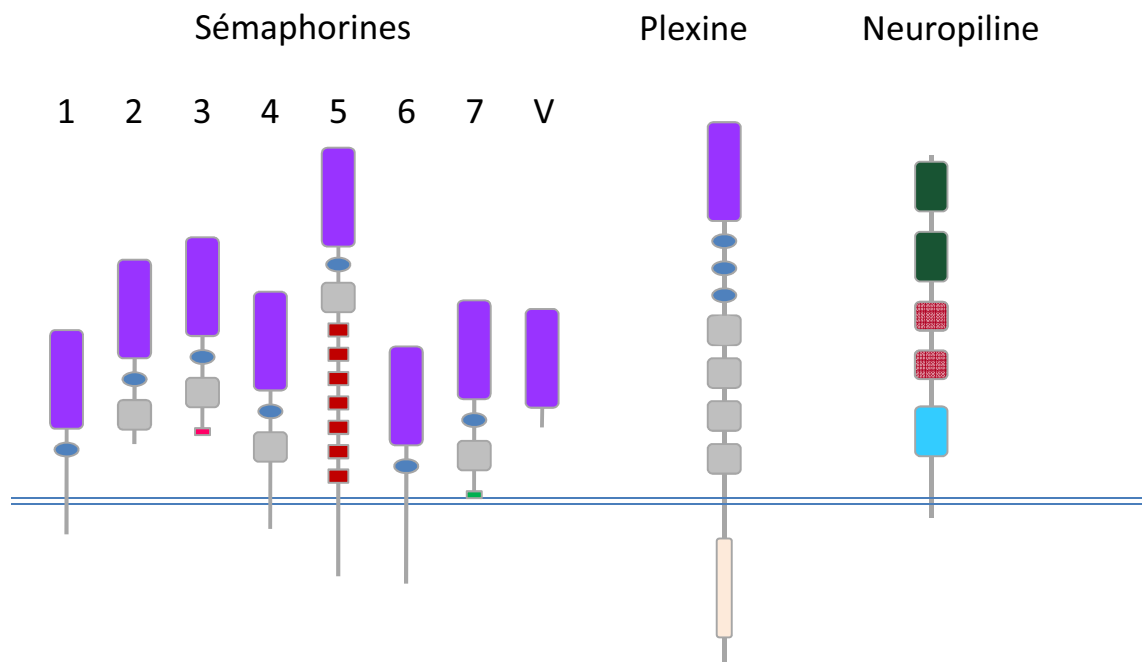
- g. Un dernier point de choix permet la ségrégation des nerfs pour l'innervation spécifique de chaque muscle du membre.

Peu de choses ont été décrites concernant les mécanismes de guidage permettant de ségréger les motoneurones appartenant à un même pool et donc innervant un même muscle. En effet, à notre connaissance, les seuls exemples décrits à ce jour concernent l'innervation du muscle scapulothoracalis postérieur (Sca) et du muscle Flexor Carpi Ulnaris (FCU) par le pool de motoneurones exprimant respectivement les facteurs cHox5 et cHox8 en combinaison spécifique avec d'autres facteurs Hox, et l'innervation des muscles du groupe Adducteur, du muscle Gracilis postérieur et du Tibialis antérieur par le pool de motoneurones exprimant le facteur Nkx6.1 (Dasen et al., 2005; N. V. De Marco Garcia et Thomas M. Jessell, 2008). Ainsi, par des expériences de gain et de perte de fonction des gènes cHox5 et 8, Dasen et collaborateurs (2005) ont montré que les pools de motoneurones alors respécifiés n'innervaient plus les mêmes muscles (Dasen et al., 2005). De même, De Marco Garcia et collaborateurs ont montré que chez le mutant Nkx6.1^{-/-}, les motoneurones qui avaient perdu leur spécification par le facteur Nkx6.1 n'innervent plus le même groupe de muscles (N. V. De Marco Garcia et Thomas M. Jessell, 2008).

Il est cependant intéressant de noter que l'expression de ces facteurs d'identité spécifiques des pools commence dès la sortie des neurones de leur cycle cellulaire, soit E9.5 pour les premiers motoneurones chez la souris. Pourtant, le guidage spécifique des axones des différents pools de motoneurones, ou même le regroupement des pools en clusters cohérents n'a lieu que plus tardivement, vers

E12.5/E13.5. Ainsi, on peut se demander si les facteurs d'identité de pools mis en évidence jusqu'ici ont d'autres fonctions pendant l'intervalle qui sépare le démarrage de leur expression de la mise en place des caractéristiques distinctives de ces identités. Cette observation permet également de mettre en évidence le caractère crucial de la dynamique d'expression des molécules de guidage afin de réguler les différentes étapes d'innervation par les axones moteurs.

Finalement, si les manipulations des identités ont mis en évidence le rôle de la spécification des pools de motoneurones dans l'établissement précis de leur patron de projection, aucune molécule n'a pour l'instant été impliquée dans cette échelle de guidage. De plus, aucun élément n'a été apporté pour expliquer la topographie stéréotypée des patrons de projections entre les individus. Enfin, les patrons d'expression des molécules de guidage connues à ce jour dans le membre ne montrent pas un degré de raffinement suffisant pour expliquer un guidage aussi fin et spécifique. Ainsi, il est possible que la finesse de guidage muscle-spécifique ne provienne pas uniquement du code de molécules présentes dans le membre, mais également de la lecture spécifique qu'en fait chaque pool de motoneurones. Parmi les molécules exprimées par les motoneurones eux-mêmes et qui pourraient contribuer à leur lecture spécifique du code de guidage qui les entoure, mon équipe de recherche a proposé un rôle des Sémaphorines motoneuronales.



Légende:











- | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
|  | Domaine Sema |  | Domaine Plexine |
|  | Domaine riche en cystéine (PSI) |  | Domaine CUB |
|  | Domaine Immunoglobuline |  | Domaine FA58C |
|  | Domaine Thrombospondine |  | Domaine MAM |
|  | Domaine Basique | | |
|  | Ancre GPI | | |

Figure 10: La famille des Sémaphorines et leur récepteurs. Les membres de la famille des Sémaphorines se distinguent par la présence d'un domaine Sema, également retrouvé dans leur co-récepteur, Plexine. La sous famille des Sema3 regroupe les Sémaphorines secrétées chez les vertébrés, et se fixent en général sur un membre de la famille des neuropilines, le partenaire Plexine du complexe récepteur servant alors de co-récepteur de transduction du signal. D'après Gherardi et al., 2004; Dickson et al., 2002.

III Les Sémaphorines : candidats potentiels pour le guidage stéréotypé des nerfs moteurs dans le membre

1) Les Sémaphorines participent au guidage du cône de croissance des axones

a. Présentation de la famille des Sémaphorines

- Généralités

Les Sémaphorines sont une famille de protéines transmembranaires ou secrétées très conservées au cours de l'évolution et regroupées en différentes classes selon leurs relations phylogénétiques et leurs similarités de motifs (Zhigang He et al., 2002). On distingue huit classes de Sémaphorines : les classes 3 à 7 chez les vertébrés, les classes 1 et 2 chez les invertébrés et la classe V chez les virus (Fig. 10). Chez les vertébrés, les Sémaphorines secrétées sont regroupées dans la classe 3, les Sema à ancrage GPI sont représentées par la classe 7 et les autres classes 4, 5 et 6 comprennent des Sema transmembranaires. Si les différents membres de la famille présentent une grande variabilité de séquences, ils partagent cependant tous la présence d'un motif de 500 acides aminés, très conservé et essentiel à la médiation des effets des protéines. Il s'agit du domaine Sema, à l'extrémité amine des protéines (Yazdani et Terman, 2006). Un autre domaine commun à toutes les Sema (sauf quelques Sémaphorines virales) a été caractérisé, il s'agit d'un domaine Plexine-Sémaphorine-Intégrine (PSI). Ce domaine PSI, adjacent au domaine Sema du côté C-Terminal, est riche en cystéines permettant la formation de ponts disulfures et de structures secondaires stables importantes pour l'interaction avec les récepteurs (Kozlov et al., 2004). Enfin, d'autres domaines ou motifs ont été décrits dans des Sema comme un domaine Immunoglobuline-Like (Ig) pour les Sema de classe 3, un domaine basique, et un domaine de sept répétitions thrombospondines pour les Sema de classe 5. Ces domaines participent à certaines fonctions des Sémaphorines, comme par exemple la potentialisation des effets du domaine Sema par les domaines PSI et basique pour le collapse du cône de croissance par Sema3A chez le poulet (Koppel et al., 1997) (Fig. 10).

- Les Sémaphorines de classe 3

Parmi tous les membres présents chez les vertébrés, on distingue les Sema de classe 3, qui regroupe les Sema secrétées. Elles sont constituées d'un domaine Sema, un domaine PSI, un domaine Ig et un domaine basique (Fig. 10). Synthétisées sous la forme de précurseurs protéiques, les pro-Sémaphorines, subissent des clivages protéolytiques qui jouent notamment un rôle dans la force de répulsion de leur forme mature (Ralf H. Adams et al., 1997; Varshavsky et al., 2008).

Chez les vertébrés, les premières Sémaphorines mises en évidence ont été les Sema3. En effet, des travaux de Luo et collaborateurs en 1993 ont révélé l'existence d'un facteur collapsant pour le cône de croissance des neurones de DRG, appelé alors collapsin1, et rebaptisé par la suite Sema3A (Luo et al., 1993). Cette étude a également révélé le caractère secrété de cette Sema 3 puisque les auteurs ont été capables de produire des milieux conditionnés à partir de transfection de leur ADNc dans des cellules COS (Luo et al., 1993). Dans l'organisme en développement, de nombreuses sources de Sema3 ont été décrites, par exemple des zones du mésenchyme. Cependant, si l'ARN de ces Sema3 a été détecté, l'absence d'anticorps dirigés contre cette classe de Sémaphorine n'a pas encore permis de localiser la portée exacte des gradients de protéines issus de ces sources environnementales. En effet, si les Sema3 sont des ligands secrétés et diffusibles, la portée de leur diffusion reste difficile à évaluer compte tenu de la présence d'un domaine basique qui leur permettrait d'interagir avec la matrice extra-cellulaire (Luo et al., 1993). De même une récente étude a montré que les neurones exprimant eux-mêmes les Sema3 et leurs récepteurs peuvent lier directement les Sema3 qu'ils sécrètent (de Wit et al., 2009). En effet, de Wit et collaborateurs ont eu recours à la protéine fusion Sema3A::pHluorin (Sema3A-SpH) qui a permis de fusionner la Sema3A de rat à la superecliptic pHluorin, une protéine GFP dont la fluorescence dépend du pH. Ainsi, lorsque le pH est neutre, c'est-à-dire au niveau de la membrane plasmique, la GFP peut fluorescer, permettant ainsi de suivre le devenir de Sema3A dans le compartiment extracellulaire, *in vitro*. Les auteurs ont alors montré que si Sema3A est secrétée par les neurones, sa production a un rayon d'action très limité puisque la protéine se lie préférentiellement sur la matrice extracellulaire des neurones producteurs ou adjacents (de Wit et al., 2009). Cependant, la plupart des sources de Sema3 sont non neuronales et n'expriment pas les récepteurs à ces

ligands, assurant alors très probablement leur diffusion dans l'environnement et leur disponibilité pour des événements de guidage.

Enfin il est important de noter que l'expression des Sema3 est très dynamique au cours du développement. Ces ligands peuvent alors constituer des sources de guidages localisées dans le temps et dans l'espace pour fournir un signal restreint à une population de cellules spécifique. Par exemple, les travaux de Niquille et collaborateurs ont mis en évidence l'expression de Sema3C par une population transitoire de cellules gliales en migration dans la ligne médiane du cerveau. Or cette expression transitoire de Sema3C participe à l'attraction des axones corticaux qui forment le corps calleux (Niquille et al., 2009). Dans le système neuronal, la dynamique d'expression des Sema3 et leur disponibilité sous forme de gradient permettent donc notamment de fournir un signal très localisé sur le cône de croissance, et ainsi d'assurer un guidage spécifique de populations neuronales restreintes (Buck et Zheng, 2002).

Par ailleurs, une autre caractéristique de ces Sema est leur capacité à former des dimères. En effet, il a été montré qu'une cystéine très conservée dans les Sema3, située entre le domaine Ig et le domaine basique, en position 723, permettent la dimérisation des Sema3 et participerait ainsi à leurs capacités répulsives. La mutation de cette Cys⁷²³ par Klostermann et collaborateurs conduit en effet à une très forte diminution de l'effet répulsif de Sema3A sur des neurones sympathiques lors d'expériences de co-cultures (A Klostermann et al., 1998). Les auteurs ont alors corrélé la perte de la capacité de dimérisation avec cette perte d'activité répulsive. Les auteurs ont proposé que la dimérisation joue un rôle dans le processing des précurseurs de Sema, à l'origine de l'activation des protéines. Cependant, le rôle de ces dimères de Sema3 n'est pas encore totalement compris puisque le monomère Sema3A conserve tout de même une certaine capacité de répulsion (A Klostermann et al., 1998). Par ailleurs, on peut également se demander si cette dimérisation des ligands a des conséquences sur l'organisation de leurs complexes récepteurs.

b. Les complexes récepteurs des Sema

Les Sémaphorines se lient à des protéines transmembranaires sur lesquelles elles se fixent par leur domaine Sema extracellulaire. Les Sémaphorines se fixent directement sur les membres de la famille des Plexines (Plx), excepté les Sema2 et les Sema3s. Cette famille de quatre catégories de récepteurs transmembranaires, nommées de A à D, se caractérise elle aussi par la présence d'un domaine Sema par lequel ses membres interagissent avec les Sémaphorines (L Tamagnone, Artigiani, et al., 1999; Gherardi et al., 2004) (Fig. 10). Ces récepteurs sont capables d'activer directement des signalisations intracellulaires comme la voie des Rho GTPases, afin de promouvoir une réorganisation du cytosquelette d'actine (Vikis et al., 2000).

Cependant, si presque toutes les Sema sont capables de se lier aux Plexines, il ne s'agit pas du récepteur direct des Sema3. En effet, il a été montré que les récepteurs directs de cette classe de Sémaphorines sont les membres de la famille Neuropiline, Nrp1 et Nrp2 (Zhigang He et al., 2002; A L Kolodkin et al., 1997; H Chen et al., 1998) (Fig. 10). Plusieurs études ont étudié en détail l'affinité des différentes Sema3 pour Nrp1 et/ou Nrp2. Ainsi, les travaux de Takahashi et collaborateurs ont montré que Sema3A interagit avec Nrp1, tandis que Sema3B et Sema3C interagissent avec Nrp1 et Nrp2 (Takuya Takahashi et al., 1998). L'étude de Chen et collaborateurs en 1998 a également montré que Sema3F interagit avec Nrp2 (H Chen et al., 1998). Ces résultats soulignent qu'une compétition de liaison aux récepteurs Neuropiline peut exister entre ces différentes Sema3. Par ailleurs, la liaison d'une Sema à une Neuropiline ne provoque pas toujours une réponse. Des résultats complémentaires ont en effet montré que les neurones de DRG, qui expriment uniquement le récepteur Nrp1, collapsent suite à un traitement par Sema3A mais pas suite à une application de Sema3C ou Sema3B. Ainsi, l'activité de guidage de Sema3A dépend de Nrp1 mais pas celle de Sema3C ou Sema3B, qui dépend ici de Nrp2. Cependant, l'application de Sema3B ou Sema3C sur des neurones de DRG conduit à une forte baisse de la capacité de collapse induite par un traitement de Sema3A, sûrement imputable à une compétition de liaison à Nrp1 (Takuya Takahashi et al., 1998). Cet antagonisme de Sema3B et Sema3C sur le récepteur de Sema3A suggère une modulation croisée de réponse aux différentes Sema3 par une compétition directe pour la fixation sur un même récepteur.

Par ailleurs, l'étude de la structure des récepteurs Neuropiline a montré que les ligands Sema interagissent avec le domaine CUB de ces récepteurs (Complement Binding domain) (F Nakamura et al., 1998) (Fig. 10). Cependant, ces récepteurs ne sont pas capables de transduire le signal au cytoplasme. En effet, des cellules ganglionnaires de rétine exprimant des chimères de Nrp ne contenant plus de domaine cytoplasmique sont toujours capables d'avoir une réponse de collapse suite à un traitement par Sema3A (F Nakamura et al., 1998). La transduction du signal Sémaphorine passe donc par un partenaire du récepteur Nrp, un membre de la famille des Plexines, alors qualifié de co-récepteur (Yazdani et Terman, 2006; H Chen et al., 1998). Ainsi, les récepteurs aux Sema se présentent sous la forme de regroupements de protéines transmembranaires spécialisées formant de véritables complexes récepteurs. Pour certaines Sémaphorines, d'autres partenaires de ces complexes ont d'ailleurs été identifiés. Ainsi l'étude de la lignée de souris mutante pour le facteur d'adhésion L1 a révélé la nécessité de ce partenaire aux côtés de Nrp1 pour former un complexe récepteur au répulsif Sema3A dans les neurones corticaux (V Castellani et al., 2000; Bechara et al., 2008). De même, une étude récente a montré que l'association du récepteur au VEGF, VEGFR2, au complexe-récepteur PlexineD1-Nrp1 de Sema3E permettait l'élongation axonale des neurones du subiculum. En effet, la perte de VEGFR2 dans les cellules neuronales, obtenue par le croisement des souris $VGFR2^{lox/-}$ et Nestin-Cre, compromet la pousse des neurones du subiculum (Bellon et al., 2010). D'autres études complémentaires ont également montré l'importance des partenaires NrCam et Otk aux côtés des Plexines et des Neuropilines dans les complexes récepteurs respectifs de Sema3B/3F et Sema3A (Falk et al., 2005; Margaret L. Winberg et al., 2001). L'ensemble de ces résultats montre la grande diversité des complexes récepteurs aux Sema3 avec cependant la présence inéluctable d'un « noyau » Neuropiline/Plexine, pour la liaison du ligand et la transduction du signal.

Enfin, il est intéressant de noter que la diversité des membres de la famille Sema3 ne correspond pas à la diversité des partenaires Plexine ou Neuropiline. En effet, plusieurs Sémaphorines sont capables de se lier aux mêmes partenaires Nrp. Les autres partenaires du complexe, comme les Plexines pour les Sema3, peuvent alors être les mêmes ou non. Par exemple, La transduction du signal de Sema3A et Sema3F est assurée par la même PlixA3 dans les neurones des ganglions

sympathiques qui expriment à la fois Nrp1 et Nrp2 (Cheng et al., 2001; Hang Chen et al., 1997; Kawakami et al., 1996). Ainsi, la réponse d'une cellule aux différents signaux Sema qu'elle rencontre dépend de son répertoire d'expression de Nrp et Plex ce qui lui assure de nombreuses possibilités de guidage au cours du développement malgré un éventail de récepteurs limité. L'homogénéité des partenaires de signalisation exprimés au sein d'une même population assure cependant une réponse cohérente de l'ensemble de ses cellules exposées à un même signal Sema. Les Sémaphorines ont alors une capacité de guidage sur un grand nombre de populations cellulaires spécifiques dont les motoneurones.

2) Sémaphorines et guidage des motoneurones : rôles potentiels des modulations de réponse

Les Sémaphorines ont été impliquées dans diverses fonctions au cours du développement, comme par exemple la répulsion/attraction des axones, leur fasciculation, la migration cellulaire, la viabilité des cellules et leur prolifération (Yazdani et Terman, 2006). Dans le système nerveux, elles ont été particulièrement étudiées pour leur rôle de guidage des axones, comme le rappelle le terme même de Sémaphorine, dérivé du mot « Sémaphore » qui désigne un système de signalisation permettant d'apporter des informations de position. Ce rôle de guidage a notamment été mis en évidence lors de la mise en place des circuits sensori-moteurs. Nous nous concentrerons par la suite sur leur rôle dans le guidage de la branche motrice de tels circuits.

a. Sema et motoneurones

- *Les Sémaphorines et leurs récepteurs dans les circuits moteurs*

L'expression de différentes Sémaphorines et de leurs récepteurs a été décrite dans les branches motrices de certains circuits neuronaux et dans leur environnement proche. Plusieurs études, dont celle réalisée par Cohen et collaborateurs, ont montré que les motoneurones expriment les sous-unités des complexes récepteurs des Sema3 participant à la liaison du ligand, les Neuropilines,

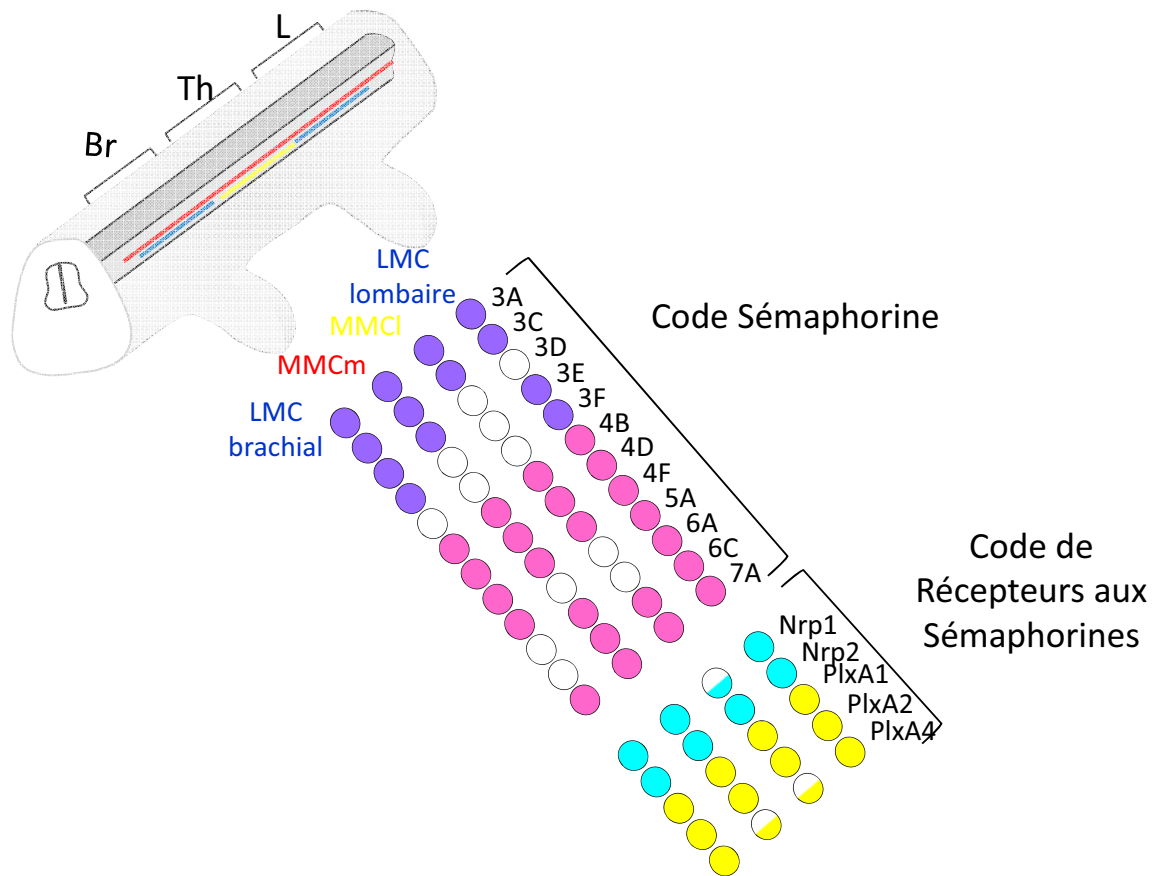


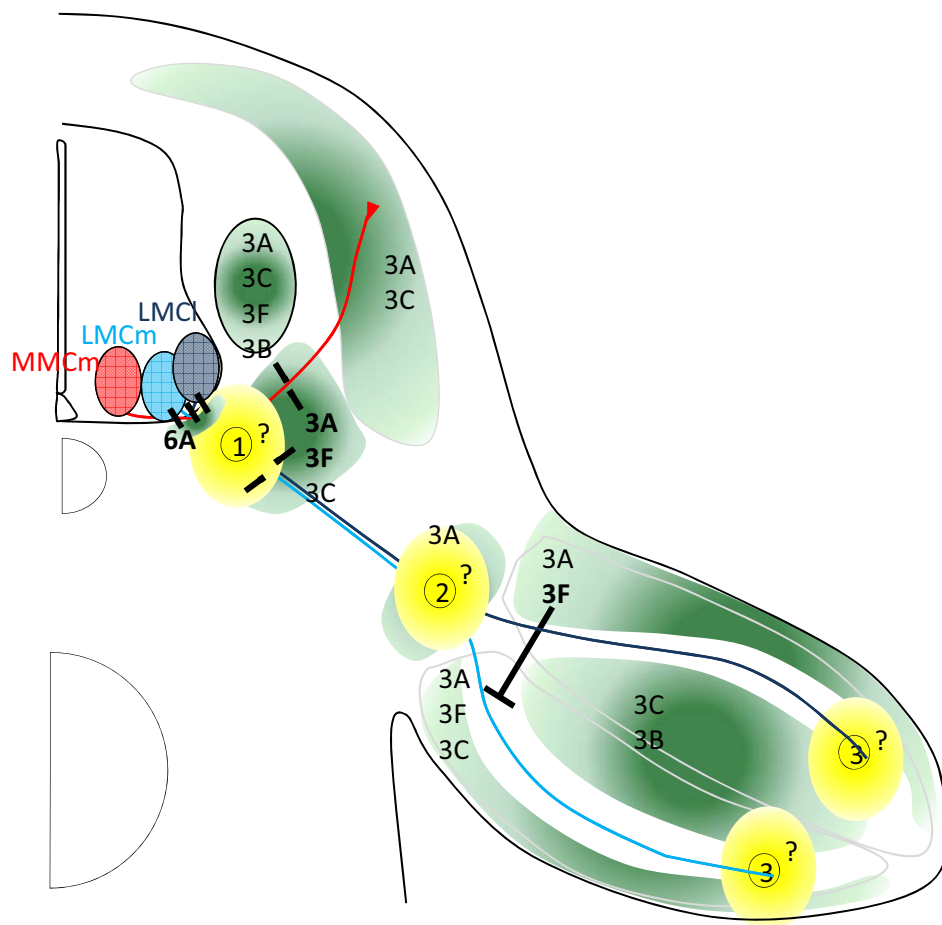
Figure 11: Schématisation du code Sémaphorine et des membres de son complexe récepteur dans les motoneurones. Chaque sous-colonne de motoneurones exprime une combinaison spécifique de Sémaphorines et de leurs récepteurs et co-récepteurs. Cette expression mosaïque des différentes Sema permet de définir un code dont les fonctions ne sont pas encore bien comprises. LMC: Lateral Motor Column; MMCm: medial Medial Motor Column; MMCl: lateral Medial Motor Column. Br: région brachiale; Th: région Thoracique; L: région Lombaire. D'après Cohen et al., 2005.

et à la transduction du signal, les Plexines. En effet, les motoneurones expriment des combinaisons de Nrp1 et/ou Nrp2 avec des membres de la famille des Plexines, notamment PlxA1, A3 et A4 (S. Cohen et al., 2005; Mauti et al.; Palaisa et Granato, 2007) (Fig. 11). Par ailleurs, l'expression de certaines Sémaphorines a été décrite dans l'environnement direct des axones moteurs, comme par exemple Sema3A dans le dermamyotome et le membre, Sema3F dans le membre, Sema6A dans les cellules situées aux points de sortie des axones de la moelle épinière (Boundary Cap Cells) (M Taniguchi et al., 1997; Moret et al., 2007; A. B. Huber et al., 2005; Mauti et al., 2007; Bron et al., 2007) (Fig. 12). L'ensemble de ces données d'expression soutiennent l'existence d'une contribution des Sémaphorines de l'environnement dans le guidage spécifique des axones moteurs, qui a d'ailleurs été explorée par plusieurs équipes de recherche.

Enfin, et de manière très intéressante, plusieurs études ont rapporté l'expression de plusieurs types de Sémaphorines par les motoneurones eux-mêmes, par exemple Sema3A, Sema3C, Sema3D, Sema4A, Sema4B, Sema5A, Sema5B, Sema6D (A W Püschel et al., 1995; S. Cohen et al., 2005) (Fig. 11). Cette expression est particulièrement régionalisée dans le temps et dans l'espace. En effet, Cohen et collaborateurs ont décrit l'existence d'un code de Sémaphorines dans les motoneurones, défini par des domaines d'expression de Sema spécifiques à certaines sous-colonnes ou pools après la mise en place des projections motrices (S. Cohen et al., 2005). Ainsi, à E13.5 chez la souris, les LMC expriment tous Sema3A, 3C, 3E, 4B, 4D, 4F, 5A, 7A. Cependant, la LMC située dans la région brachiale exprime en plus, spécifiquement, Sema3D tandis que la LMC située dans la région lombaire exprime spécifiquement, Sema3F, 6A et 6C (S. Cohen et al., 2005) (Fig. 11). Ces résultats suggèrent d'une part que la répartition d'expression des Sémaphorines pourrait être corrélée à l'identité des sous-colonnes et pools de motoneurones et d'autre part que cette expression intrinsèque de Sema par les motoneurones pourrait contribuer, de manière originale, au guidage spécifique des branches motrices.

- *Rôle des Sémaphorines dans les circuits moteurs*

Différents rôles ont été attribués aux Sémaphorines dans les circuits moteurs. Tout d'abord, les Sémaphorines participent au maintien des motoneurones dans la



Légende:

● MMCm: Nrp1⁺

● LMCm: Nrp1⁺, Nrp2⁺

● LMCl: Nrp1⁺

■ Zones d'expression de Sema3

➔ Implication des Sema3 démontrée

? Implication des Sema3 non décrite

① Point de choix pour les axons moteurs

Figure 12: Guidage des axones moteurs par les Sema3 au cours du développement.

Lors de la ségrégation des différentes branches motrices, l'expression de différentes Sémaphorines de classe 3 peut être détectée. Cependant, seuls les rôles de sema3A et 3F dans le sclérotome caudal et celui de Sema3F dans le membre dorsal ont permis d'impliquer à ce jour directement les Sema3 dans le guidage des axones moteurs spinaux. Ainsi, les rôles potentiels des Sema3 dans la ségrégation des axones de la MMCm (point de choix n°1), dans le plexus (point de choix n°2) ou même dans la sélection de la cible musculaire (point de choix n°3) restent encore inconnus à ce jour.

corne ventrale de la moelle épinière. En effet, deux études concomitantes ont montré que grâce à l'expression de *Sema6A* par les Boundary Cap Cells (BCC), cellules bordant notamment le point de sortie des axones moteurs de la moelle épinière, le corps cellulaire des motoneurones est maintenu dans la corne ventrale et seuls les axones moteurs peuvent sortir de la moelle (Bron et al., 2007; Mauti et al., 2007) (Fig. 12). Ainsi, l'étude des embryons pour lesquels l'expression de *Sema6A* a été invalidée, soit par électroporation d'ARN double brin, soit par invalidation génétique chez la souris (lignée *Sema6A*^{-/-}) a mis en évidence la présence ectopique de nombreux motoneurones hors de la corne ventrale de la moelle épinière. Ces deux études ont proposé des mécanismes d'action similaires : les motoneurones exprimant les récepteurs spécifiques à *Sema6A*, *Nrp2* et un membre de la famille *PlexineA*, seraient maintenus dans la moelle épinière par une action répulsive des BCC médiée par la signalisation Sémaphorine. De manière surprenante, les deux études divergent cependant quant au membre de la famille *Plexine* impliqué dans ce mécanisme (Bron et al., 2007; Mauti et al., 2007).

Les Sémaphorines ont également été impliquées dans le guidage des axones moteurs jusqu'à et dans la partie rostrale de chaque segment de sclérotome. Tout d'abord, deux études complémentaires ont montré que l'expression de *PlxA3* par les motoneurones chez le poisson zèbre permet le guidage de leurs axones jusqu'à la partie rostrale de chaque segment de sclérotome (Feldner et al., 2007; Palaisa et Granato, 2007). Ainsi, par injection de morpholinos dirigés contre l'ARN de *PlxA3*, les auteurs ont montré que les motoneurones ne possédant plus le récepteur *PlxA3* sortent tout le long des segments de sclérotome et certains de ces axones commettent des erreurs d'innervation (Feldner et al., 2007). Par ailleurs, comme il a été présenté précédemment, les Sémaphorines *Sema3A* et *Sema3F* ont été impliquées dans le maintien des axones moteurs dans les segments rostraux de sclérotome (Roffers-Agarwal et Gammill, 2009) (cf. II 3) c. Fig. 12). Ainsi, les Sémaphorines et leurs récepteurs participent au guidage des axones moteurs dès leur sortie de la moelle épinière, alors qu'ils amorcent leurs parcours jusqu'à leurs cibles finales.

Au cours de ces parcours, les Sémaphorines participent également à la fasciculation des nerfs moteurs. Ce rôle a été notamment mis en évidence grâce à l'analyse de trois lignées de souris mutantes pour des Sémaphorines ou pour leurs

récepteurs. En effet, l'analyse des défauts des souris *Sema3A^{-/-}*, *Nrp1^{-/-}* et *Nrp2^{-/-}* a révélé une forte défasciculation des nerfs moteurs crâniens et spinaux, voire pour certains axones des erreurs d'innervation de leur cible (M Taniguchi et al., 1997; Takashi Kitsukawa et al., 1997; Roman J Giger et al., 2000; A. B. Huber et al., 2005; Huettl et al., 2011) (Fig. 9). Au-delà de ces défauts, les travaux de Kitsukawa et collaborateurs ont montré que les souris *Nrp1^{-/-}* présentent des défauts de convergence des nerfs spinaux conduisant quasiment à une disparition du plexus, avant l'invasion du membre. En effet, chez ces souris, les nerfs spinaux restent indépendants les uns des autres pour envahir le membre (Takashi Kitsukawa et al., 1997). Une étude complémentaire a également montré que l'inactivation de *Nrp1* dans les motoneurones uniquement, obtenue par croisement des souris *Nrp1^{cond}* et *Olig2^{CRE}* (*Olig2* étant un marqueur précoce générique de tous les motoneurones), conduit à quelques défauts de choix dorso-ventral des axones moteurs dans le membre (Huettl et al., 2011). Cependant, l'étude des souris *Nrp1^{-/-}* n'a pas révélé d'erreur massive de l'ensemble des axones moteurs pour le choix dorso-ventral lors de l'innervation du membre (Takashi Kitsukawa et al., 1997). Ainsi, Huettl et collaborateurs ont proposé que leurs défauts pourraient être une conséquence secondaire de la défasciculation des nerfs moteurs dans le membre et non un problème de choix dorso-ventral par ces derniers. En effet, le manque de cohérence des axones au niveau du plexus pourrait interférer avec le tri sélectif qui y est normalement fait en vue de la ségrégation des nerfs dorsaux et ventraux. Ainsi, quelques axones moteurs pourraient s'apparier avec un faisceau d'axones inadéquat et être contraints d'innover l'hémi-membre inapproprié (Huettl et al., 2011). On peut cependant se demander comment font ces axones « perdus » pour ne pas être redirigés vers la bonne cible par la signalisation ephrine/Eph, dont on sait qu'elle est un acteur majeur du choix dorso-ventral dans le membre. Une hypothèse possible serait de considérer que l'essentiel du processus de guidage ne concernerait que des axones pionniers qui serviraient alors de guide pour la migration d'axones arrivant plus tardivement et ségrégués au préalable au niveau du plexus. Une telle hypothèse a déjà été proposée pour le mécanisme d'innervation concomitant des neurones sensoriels pionniers et des moteurs « suiveurs » lors de l'innervation du membre (L Landmesser et Honig, 1986; Huettl et al., 2011).

Enfin, les Sémaphorines ont été impliquées dans le guidage des axones moteurs au niveau des cibles terminales (Fig. 12). En effet, l'étude des souris *Sema3A^{-/-}*, *Nrp1^{-/-}* et *Nrp1^{olig2^{-/-}}* a révélé des défauts d'innervation du membre lui-même (M Taniguchi et al., 1997; Takashi Kitsukawa et al., 1997; A. B. Huber et al., 2005; Huettl et al., 2011) (Fig. 11). L'étude des souris *Sema3F^{-/-}* et *Nrp2^{-/-}* a également montré des erreurs de choix dorso-ventral des axones moteurs de la sous-colonne LMCm, qui innervent le membre dorsal au lieu du membre ventral (A. B. Huber et al., 2005) (Fig. 9). Ainsi, les auteurs ont proposé un rôle répulsif pour le signal *Sema3F* exprimé par le membre dorsal, qui contribuerait à l'innervation du membre ventral par les axones de la LMCm exprimant le récepteur *Nrp2*. Mais mis à part cette étude, alors que beaucoup de Sémaphorines sont exprimées par le mésenchyme du membre et par les motoneurones eux-mêmes, leur rôle dans le guidage de l'innervation du membre reste étonnamment peu connu (Fig. 12).

En conclusion, la signalisation des Sémaphorines a été directement impliquée à diverses étapes du guidage des motoneurones. Pourtant, d'une manière très générale, on sait que le nombre de signaux de guidage impliqués à ce jour est trop limitée pour permettre la ségrégation fine des axones moteurs et la spécification de chacune de leur trajectoire. Un processus qui semble à même de générer une grande diversité de trajet est la modulation de réponse à un même signal. Différents types de modulations de réponse ont d'ailleurs été mis en évidence. Nous exposerons ici celles concernant la signalisation Sémaphorine.

b. Les modulations de réponse aux Sémaphorines

La notion de modulation de réponse fait référence à un mécanisme indirect de guidage. En théorie, elle implique une interprétation fine des signaux environnementaux grâce à des régulations de sensibilité propres à chaque groupe d'axones. La modulation de réponse permet ainsi la réutilisation des mêmes signaux moléculaires du guidage mais avec une interprétation dépendant du contexte des axones, par exemple selon leur identité. La modulation de réponse permet également une intégration de l'ensemble des signaux environnant chaque axone et donc là encore d'assurer une réponse spécifique au contexte dans lequel chacun se trouve. Ces régulations de réponse des axones, décrites brièvement dans une partie

précédente, peuvent se faire à différents niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel ou par activation de molécules de signalisation spécifiques (cf. II 3 a.). Ces régulations peuvent toucher plusieurs aspects de la capacité de réponse. En effet, les modulations de réponse du cône de croissance peuvent affecter le sens même de la réponse, avec par exemple une conversion de la répulsion en attraction, ou bien la dose seuil nécessaire à l'activation de la réponse. Ainsi, l'acquisition et la perte de réponse à un signal, l'inversion du sens de réponse, permettent par exemple à un axone d'être guidé vers une cible intermédiaire (réponse attractive), de la traverser (perte de réponse) et de la quitter (réponse répulsive) pour aller gagner d'autres cibles (gain de réponse), jusqu'à sa destination finale. La modulation de réponse apparaît donc comme un élément crucial du guidage axonal qui permet d'aiguiller spécifiquement chaque nerf jusqu'à sa destination finale, malgré un répertoire limité de molécules de guidage. Plusieurs mécanismes de modulation de réponse du cône de croissance aux Sémaphorines ont été décrits à ce jour.

- *Modulation de réponse par la régulation de la composition des complexes récepteurs*

Le premier niveau de régulation de la réponse mis en évidence pour les Sémaphorine concerne la composition du complexe récepteur. En effet, la régulation de la présence de certains partenaires dans le complexe récepteur peut contribuer à une modulation spatio-temporelle de la capacité de réponse du cône de croissance. Ainsi, une étude récente réalisée au sein de mon équipe de recherches a montré que le clivage protéolytique par la calpaïne1 du récepteur PlexinA1 dans les axones commissuraux de la moelle épinière empêche ces derniers de répondre au signal Sema3B avant la traversée de la ligne médiane dans la moelle épinière. Lors de leur arrivée au niveau de la plaque du plancher (PP), des signaux locaux diminuent l'activité de la calpaïne1. Les axones commissuraux peuvent alors accumuler le récepteur PlexinA1 pour répondre au signal répulsif Sema3B de la PP et en sortir correctement (Nawabi et al., 2010). Ainsi, l'inhibition de la calpaïne1 par un inhibiteur spécifique injecté dans des souris gestantes conduit à des défauts cohérents avec une perte de réponse au Sema3B de la PP par les axones commissuraux des embryons alors modifiés (Nawabi et al., 2010). La réponse des axones commissuraux à un signal Sémaphorine localisé peut donc être modulée dans le temps et dans l'espace grâce à des clivages protéolytiques qui permettent de réguler

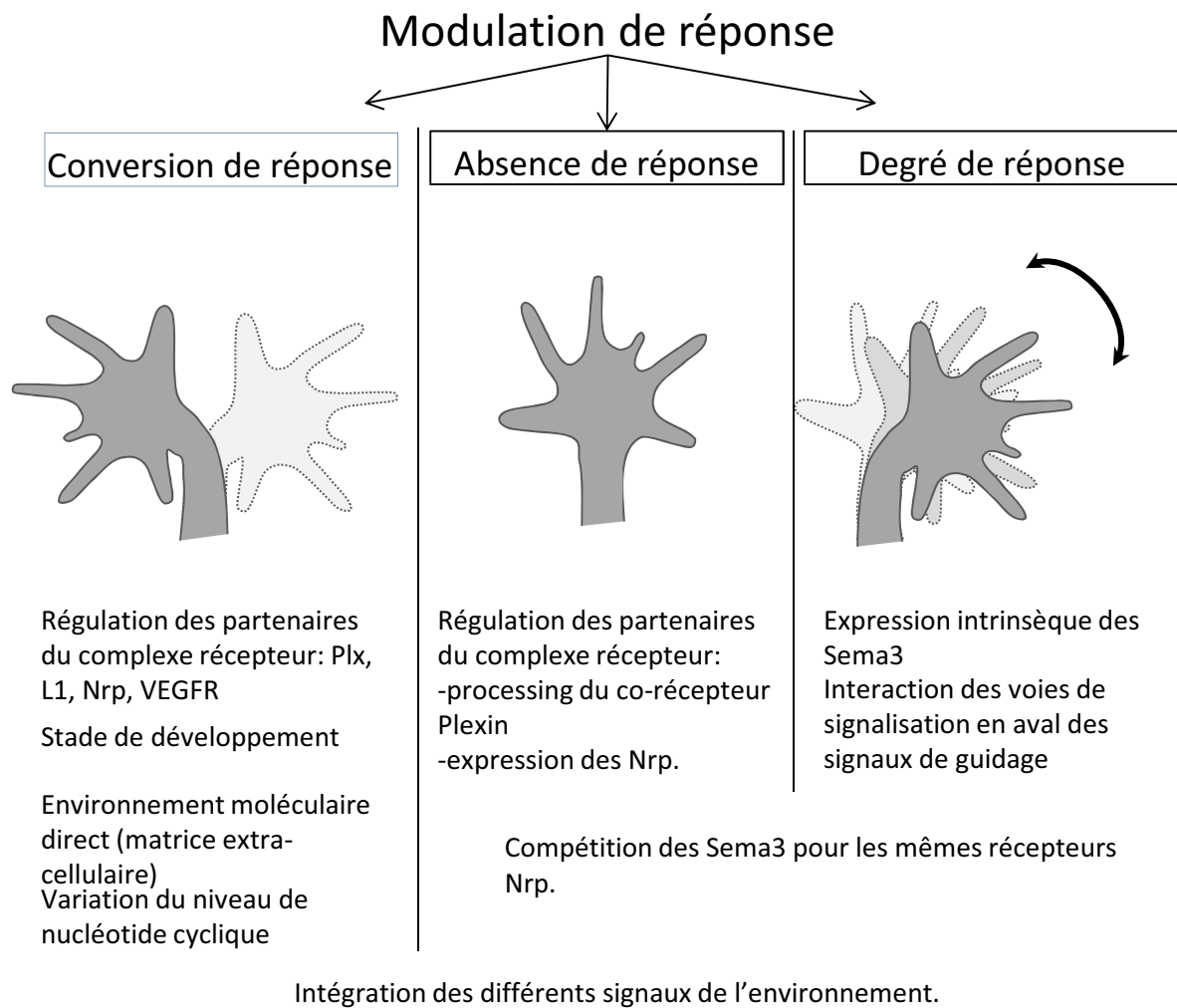


Figure 13: Récapitulatif des différentes voies de modulation de réponse du cône de croissance aux signaux Semaphorines. Par différents mécanismes, le cône de croissance peut voir sa réponse aux signaux Sema de l'environnement éteinte, convertie de répulsion en attraction, ou simplement réglée en amplitude. Ces différents mécanismes peuvent être induits par une variation de l'environnement moléculaire du cône de croissance ou par des régulations différentielles des récepteurs ou de leurs voies de signalisation au sein même du cône de croissance.

la disponibilité des différentes sous-unités des complexes récepteurs et ainsi d'en modifier la composition (Fig. 13).

D'autres études ont montré que la variabilité des partenaires au sein du complexe récepteur permet d'orienter le type de réponse adopté par l'axone face à une même Sémaphorine. Ainsi, deux études complémentaires ont montré que la réponse au signal Sema3E peut varier selon la composition du complexe récepteur. En effet, les axones des neurones corticaux qui n'expriment que PlxD1 sont repoussés par des sources de Sema3E tandis que ceux des neurones subiculaires, qui expriment à la fois PlxD1 et Nrp1 sont attirés par le signal Sema3E (Chauvet et al., 2007; Bellon et al., 2010). Une étude précédente avait montré que Sema3E, de manière originale pour la famille des Sema3, est capable de se lier directement au récepteur PlxD1 pour promouvoir un signal répulsif pour le cône de croissance (Gu et al., 2005). Cependant, l'application d'anticorps bloquants contre Nrp1 ou l'analyse des souris mutantes pour le récepteur VEGFR2 dans les cellules neurales, soit les souris VEGFR2^{lox/-}/Nestin::CRE, a permis de montrer que l'interaction directe de Nrp1 avec le domaine extra cellulaire de PlxD1 inhibe cette réponse répulsive. De plus, la présence de VEGFR2 dans le complexe récepteur transduit un signal attractif à l'axone (Chauvet et al., 2007; Bellon et al., 2010). Ces résultats illustrent alors une conversion du signal Sema3E selon la composition de son complexe récepteur sur les différentes populations neuronales concernées.

Une autre étude de mon équipe a également mis en évidence un mécanisme de conversion d'un signal répulsif en un signal attractif, mais grâce à une interaction en TRANS d'un membre du complexe récepteur à Sema3A, la glycoprotéine L1 avec Nrp1 (V Castellani et al., 2000). En effet, par des expériences de co-cultures, les auteurs ont montré que la présence d'un signal Sema3A répulsif sur des neurones corticaux exprimant le complexe Nrp1/L1 induit le collapse de ces derniers. Cependant, l'application du domaine extracellulaire de L1 sous forme soluble, L1-Fc, sur ces mêmes neurones corticaux convertit leur réponse répulsive en attraction. L'utilisation de chimères L1-Fc mutées a permis de démontrer que l'interaction en TRANS de L1 et Nrp1 est cruciale à cette conversion de réponse (V Castellani et al., 2002). Mon équipe a également proposé qu'un tel mécanisme d'interaction en TRANS pourrait avoir lieu au sein des faisceaux nerveux, pour une régulation de la capacité de réponse d'une population axonale à un même signal grâce aux axones

adjacents. Une seconde étude, plus récente, a également mis en évidence une conversion de réponse, mais cette fois-ci dans les neurones dopaminergiques du mésodiencephale. En effet, Kolk et collaborateurs ont montré que ces neurones issus d'embryons de rat à E12.5 sont repoussés par une source de Sema3F, alors que ces mêmes neurones matures issus d'embryons de rat à E14.5 sont attirés par une source de Sema3F (Kolk et al., 2009). De manière originale, les deux réponses semblent reposer sur l'interaction de Sema3F sur son récepteur Nrp2 (Kolk et al., 2009). Le mécanisme sous-jacent à cette conversion de réponse n'est pas totalement compris. Cependant, les auteurs ont spéculé que le passage des neurones du mésodiencephale par la sous-plaque, structure transitoire du cortex cérébral, pourrait convertir la sensibilité de ces neurones grâce à des signaux encore inconnus. Enfin, une troisième étude a permis de montrer un mécanisme de conversion de signal de guidage d'attraction en répulsion grâce à des protéoglycans. Ainsi, Kantor et collaborateurs ont mis en évidence que le signal attractif Sema5A sur les neurones du Fasciculus Retroflexus (FR, un faisceau nerveux du diencephale) nécessite la présence, sur ces mêmes neurones, d'héparane sulfate protéoglycans. Cependant, la présence de chondroïtine sulfate protéoglycans dans l'environnement proche de ces neurones du FR convertit le signal Sema5A en répulsion (Kantor et al., 2004). Ainsi, la réponse attractive ou répulsive des neurones de FR au même signal Sema5A dépend des protéoglycans qu'ils expriment et avec lesquels ils sont en contact au cours de leur progression (Kantor et al., 2004). L'ensemble des résultats présentés ci-dessus mettent en évidence l'importance de la régulation de la composition des complexes récepteurs dans la réponse spécifique de chaque axone à un même signal Sémaphorine. Plus physiologiquement, cette régulation pourrait ainsi permettre à un même axone de moduler sa réponse à un signal Sémaphorine donné dans le temps et l'espace, selon son environnement local (Fig. 13). Cependant, mis à part quelques trop rares études, peu de travaux ont réellement montré que de telles modulations opèrent au cours de la navigation des axones.

Un autre type de modulation de réponse peut avoir lieu grâce à une affinité différentielle de différents ligands par rapport aux mêmes récepteurs. Ainsi, comme il a été décrit précédemment, Sema3A, 3B et 3C sont capables de se lier à Nrp1 avec une forte affinité (cf. III 1) b.). Il existe donc une compétition pour la fixation sur ce récepteur, comme cela a été par exemple montré pour les neurones de DRG *in vitro*

(Takuya Takahashi et al., 1998). Ainsi, on peut imaginer que les quantités de Sema3B et/ou Sema3C présentes dans l'environnement direct des neurones de DRG permettraient de faire varier la disponibilité des récepteurs Nrp1 engagés dans la réponse à Sema3A. Ces compétitions des signaux Sema3 pour les récepteurs Nrp mettent en évidence une modulation de la capacité de réponse d'un axone à un signal donné selon le contexte moléculaire dans lequel il se trouve (Fig. 13).

- *Modulation de réponse par la régulation des voies de signalisation en aval des signaux de guidage.*

D'autres études ont également mis en évidence un niveau de finesse supplémentaire dans la modulation de réponse, mais cette fois-ci grâce à une régulation des signalisations mises en jeux. Les travaux réalisés par Tuttle et collaborateurs ont en effet mis en évidence le rôle du facteur neurotrophique BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) comme modulateur positif du taux de collapse et le rôle du NGF (Nerve Growth Factor) comme modulateur négatif, suite à un traitement par Sema3A (Tuttle et O'Leary, 1998). Ainsi, les auteurs ont montré que l'application de BDNF sur des neurones de DRG permet d'augmenter le taux de collapse de ces derniers suite à l'application de Sema3A, révélant leur sensibilité alors accrue au facteur collapsant (Tuttle et O'Leary, 1998). Inversement, l'application de NGF (Nerve Growth Factor) sur ces mêmes neurones de DRG conduit à leur désensibilisation à Sema3A. Plus récemment, les travaux de Dontchev et collaborateurs ont confirmé que si les neurones de DRG sont sensibles au signal répulsif Sema3A, l'application préalable de NGF permet de diminuer leur sensibilité à Sema3A (Dontchev et Letourneau, 2003). Ainsi, par des expériences de collapses, qui permettent d'évaluer la rétraction d'un cône de croissance face à un signal répulsif, les auteurs ont montré que l'application de NGF une heure avant le traitement par Sema3A diminue, sans pour autant la supprimer, la réponse de collapse des neurones de DRG de plus de soixante-dix pourcent (Dontchev et Letourneau, 2003). Les auteurs ont également montré que cette modulation de la sensibilité est le résultat d'une signalisation dépendante du NGF, passant par la voie de la Protéine Kinase A (ou PKA), qui diminuerait l'efficacité de la cascade de signalisation en aval de Sema3A à l'origine du collapse du cône de croissance (Dontchev et Letourneau, 2003). Une autre étude a également montré que la modulation d'une cascade de signalisation peut aller jusqu'à une conversion de

réponse à une même molécule de guidage. En effet, Song et collaborateurs ont montré par des expériences *in vitro* de turning sur des neurones spinaux de Xénope, que la modulation du niveau du nucléotide cyclique cGMP permet de convertir la répulsions à Sema3A en attraction (H. Song et al., 1998). Ainsi, alors que ces neurones sont normalement repoussés par Sema3A, en présence d'un agoniste de cGMP (Sp-cGMPS), ou d'un activateur des guanyl cyclases (PP-9), ces neurones sont attirés par une source de Sema3A. Cette conversion de la réponse répulsive en attraction peut cependant être empêchée par l'addition d'un antagoniste du cAMP (Rp-cAMPS) dans ces mêmes cultures (H. Song et al., 1998). Grâce à cette étude, les auteurs ont mis en évidence un mécanisme de modulation de la réponse à Sema3A grâce à la régulation du niveau de nucléotides cycliques, cAMP et cGMP (Fig. 13). Les modes d'action de ces nucléotides sont encore méconnus. Néanmoins, l'ensemble de ces résultats montrent que la modulation de réponse à un signal de guidage peut avoir lieu directement, par une régulation des différents partenaires de signalisation intracellulaires.

- *Modulation de réponse par l'expression intrinsèque des Sémaphorines*

Une étude réalisée au sein de mon équipe de recherche a permis de mettre en évidence un autre mécanisme singulier de modulation de réponse aux Sémaphorines. En effet, ces travaux ont montré que l'expression intrinsèque d'une Sémaphorine peut diminuer la sensibilité des axones à cette même Sema présente dans l'environnement. Ainsi, l'expression de Sema3A par la sous-colonne MMCm diminue la sensibilité de ses axones moteurs au Sema3A répulsif du dermamyotome, leur permettant alors de progresser dans une région dite « non permissive » (Moret et al., 2007). Par des expériences de gain et de perte de fonction chez l'embryon de poulet, Moret et collaborateurs ont ainsi mis en évidence le rôle de l'expression intrinsèque de Sema3A par les axones moteurs de la MMCm afin de réguler spécifiquement la disponibilité du récepteur Nrp1 à la surface du cône de croissance, ajustant ainsi leur seuil de sensibilité au Sema3A de l'environnement (Moret et al., 2007). Le mécanisme mis en évidence ici montre donc une grande finesse dans la modulation de réponse. En effet, il ne s'agirait pas de gain/perte de réponse ou de conversion de réponse, mais d'une modulation fine de seuil de sensibilité afin de se positionner précisément dans l'espace et de naviguer dans l'environnement le plus

favorable possible. Cependant, cette étude laisse en suspens des questions cruciales : cette modulation de réponse par une expression intrinsèque de Sema est-elle généralisable aux autres membres de la famille Sema3 ? Et si tel est le cas, peut-elle être le résultat de modulations croisées entre les différents membres de la famille ?

Finalement, l'ensemble de ces résultats montre que la réponse à un même signal peut être finement modulée voire même totalement convertie par différents mécanismes. Les axones peuvent donc moduler leur réponse selon le contexte spatio-temporel et moléculaire dans lequel ils se trouvent, et ce afin d'adopter des comportements de guidages spécifiques. En effet, la sensibilité propre à chaque cône de croissance vis-à-vis des nombreux signaux qui l'entoure lui permet de se positionner précisément au sein du canevas complexe de gradients de molécules de guidages et ainsi d'adopter une trajectoire stéréotypée jusqu'à sa cible terminale. Ces résultats soulignent également l'importance de l'intégration des signaux au niveau d'un cône de croissance. Les travaux de Winberg et collaborateurs en 1998 ont d'ailleurs mis en évidence que le choix de guidage d'un axone vers telle ou telle cible musculaire est effectué relativement par rapport à la force des signaux attractifs et répulsifs en présence (Margaret L. Winberg et al., 1998). Ainsi, la manipulation des combinaisons de plusieurs facteurs attractifs (Netrines) et répulsifs (Sema2A) a permis de diriger les axones moteurs vers différentes cibles musculaires chez la drosophile (Margaret L. Winberg et al., 1998). La complexité moléculaire qui entoure chaque axone permet donc un guidage spécifique de ces derniers dans des voies stéréotypées.

c. Rôle potentiel des modulations de réponse dans la mise en place de la branche motrice des circuits sensori-moteurs.

L'ensemble des études rapportées ci-dessus mettent en évidence les rôles des Sémaphorines connus à ce jour lors de la mise en place des projections motrices dans les circuits sensori-moteurs. Par exemple, Sema6A permet le maintien des corps cellulaires de motoneurones dans la moelle épinière, Sema3A contribuerait à

la fasciculation des nerfs spinaux jusque dans le membre, et Sema3F participerait également à la fasciculation des nerfs spinaux dans le sclérotome, mais aussi au choix dorso-ventral effectué par les motoneurones de la LMC lors de leur arrivée dans le membre.

Pourtant, de nombreuses sources de Sémaphorines, notamment de Sema3, sont également présentes tout le long du trajet des projections motrices, et dans les motoneurones eux-mêmes. De plus, les mécanismes de modulation de réponse décrits ci-dessus suggèrent une implication bien plus importante de ces facteurs de guidage dans la mise en place des circuits sensori-moteurs. En effet, la diversité de comportements de guidage qu'offre la modulation de réponse à un signal Sémaphorine, pourrait contribuer à la finesse et à la grande variété des trajectoires axonales motrices à chaque point de choix (Fig. 12). Les travaux effectués par Moret et collaborateurs dans mon équipe de recherche, ont ainsi déjà identifié un nouveau mécanisme de modulation de réponse à Sema3A dans le guidage des axones moteurs de la MMCm (Moret et al., 2007). Plus particulièrement, cette étude a montré la fonction que peut jouer une Sémaphorine, exprimée intrinsèquement par une population spécifique de motoneurones, dans la modulation de réponse à ce même signal fourni par l'environnement des axones moteurs. Or il a été montré précédemment, notamment par Cohen et collaborateurs que les motoneurones présentent une véritable combinatoire d'expression de Sémaphorines (S. Cohen et al., 2005) (Fig. 11). On peut alors se demander si l'exemple de modulation de réponse mis en évidence pour Sema3A peut être généralisé à d'autres membres de la famille Sema3. En outre, on peut également s'interroger sur l'échelle de guidage dans laquelle cette modulation de réponse pourrait intervenir. Il est vrai que le guidage spécifique et stéréotypé de chaque population de motoneurones dans le circuit sensori-moteur, notamment à l'échelle d'un pool, reste pour l'instant très mal compris.

Mon projet de thèse a donc consisté à examiner le rôle potentiel d'une autre Sema3, Sema3C, dans la modulation de réponse des motoneurones aux signaux Sémaphorines de leur environnement lors de la mise en place des projections motrices jusque dans le membre. Dans un premier temps, j'ai réalisé différents outils permettant d'interférer avec l'ARN de Sema3C afin d'étudier le rôle de l'expression motoneuronale de cette Sema3. Par la suite, des expériences de gain et de perte de

fonction chez l'embryon de poulet, ont mis en évidence une modulation opposées de la disponibilité des récepteurs Nrp1 et Nrp2 à la surface des cônes de croissances $Sema3C^+$. Par ailleurs, des expériences de collapses ont révélé une modulation de la réponse des axones moteurs $Sema3C^+$ à différentes Sema3 appliquées dans l'environnement des axones : Sema3A, Sema3C et Sema3F. Enfin, l'analyse des phénotypes des embryons de poulet ainsi manipulés a révélé le rôle de Sema3C dans la fasciculation des nerfs spinaux et le guidage de la LMCm dans le membre distal. L'ensemble de ces résultats a donc permis de proposer un rôle de Sema3C exprimé par les motoneurones dans le guidage stéréotypé des projections motrices, par une modulation fine de l'intégration des différents signaux Sema3 présents dans l'environnement des axones. Enfin, j'ai également mis en évidence l'existence d'un code Sémaphorine dans les progéniteurs de la moelle épinière au cours du développement.

CHAPITRE II : RESULTATS

I Les outils d'interférence à l'ARN

1) L'interférence à l'ARN et les différents outils d'interférence

Les travaux pionniers de Fire, Mello et collaborateurs ont permis de mettre en évidence la grande efficacité de l'injection de petits ARN double brins pour l'invalidation de l'expression du gène *unc-22* chez le nématode (Fire et al., 1998). Ces travaux ont fait avancer très significativement la connaissance de la fonction des gènes notamment chez les mammifères, puisqu'ils ont permis l'invalidation de l'expression de beaucoup d'entre eux *in vivo*. Cet outil a même permis une étude systémique chez *C. elegans*, à l'échelle d'un génôme entier, afin d'identifier la fonction principale de groupes de gènes jusqu'alors seulement annotés (Fraser et al., 2000).

L'interférence à l'ARN permet une régulation du niveau d'expression des gènes soit par le niveau ou l'activité des ARN de la cellule, soit par régulation directe sur le génome. De manière endogène, ce mécanisme est particulièrement efficace pour la défense des cellules contre des gènes parasites, issus de virus ou de transposons. La voie de l'interférence à l'ARN, ainsi que ses principaux acteurs, a été largement décrite dans la littérature. La diminution de l'expression de gènes par les petits ARN doubles brins (dsRNA ou double strand RNA) repose principalement sur trois familles de protéines : Drosha, Dicer et Argonaute (Ago). Les éléments Drosha et Dicer appartiennent à la famille des RNases III et permettent le clivage des dsRNA en siARN tout en leur laissant un groupement phosphate à l'extrémité 5' et deux nucléotides libres à l'extrémité 3'. Les protéines de la famille Ago appartiennent au complexe RISC (RNA-induced silencing complex), chargé de la reconnaissance de l'ARNm ciblé et de sa dégradation, et possèdent une grande similarité avec l'enzyme RNase H (Fig. 14). Sous l'action de ces différents partenaires protéiques, le dsARN, d'environ 70 nucléotides, est tout d'abord clivé en un ARN plus petit, un siARN de 18 à 25 nucléotides. Ces siARN sont alors adressés, hors du noyau, vers le complexe RISC où ils vont guider l'identification des ARNm complémentaires (Fig. 14). Les effecteurs de la protéine Ago prennent alors le relais et assurent la destruction des ARNm cibles par le RISC, l'inhibition de la traduction et la baisse de la transcription des gènes (Paddison, 2008).

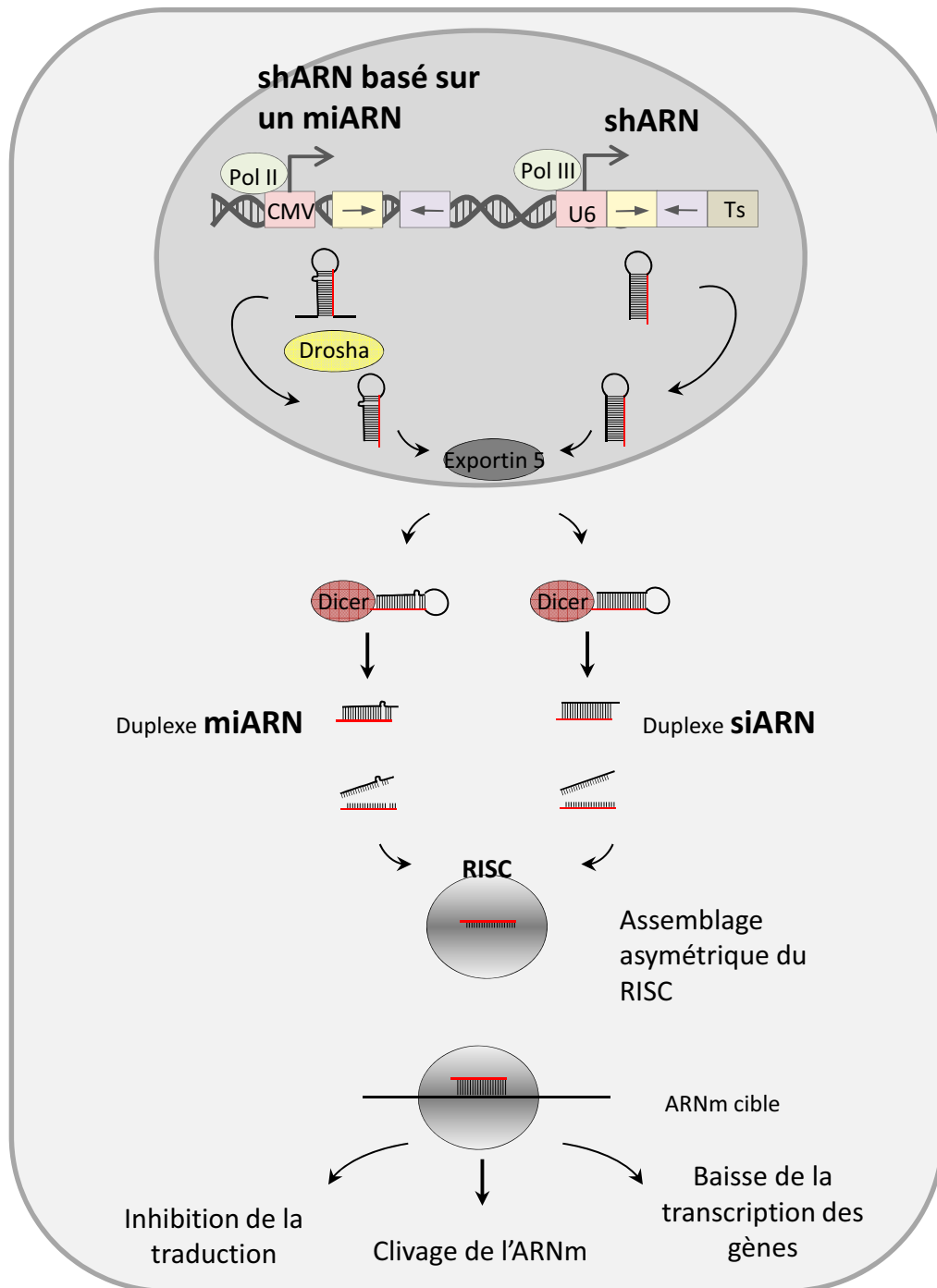


Figure 14: Représentation schématique de l'interférence à l'ARN post-transcriptionnelle chez les mammifères. Les outils d'interférence à l'ARN sont issus de l'expression de shARN par la polymérase II ou III selon son type. Après export hors du noyau, les deux types de structures sont prises en charge par Dicer afin d'isoler la séquence d'interférence (ici en rouge) qui permet alors l'assemblage du RISC et l'interférence avec l'ARN cible en vue de son clivage. L'incorporation de siARN permet directement l'assemblage du RISC sans l'intervention préalable des étapes de transcription et de la protéine Dicer. D'après Paddison., 2008.

Les travaux de Fire, Mello et collaborateurs ont montré que ce système d'interférence à l'ARN peut être utilisé comme un véritable outil pour moduler artificiellement le niveau d'expression de gènes d'intérêt (Fire et al., 1998). Quatre types d'ARN d'interférence peuvent alors être utilisés *in vitro* comme *in vivo* : les siARN, les shARN, les miARN et les dsARN (longs ARN double brins). Les siARN sont composés de 21 nucléotides et possèdent une séquence similaire à l'ARNm ciblé. A priori, leur incorporation se ferait directement au niveau du Complexe RISC, sans intervention de la protéine DICER. Ils sont alors administrés tels quels à la cellule. Les shARN font idéalement de 23 à 29 nucléotides et contiennent une boucle qui relie les deux séquences complémentaires de l'ARN double brin. Ils ont besoin d'être clivés par DICER avant d'être incorporés au reste de la voie d'interférence. Ces shARN possèdent l'avantage de pouvoir être synthétisés et exprimés *in vivo* et seraient plus efficaces que les siARN. Enfin, les shARN basés sur un miARN font en général 22 nucléotides, et possèdent une structure secondaire complexe. Ils nécessitent également l'intervention de la protéine DICER avant d'être adressés vers le RISC (Paddison, 2008).

Une limite à l'utilisation de ces outils est leur caractère éphémère. En effet, l'effet de « silencing » dure entre deux et sept jours si aucune étape d'amplification n'est réalisée, puisque l'outil d'interférence est alors dilué au cours des divisions cellulaires. Cet inconvénient peut cependant être contourné grâce à la transfection de plasmides contenant les séquences d'interférence. Par ailleurs, les systèmes par lesquels ces différents outils sont délivrés dans les cellules présentent une efficacité variable et peuvent alors compromettre l'ampleur de l'effet de modulation d'expression. Ainsi, il est possible de procéder par une simple transfection dans la cellule, ou à son électroporation, ou même encore de faire appel à des stratégies d'infections virales par des rétrovirus, des adénovirus, ou des lentivirus.

2) Exemple de l'interférence à l'ARN de Sema3C chez le poulet : étude comparative des différents outils utilisés

Au cours de ma thèse, j'ai eu recours à différents types d'interférence à l'ARN afin de diminuer le niveau d'expression de Sema3C dans l'embryon de poulet.

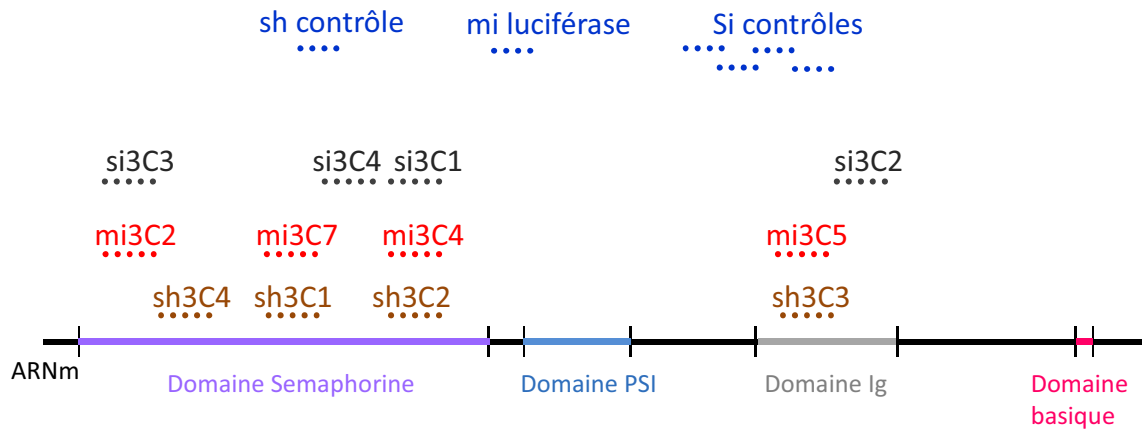


Figure 15: Représentation schématique des différents outils d'interférence à l'ARN de Sema3C utilisés dans cette étude. L'interférence à l'ARN est réalisée par des siARN, des miARN et des shARN dirigés contre différents domaines de l'ARN de Sema3C. Un sh Contrôle, un mi luciférase et un cocktail de Si contrôles ont été utilisés comme contrôle pour l'interférence avec les différents outils.

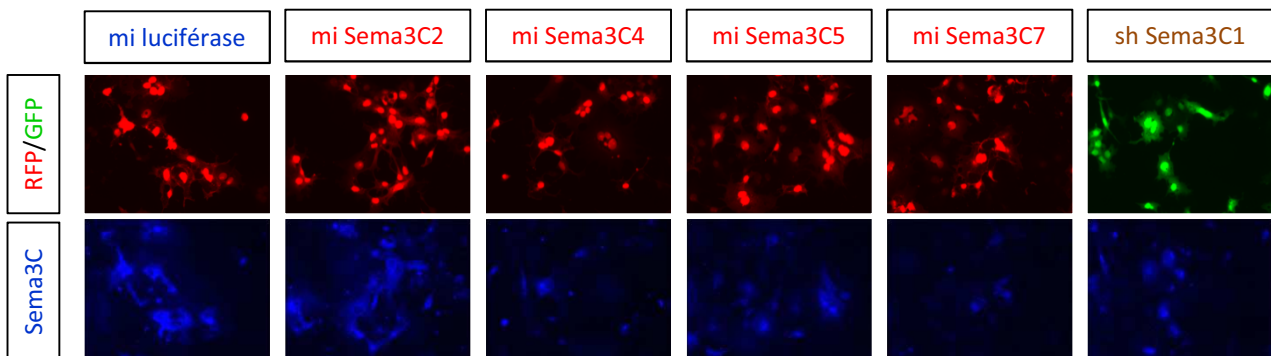


Figure 16: Test de l'efficacité d'extinction des ARN interférents *in vitro*. Des cellules COS ont été co-transfectées avec Sema3C, détectés ensuite par immunofluorescence, et les miARN/RFP ou le sh Sema3C1/GFP. La détection de Sema3C montre une bonne efficacité d'extinction des mi Sema3C4, 5 et 7, qui interfèrent autant voir plus avec l'ARN de Sema3C que le sh Sema3C1. Le contrôle utilisé ici est un miARN dirigé contre l'ARN de la luciférase, et atteste bien d'une absence d'interférence avec l'ARN de Sema3C.

a. Les différents outils

Afin d'invalider l'expression de Sema3C chez l'embryon de poulet, plusieurs outils d'interférence à l'ARN ont été envisagés. Nous avons en effet procédé au design de quatre shARN, dont trois dirigés contre le domaine Sema de l'ARN de Sema3C, et un contre son domaine Immunoglobuline (domaine Ig) (Fig. 15). Ils sont obtenus à partir d'oligoduplexes contenant les séquences interférentes sens et antisens de 21 nucléotides chacune, séparées par une boucle (9 nucléotides), hybridés entre eux, puis insérés dans le vecteur pSilencer (pSilencer U6.1.0 Ambion) par ligation. Le choix des séquences d'interférence et le design des oligoduplexes ont été effectués par l'algorithme spécifique proposé par Ambion. Un sh Contrôle a également été réalisé. Il contient une séquence aléatoire non retrouvée dans le génôme de l'embryon de poulet. De plus, afin de pouvoir contrôler la bonne électroporation de la construction dans l'embryon de poulet, un rapporteur GFP sous contrôle d'un promoteur CMV a été ajoutée en aval de la séquence des différents shARN.

Nous avons également eu recours à des miARN pour procéder à l'interférence à l'ARN, comme il a été décrit par Das et collaborateurs (Das et al., 2006). Les séquences cibles choisies pour les quatre miARN sont très similaires à celles obtenues en prédiction par l'algorithme Ambion (Fig. 15). Le design des séquences a cependant ici été effectué par l'algorithme proposé par Invitrogen. Le miARN final se compose des séquences interférentes sens (21 nucléotides) et antisens (22 nucléotides), séparées par une boucle (19 nucléotides), et flanquées de séquences stabilisatrices ou « séquences flank ». Cette structure est obtenue par une PCR chevauchante entre deux oligonucléotides contenant respectivement la séquence stabilisatrice, la séquence interférente sens ou antisens et la boucle. Après purification, les produits de PCR ainsi obtenus ont été clonés dans le vecteur pRFPRNAiC. Il permet à la fois l'expression du miARN sous contrôle du promoteur U6 de poulet mais également l'expression de la RFP sous contrôle du promoteur β -actine afin de pouvoir identifier les cellules transfectées ou électroporées. Le miARN contrôle utilisé au cours des expériences contient une séquence interférente dirigée contre la luciférase, ce qui a notamment permis de tester l'efficacité d'expression du vecteur mais également de n'être dirigé contre aucune séquence du génome de poulet.

Enfin, nous avons également procédé à de l'interférence à l'ARN de Sema3C grâce à un cocktail de siARN. Le choix des séquences cibles ainsi que la synthèse ont été effectués directement par la branche Dharmacon de la société Thermo Fisher Scientific (Fig. 15). Quatre siARN ont été produits et directement électroporés sous forme d'un cocktail. Les expériences contrôle sont obtenues par électroporation d'un cocktail de quatre siARN contrôles, dont les séquences n'ont pas de similarité robuste avec le génome de poulet. Afin d'identifier les cellules électroporées, nous avons tout d'abord eu recours à la co-électroporation d'une petite molécule fluorescente fournie par Dharmacon : le siGlo, mélangé aux cocktails de siARN. Cependant, si ce marqueur fluorescent est donné pour fonctionner lors de la transfection de cellules, nous ne sommes pas parvenus à le visualiser après électroporation dans l'embryon de poulet. Ainsi, nous avons procédé à la co-électroporation des cocktails de siARN avec un plasmide contenant l'EGFP sous le contrôle d'un promoteur CMV.

L'ensemble des outils décrits précédemment ont tous été utilisés pour réaliser des électroporations du tube neural de l'embryon de poulet à une concentration de 1,5 à 2 μ g/ μ l. Cependant, l'injection des préparations n'est pas effectuée à l'aide d'un injecteur et ne permet donc pas d'assurer une grande reproductibilité des quantités injectées puis électroporées dans chaque embryon. L'efficacité de l'électroporation est donc évaluée grâce aux différents marqueurs fluorescents cités précédemment.

b. Efficacité comparative des différents outils

En plus de l'évaluation de l'efficacité d'électroporation par les marqueurs GFP et RFP, des hybridations *in situ* sur coupes cryostat de 20 μ m d'embryons ont été réalisées afin de visualiser la quantité d'ARN de Sema3C restante après interférence.

L'efficacité d'interférence des différents shARN s'est avérée très variable. En effet, le sh Sema3C1 diminue beaucoup la quantité d'ARN de Sema3C tandis que le sh Sema3C4 la diminue beaucoup moins. Les shSema3C2 et 3 ne semblent pas efficaces (Fig. 17).

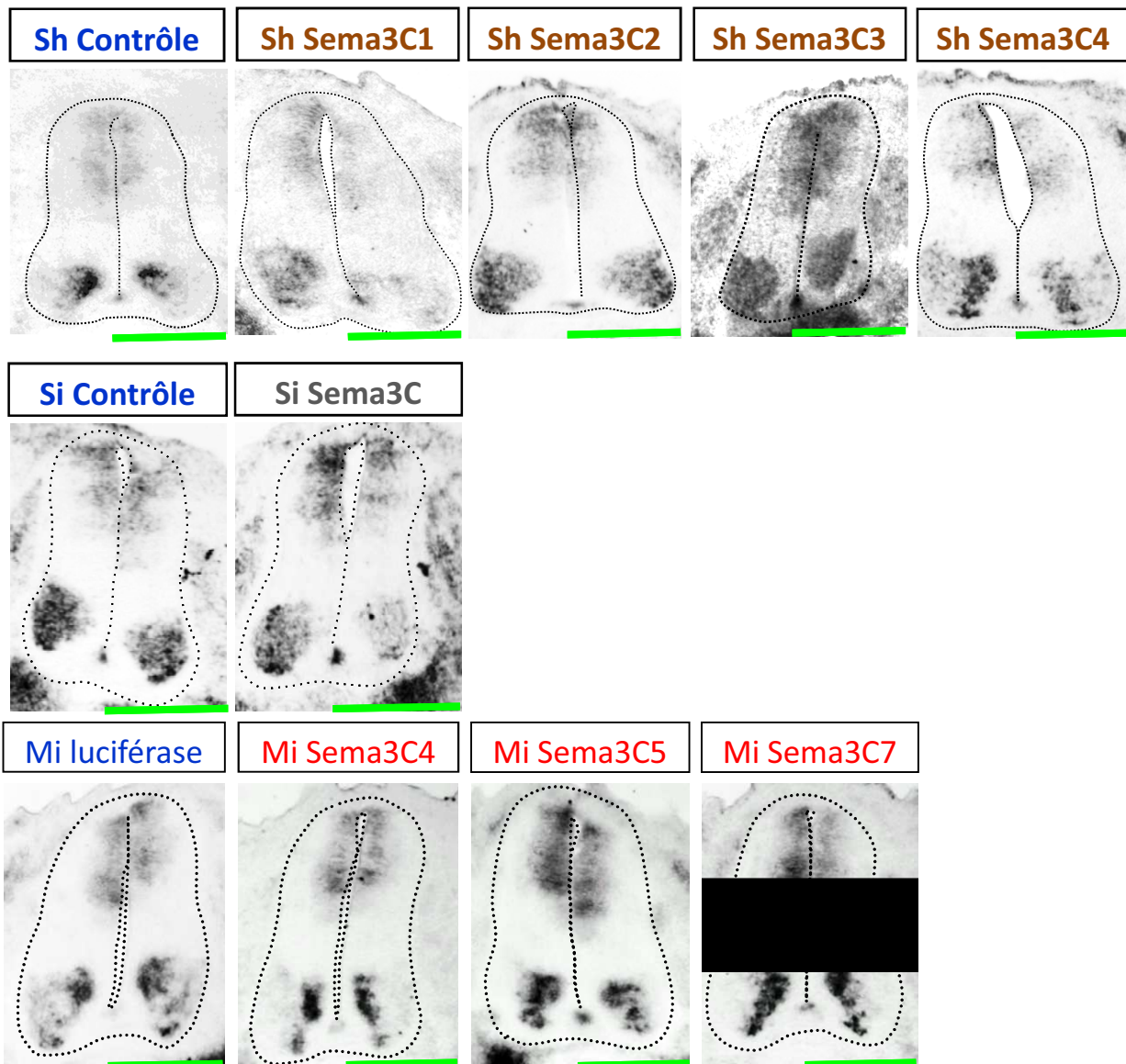


Figure 17: Les différents outils d'interférence avec l'ARN de Sema3C ont une efficacité d'extinction variable. Par des hybridations *in situ* sur coupes cryostat de 20 μm d'embryons de poulet, il est possible de comparer l'efficacité d'interférence des différents outils utilisés au cours de cette étude. Le sh Sema3C1 et le cocktail de si Sema3C apparaissent particulièrement efficaces pour diminuer la quantité d'ARN de Sema3C dans tous les motoneurones, ainsi que dans les progéniteurs dorsaux. Le sh Sema3C4 et le mi Sema3C4 interfèrent faiblement avec l'ARN de Sema3C dans les motoneurones. Enfin, le sh Sema3C2 et 3 et les mi Sema3C5 et 7 n'interfèrent que très peu avec l'ARN de Sema3C.

L'efficacité des miARN a tout d'abord été testée lors de transfection de cellules COS. Pour cela, les cellules ont été co-transfectées avec les constructions miARN et avec un plasmide d'expression de la protéine Sema3C. Les mi Sema3C4 et 7 sont alors apparus comme particulièrement efficaces pour diminuer l'expression de Sema3C dans les cellules. Dans ces conditions, ils semblent même plus éteindre l'expression de Sema3C que le sh Sema3C1 (Fig. 16). Cependant, les tests réalisés *in vivo* dans l'embryon de poulet montrent une efficacité d'interférence dans les motoneurones limitée voire inexistante pour ces miARN (Fig. 17).

Enfin, le cocktail de si Sema3C s'est avéré diminuer fortement la quantité d'ARN de Sema3C dans l'hémi-moelle électroporée (Fig. 17).

Ces différentes observations nous ont conduit à utiliser principalement le sh Sema3C1 et le cocktail de si Sema3C afin d'interférer avec l'expression de Sema3C *in vivo*. La différence d'efficacité des miARN en cellules et *in vivo* n'est pas encore bien comprise à ce jour. Cependant, il est possible que les miARN ne soient pas assez stables *in vivo* pour diminuer efficacement l'expression de Sema3C. Ces résultats ne sont cependant pas en accord avec l'étude réalisée par Das et collaborateurs qui montrent une bonne efficacité d'interférence chez l'embryon de poulet (Das et al., 2006). Néanmoins, il est important de rappeler que l'efficacité d'un outil d'interférence dépend en grande partie de sa cible, ce qui pourrait être à l'origine des différences observées entre les résultats de Das et collaborateurs et ceux obtenus au cours de notre étude. Enfin, il semble que l'interférence avec l'ARN de Sema3C par la fin de son domaine Sémaphorine soit la plus efficace puisqu'il s'agit des séquences les plus récurrentes au cours des différents choix de séquences et des outils les plus efficaces *in vivo*.

Ces observations pourraient être utiles pour le design d'outils interférents dirigés contre d'autres membres de la famille des Sémaphorines.

c. Limites des différentes stratégies et effets aspécifiques

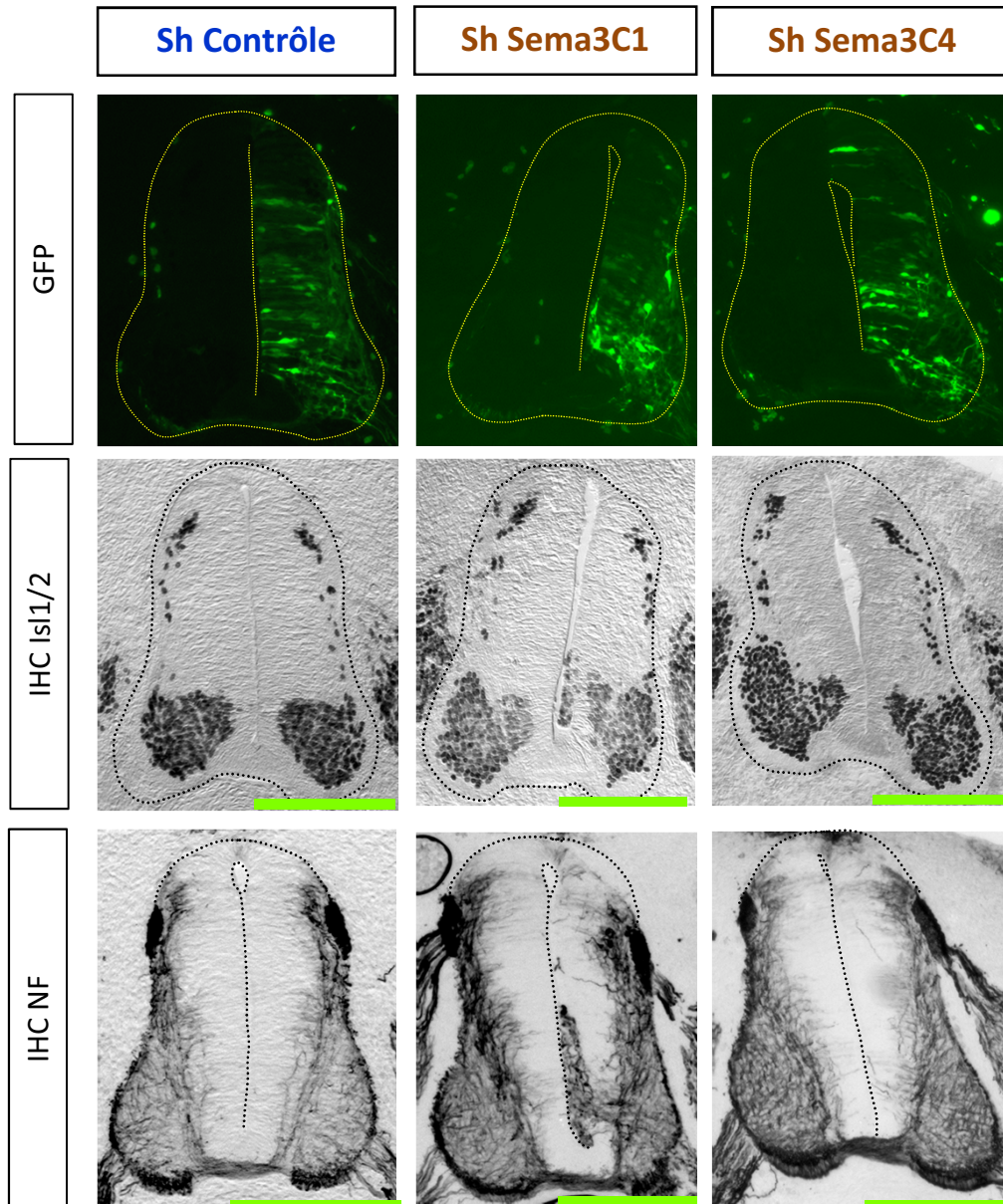


Figure 18: L'utilisation du sh sema3C1 conduit à l'interférence d'autres ARN et à l'origine de phénotypes spécifiques. L'électroporation du sh Sema3C dans l'embryon de poulet conduit à l'accumulation de cellules pouvant être des motoneurones (cellules NF+ et isl1/2⁺ dans la région des motoneurones) au bord du canal de l'épendyme. Cet effet n'est pas retrouvé avec le sh Sema3C4, ce qui suggère un effet aspécifique d'interférence du sh Sema3C1 avec un ou plusieurs autres ARN dans les motoneurones.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'interférence à l'ARN peut être plus ou moins efficace selon les outils. En effet, ces méthodes d'invalidation possèdent leurs différences et leurs limites respectives.

- *Effets non spécifiques*

Un des écueils principaux de ces outils d'interférence est le risque d'effets non spécifiques obtenus par l'interférence d'autres ARN dont la séquence est proche de celle de l'ARN d'intérêt. Cette reconnaissance de plusieurs ARN est issue des propriétés de liaison de la protéine Ago qui utilise une « racine » de 2 à 8 nucléotide en 5' de la séquence sens afin de reconnaître l'ARN qui doit être dégradé. Et bien qu'une quinzaine de nucléotides soit tout de même nécessaires pour conduire à une interférence efficace de la protéine, cette propriété met cependant à jour une possibilité d'effet non spécifique des différents outils d'interférence, aussi qualifiés d'effets « off-target » (Paddison, 2008).

La difficulté pour l'analyse des phénotypes suite à l'interférence est donc la distinction entre un effet spécifique directement lié à la baisse de l'ARN d'intérêt dans l'embryon, et un effet aspécifique issu d'un ARN non identifié. Un tel effet a été notamment observé suite à l'électroporation du sh Sema3C1. En effet, si ce shARN interfère efficacement avec l'ARN de Sema3C, il conduit à une accumulation de motoneurones et d'axones dans la région des progéniteurs de motoneurones (Fig. 18). Ce phénotype aspécifique n'est jamais obtenu suite à l'utilisation des autres outils d'interférence, notamment le cocktail de si Sema3C pourtant efficace. Nous avons donc écarté le sh Sema3C1 de l'étude du rôle de Sema3C dans les motoneurones. Ces expériences montrent qu'il est donc nécessaire d'interférer par au moins deux séquences différentes avec un ARN afin de vérifier la spécificité des phénotypes observés. Ces résultats permettent également de proposer un recours prudent aux cocktails d'ARN interférence puisqu'ils peuvent conduire à une multiplication des effets « off-target ».

Au vue de la bonne efficacité d'interférence du cocktail de si Sema3C, nous avons tout de même retenu cet outil pour notre étude afin d'interférer avec l'ARN de Sema3C dans les motoneurones.

- *Durée de l'interférence*

Les méthodes d'interférence à l'ARN utilisées ici présentent des durées d'efficacité différentes. En effet, selon la stabilité des outils et la quantité présente dans chaque cellule, la durée d'interférence peut passer de trois à cinq ou sept jours. Les trois types d'outils utilisés au cours de ma thèse peuvent être regroupés en deux catégories principales : les outils portés par des vecteurs d'expression, shARN et miARN, et les outils directement interférents, les siARN. L'avantage principal des cocktails de siARN est qu'ils sont électroporés tels quels dans les cellules et peuvent alors interférer très rapidement avec leur cible. En effet, les outils portés par des vecteurs doivent tout d'abord être soumis à la machinerie d'expression de la cellule afin de pouvoir être processés sous forme de shARN ou miARN interférents. Il y a donc un délai de 3 à 4 heures avant toute interférence. Ce délai peut être visualisé par l'apparition des marqueurs fluorescents, GFP ou RFP, exprimés également par les vecteurs l'interférence. Pour une interférence rapide, il est donc préférable d'avoir recours aux siARN. Cependant, cet outil d'interférence est dilué dans les cellules filles au fur et à mesure des divisions cellulaires puisqu'il est électroporé déjà synthétisé, contrairement aux outils portés par les vecteurs qui assurent alors une interférence plus durable grâce à une synthèse continue de shARN ou miARN dans chaque cellule. Ainsi, l'efficacité d'interférence des siARN diminue rapidement, 3 jours après électroporation, alors que la durée d'interférence des outils portés par des vecteurs d'expression est évaluée à 5 à 7 jours après électroporation. De plus, il est difficile d'évaluer réellement la quantité de siARN restante au moment de l'observation des embryons puisque l'électroporation n'est suivie qu'à partir de co-électroporation d'un vecteur d'expression de l'EGFP. De ce fait, même si la présence de GFP dans une cellule suggère fortement la possibilité d'une co-électroporation avec les siARN, il est possible qu'une partie des cellules observées ne l'ait pas été. Inversement, il est possible que des cellules contiennent des siARN sans le vecteur d'expression de la GFP. Pour cela, les vecteurs d'expression des outils d'interférence à l'ARN permettent d'introduire dans une même cellule à la fois les outils d'interférence et des marqueurs fluorescents. Cependant, il est important de considérer que si l'expression de ces marqueurs permet de visualiser les cellules dans lesquelles l'interférence à l'ARN a pu avoir lieu, elle ne reflète pas pour autant la durée d'efficacité de l'interférence puisque la demi-vie de ces protéines fluorescentes GFP ou RFP est très longue comparativement aux demi-vies des shARN et miARN.

En conclusion, il est difficile d'établir directement la durée d'efficacité des outils d'interférence électroporés dans les cellules. En effet, seuls des hybridations *in situ* de l'ARN ciblé ou des immunofluorescence de la protéine d'intérêt permettent de la déterminer. Dans le cas de notre étude, les hybridations *in situ* réalisées au stade le plus tardif examiné, stade HH26 des embryons de poulet, ont révélé une persévérance de l'effet d'interférence des si Sema3C pendant au moins trois jours.

- *Modèles pour l'interférence à ARN*

Une dernière différence entre les différents outils d'interférence a été mise en évidence au cours de cette étude. En effet, et de manière surprenante, nous avons constaté que si l'interférence par les miARN est très efficace dans les lignées COS, cette efficacité est très limitée *in vivo* après électroporation dans l'embryon de poulet. Pourtant, le promoteur d'expression du vecteur pRFPRNAiC est un promoteur spécifique, qui doit assurer une bonne expression des miARN dans l'embryon de poulet. Il se peut cependant que les différents miARN ne soient pas assez stables pour induire une diminution significative de l'ARN de Sema3C. Les raisons pour une telle différence d'efficacité ne sont cependant pas totalement comprises à ce jour. Il apparaît cependant que le choix de l'outil d'interférence peut varier selon le modèle d'étude souhaité.

En conclusion, au cours de ma thèse, j'ai pu comparer quelques outils d'interférence à l'ARN, ce qui m'a notamment permis de prendre la mesure des précautions nécessaires à l'interprétation des phénotypes observés. Par ailleurs, la force des phénotypes observés dépend non seulement de l'efficacité d'interférence des différents outils et séquences choisis, mais également de l'efficacité d'électroporation de l'embryon. Afin d'augmenter les quantités d'outils d'interférence transférées dans chaque cellule, il pourrait être avantageux de remplacer l'étape d'électroporation par une étape d'infection par des lentivirus. Cependant, une telle procédure n'est envisageable qu'avec des vecteurs particuliers qui excluent alors l'utilisation des siARN directement, comme nous le faisons actuellement.

II Etude du rôle de la Sémaphorine 3C motoneuronale au cours du développement

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle de Sema3C exprimé par les motoneurones lors du développement. Tout d'abord, des hybridations *in situ* ont permis de mettre en évidence une expression régionalisée de Sema3C dans les motoneurones chez l'embryon de poulet. En effet, Sema3C est exprimée dans la sous-colonne MMCm mais aussi dans la LMCm au niveau brachial. Par des expériences de gain et de perte de fonctions dans l'embryon de poulet, nous avons alors montré que la surexpression de Sema3C dans les motoneurones conduit à une modulation différentielle de la disponibilité de ses récepteurs Neuropilines à la surface du cône de croissance, extrémité motile de l'axone. En effet, Sema3C intrinsèque conduit à une baisse de Nrp1 et à une augmentation de Nrp2 à la surface du cône de croissance, tandis que la quantité totale de ces protéines dans les axones n'est pas affectée. Ces variations différentielles de la quantité de Neuropiline peuvent être corrélées à une modification de la réponse des motoneurones au Sema3C de l'environnement. En effet, des tests de collapse *in vitro* montrent une désensibilisation de ces derniers au Sema3C extrinsèque. De manière intéressante, les réponses à Sema3A, qui se lie à Nrp1, et à Sema3F, qui se lie à Nrp2, sont également modifiées. En effet, Sema3C motoneuronale conduit à une désensibilisation à Sema3A mais à une hypersensibilisation à Sema3F. L'ensemble de ces données nous a permis de proposer un modèle dans lequel l'expression de Sema3C par les motoneurones contribue à leur modulation de réponse différentielle aux divers signaux Sema3 de l'environnement. Par la suite, nous avons étudié le rôle de cette modulation de réponse lors du guidage des neurones de la LMCm dans le membre. Nous avons ainsi montré que la présence de Sema3C dans les motoneurones de la LMCm participe à leur guidage stéréotypé dans un environnement riche en Sema3, le membre antérieur.

En conclusion, cette étude suggère un rôle du code de Sémaphorines dans les motoneurones afin de moduler spécifiquement la sensibilité des différentes populations de motoneurones aux signaux Sema3 de l'environnement et contribuer ainsi au positionnement correcte des différents nerfs jusque dans leur cible finale. Ce travail est actuellement en cours de révision pour le journal *Development*.

Cross regulations between intrinsic and environmental semaphorins during motor axon guidance

Abstract

Class 3 Semaphorins (Sema3s) are chemotropic cues specifying the trajectory of numerous neuronal projections in the developing nervous system. Various Sema3 sources were shown to shape motor axon pathways, guiding them towards their peripheral targets. Intriguingly, Sema3s have also been detected in motor neurons during axon navigation. We previously showed that motoneuronal Sema3A sets the growth cone sensitivity to Sema3A repulsive sources, thus contributing to motor axon pathfinding. We report here novel functional properties of another Sema3, Sema3C, whose expression in motoneurons is restricted to the medial Lateral Motor Column (LMCm), and is also produced by peripheral sources along motor axon pathways and in their target limb. We performed targeted gain- and loss-of-function approaches in the chick embryo that enable selective alteration of Sema3C expression in motoneurons while preserving the peripheral sources. We show that motoneuronal Sema3C sets its Neuropilin receptor (Nrp) Nrp1 and Nrp2 levels at the growth cone surface. This in turn modulates growth cone responsiveness to Nrp1- and Nrp2-dependent repulsive Sema3s such as Sema3C, 3A and 3F. Besides, our *in vivo* analyses of manipulated embryos revealed that intrinsic expression of Sema3C in LMCm contributes to axon fasciculation and stereotyped position of the ventral motor tract in the forelimb. Altogether, and in addition to our previous work on Sema3A, these results raise a model in which a motoneuronal code of Semaphorin confers to motor axons a pool-specific sensitivity to limb-derived gradients of environmental Sema3s and thus specifies the accuracy of motor nerve trajectories in their final target field.

Introduction:

Mechanisms underlying the wiring of neuronal connectivity remain puzzling with regard to the limited repertoire of guidance cues used to achieve the tremendous diversity of axon pathways. Tight spatiotemporal regulation of ligands in axon environment and receptors in specific neuronal populations has been proven critical to generate different axon trajectories (Yu et Bargmann, 2001). In addition, modulation of axon responsiveness and reiterated use of guidance factors at successive steps of axon navigation allow the diversification of pathway choices with a relatively small number of factors.

Beyond their function in generating permissive corridors for navigating axon tracts, gradients of guidance cues also play instrumental role in the formation of topographic maps, organizing accurate trajectories of multiple sets of axons in their target field. For example in the retinotectal and olfactory systems, distinct levels of sensitivity control the axon positioning within the gradients. The mechanisms setting the sensitivity to guidance cues remains poorly explored. Class 3 secreted semaphorins (Sema3s) is a group of seven widely expressed chemotropic factors, from Sema3A to Sema3G, with repulsive and attractive activities (Jonathan A Raper, 2000). Loss-of-function approaches in mice provided evidence for important roles of Sema3s and their receptors, the neuropilins (Nrps), in patterning neuronal connections in various regions of the developing organism (Jonathan A Raper, 2000). Likewise in the motor system, fasciculation and trajectory of spinal motor axons expressing Nrps are largely shaped by the repulsive effects of Sema3s provided by peripheral tissues like the dermamyotome, the notochord, the ectoderm and the limb (Behar et al., 1996; Huber, Kania, et al., 2005; Takashi Kitsukawa et al., 1997; Jonathan A Raper, 2000; M Taniguchi et al., 1997; A Varela-Echavarría et al., 1997). Intriguingly, mRNAs encoding both

receptors and Sema3s have been also detected in motoneuron cell bodies by the time their axons elongate in the periphery and innervate their targets (Luo et al., 1995; A W Püschel et al., 1995; Moret et al., 2007; Chilton et Sarah Guthrie, 2003; Meléndez-Herrera et Alfredo Varela-Echavarría, 2006; Cohen et al., 2005).

Co-expression of a guidance receptor and its ligand in neurons has been observed in several cases such as in the retinal axons that express both EphA3 receptor and its ligand ephrinA5 (Carvalho et al., 2006) or in DRG sensory neurons that express both PlexinA4 receptor and its ligand Sema6A (Haklai-Topper et al., 2010). However, the significance of such coexpressions on axon responsiveness remains yet poorly understood.

In a previous study, we brought to light an original mechanism by which Sema3A expression in motoneurons controls the availability of its receptor Nrp1 at the growth cone surface, thus setting the sensitivity of their growth cone to exogenous Sema3A (Moret et al., 2007).

Another Sema3 has an interesting expression profile which retained our attention. Indeed, Sema3C is expressed in a restricted subset of spinal motor neurons as well as in the limb. The contribution of these different sources of Sema3C during motor axon navigation remains undetermined. Sema3C has been identified as a guidance cue for cortical, mesencephalic, and sympathetic axons, as well as it was shown to orient the migration of cardiac neural crest cells (Bagnard et al., 1998; Niquille et al., 2009; Hernández-Montiel et al., 2008). We report here pleiotropic effects of motoneuronal Sema3C on motor axon responsiveness to environmental Sema3s. We demonstrated by targeted manipulations in spinal motoneurons of the chick embryo that intrinsic Sema3C modulates in opposite way the availability of the two Sema3C binding subunits Nrp1 and Nrp2 at the growth cone surface. Interestingly, this confers to Sema3C the ability to modulate axon sensitivity to several Nrp1 and Nrp2-dependent Sema3s. Thus collapse responses to Sema3C and Sema3A are decreased

by intrinsic Sema3C while collapse response to Sema3F is increased. Finally, our *in vivo* work shows that this complex interplay between intrinsic and environmental Sema3 combinations is crucial to determine the accuracy of motor axon tracts positioning in the target limb.

Material and methods:

Plasmid construction

Sema3CiresEGFP bicistronic construct was derived from pAG-NT-coll1 plasmid (kindly provided by J. Raper, (Feiner et al., 1997)). IresEGFP fragment was amplified from ires2EGFP plasmid (Clontech, Mountain view, USA) by PCR between suitable primers, then inserted at the XhoI site located downstream from the chick Sema3C cDNA.

For RNA interference experiments, a SiRNA cocktail (ABgene Ltd, Epsom Surrey, UK) was co-electroporated with the EGFP-N3 vector (Clontech, Mountain view, USA) in the chick spinal cord. The cocktail contained four SiRNA with the following sequences: 5'-GGAACGGACTACAAGTATA-3', 5'-GGTTAAGCTGAGTGAGAGA-3', 5'-GCACGCGGTGTTTGGGATA-3' and 5'-GCCATTAATCATCCGGATA-3'. As a control, the ON-TARGETplus Non-Targeting Pool from ABgene was used, containing four siRNA with the following sequences: 5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3', 5'-UGGUUUACAUGUUGUGUGA-3', AGGUUUACAUGUUUUCUGA-3' and 5'-UGGUUUACAUGUUUCCUA-3', with no robust similarities with chick mRNA.

***In ovo* electroporation.**

In ovo electroporations of chick embryos (Gallu gallus; EARL Morizeau, Dangers, France) were performed as described previously (Creuset et al., 2002). The plasmids and SiRNA were introduced in the neural tube at the cervical and brachial levels on stage HH14-15 embryos (hamburger and Hamilton, 1992). Plasmids prepared with EndoFree maxiprep Xtra kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) were routinely diluted at 1.5µg/µl in PBS for Sema overexpression and at 0.5µg/µl in PBS for the EGFP-N3 vector. SiRNA cocktails were diluted at 2µg/µl in PBS.

Histological analyses

20µm cryosections were obtained from embryos fixed in 4% paraformaldehyde, and embedded in 7.5% gelatine/15% sucrose. *In Situ* hybridizations and *in toto* immunostaining were performed as described previously (Moret et al., 2004 and Henrique et al., 1995). In order to identify Sema3C expressing motoneuronal pool, Sema3C *in situ* hybridization and Isl1, FoxP1 and Lim3 immunostaining were performed on adjacent sections, since Isl1, FoxP1 and Lim3 epitopes were altered by *in situ* protocol treatment. Negative images of Sema3C *in situ* hybridization were changed into negative images. These images were then superimposed on immunostaining images for the forenamed motoneuronal markers. For immunostaining, cryosections, *in toto* embryos or explants were incubated with the following antibodies diluted in 2% bovine serum albumin blocking solution: goat anti-Neuropilin-1 (1/50; R&D systems, Minneapolis, USA), rabbit anti-Neuropilin-2 (1/50; Zymed, San Francisco, USA), mouse anti-Neurofilament 160 kD (1/50; RMO-270; Zymed, San Francisco, USA), rabbit anti-cleaved Caspase3 (1/100; Asp175 Cell Signaling, Danvers, USA), rabbit anti-FoxP1 (1/50; AbCam, Cambridge, UK) and rabbit anti-GFP (1/200; Molecular Probe, Eugene, USA). Mouse anti-NgCAM (1/400, 8D9 developed by Dr. Vance Lemmon), mouse anti-Islet1/2 (1/50; 39.5D5 developed by Dr. Thomas Jessell), mouse anti-Islet1 (1/50; 39.3F7 developed by Dr. Thomas Jessell) and mouse anti-Lim3 (1/50; 67.4E12 developed by Dr. Thomas Jessell) were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NIHCD and maintained by the University of Iowa (Department of Biological Sciences, Iowa City, USA).

For chromogenic immunostaining, suitable biotinylated antibodies, then the ABC complex (Vectastain), were used prior to DAB staining (Vector, Paris, France). For immunofluorescence staining, sections were incubated with Alexa 555 and Alexa 488 antibodies (1/500; Molecular Probes) or Fluoprobes 547 antibodies (1/200).

Nrp1, Nrp2 and NgCAM immunofluorescent labeling on explants non-permeabilized or permeabilized with 0.02% TritonX100, were detected with combined suitable Alexa 555 (1/500) and biotinylated antibodies (1/50). Explants were subsequently incubated with Alexa350-streptavidin (1/50; Molecular Probes).

Explant culture

The ventral third of spinal cords was dissected out from HH24 chick embryos at brachial level in DMEM (GIBCO). Explants were cultured on glass coverslips precoated with Laminin (50 μ g/mL, Sigma) and poly-Ornithin (10 μ g/mL, Sigma), and grown in a complete medium as previously described (Marthiens et al., 2005). Immunolabeling using the motoneuron specific axonal marker NgCAM confirmed that fibers extending from these explants were motoneuron axons.

Collapse assay

Conditioned media were obtained by transfection of MYC-tagged Sema3A, Sema3C or Sema3F as well as control constructs in human embryonic kidney cells (HEK 293) using Exgen (Euromedex, Les Ulis, France), cultured in DMEM medium with 10% heat-inactivated FBS, 0.05% penicillin, streptomycin. After 24h culture at 37 °C, ventral spinal cord explants were incubated with control and Sema supernatants for 45min at 37°C, and fixed in 4% paraformaldehyde/0.5% sucrose. Individual axons were randomly selected through NgCam or Phalloïdin TRITC (Sigma) fluorescent labelling and their morphology examined at 40x as in Falk et al. (Falk et al., 2005) . Analysis was performed from a minimum of two independent experiments, and each condition was performed in duplicate within the same experiment.

Microscopy and fluorescence quantification

Labelling were acquired under an Axiovert microscope (Zeiss, Germany) equipped with a Coolsnap CCD camera (Photometrics, Evry,France) or a LSM510 Meta Confocal

Microscope (Zeiss). Fluorescence quantifications were analyzed with the ImageJ software (National Institutes of Health, USA). For quantification of the spinal nerve thickness, NgCAM immunofluorescent staining was performed on *in toto* chick embryos. Images were captured at 10x in the brachial and thoracic regions containing limb projecting motoneurons. Spinal nerve outline was traced on NgCAM labeling and its width measured. Normalized width reported on the histogram was defined as the quotient of motor tract widths between electroporated and non-electroporated sides. The analysis of the limb innervation phenotype was obtained on NgCam labeled *in toto* embryos. Each control and electroporated limbs were fully scanned with a confocal microscope and the stack obtained this way were then analyzed by a three steps process. First, the scanned innervation pattern for each limb was projected to obtain the reconstitution of the dorsal or ventral tracts of each limb. Then pseudocolors were affected to these projection patterns (magenta for the control side and cyan for the electroporated side) and the mirror image of the control side was obtained. Finally, the control and electroporated patterns were superimposed for each embryo in order to form a composite image. For the quantifications presented in the diagrams, composite images were classified according to their level of superimposition, 1 corresponding to a perfect overlap of the superimposition and 20 to no overlap of the motor tracts in the composite image. These classifications were established after the visual assessment of the dorsal and ventral tracts superimposition. Three independent blind analyses were performed in order to obtain the final average classification. The distribution of each condition (Si control and Si control) was analyzed by a Mann-Whitney statistical test. For quantification of growth cone fluorescence, images were captured at 40x with constant exposure parameters below pixel saturation. Growth cone outline was traced with NgCAM staining which clearly delineated filopodia and lamellipodia in both control and experimental conditions. After background subtraction, the intensity of NP1 and NgCAM staining was measured within the outline, and the mean

intensity per pixel was calculated. Intensity values were normalized to the respective control experiments.

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using the χ^2 test for collapse assays and Mann-Whitney test for immunofluorescence quantifications and limb phenotype analysis, except for Nrp2 cell surface labeling where a χ^2 test was performed.

Results

Specific and dynamic *Sema3C* expression in the chick spinal motor columns

To define the potential role of motoneuronal *Sema3C*, we firstly examined its expression during spinal motoneuron development. Indeed, as *Sema3C* is not uniformly expressed in all motoneurons, *in situ* hybridizations were performed on chick cross sections and the *Sema3C* pattern compared to the immunolabeling of motoneuron specific markers from adjacent sections: *Lim3*, *Isl1* and *FoxP1*. These labelings revealed that *Sema3C* is already expressed in motoneurons at HH24, when motor axons navigate towards their targets (Fig. 1A). *Sema3C*⁺ neurons from the brachial region are found among the *Lim3*⁺/*Isl1*^{low} pool of motoneurons, the medial Medial Motor Column (MMCm) projecting between the Dorsal Root Ganglion (DRG) and the dermamyotome (Fig. 1B). They are also found in the most ventral *Lim3*⁻/*Isl1*^{low} population corresponding to the medial part of the Lateral Motor Column (LMCm) which projects to the forelimb (Fig. 1B). In the thoracic region, *Sema3C*⁺ cells lay within both MMCm and MMCl (HMC) neurons (Fig. 1B). At HH26/27, while LMC motor axons progress in the limb, *Sema3C* expression is detected in the *Lim3*⁺/*Isl1*^{low}/*FoxP1*⁻ MMCm column and in the *Lim3*⁻/*Isl1*^{high}/*FoxP1*⁺ LMCm column in the brachial region (Fig. 1C). In the thoracic region, we could detect high *Sema3C* expression in the MMCm column (Fig. 1C). A weak expression is also detectable in the MMCl column (Fig. 1C). Therefore, *Sema3C* is dynamically expressed by motoneurons during their axon pathfinding and its restricted and column-specific expression at the brachial level suggests a potential role during LMCm axon navigation.

Motoneuronal *Sema3C* modulates *Nrp1* and *Nrp2* availability at the growth cone surface.

Our previous work (Moret et al., 2007) showed that intrinsic *Sema3A* expression sets motoneuron sensitivity to exogenous *Sema3A* by regulating, at post-transcriptional level the availability of *Nrp1* receptor at the growth cone surface, thus contributing to axon projection patterns of motoneurons. We thus asked whether *Sema3C* expression in motoneurons could modulate its receptors expression. *Sema3C* has been shown to bind to both *Nrp1* and *Nrp2*. Its guidance activities are thought to be mediated by *Nrp1/Nrp2* heterodimers or *Nrp2/Nrp2* homodimers. (Chen et al., 1997; Takahashi et al., 1998). Both receptors were found to be expressed in spinal motoneurons, *Nrp1* in all motoneurons and *Nrp2* predominantly in LMCI but also in LMCm (Mauti et al.; Moret et al., 2007). Taken together, these results led us to assess the ability of intrinsic *Sema3C* to regulate *Nrp1* and *Nrp2* expression level in motoneurons.

We performed targeted gain-of-function experiments in the chick spinal cord and investigated the consequence of these manipulations of *Sema3C* expression on *Nrp* receptors levels. Unilateral overexpression of intrinsic *Sema3C* was obtained by electroporation of *Sema3CiresGFP* in the chick spinal cord (Fig. S1A, B in the supplementary material). An EGFP plasmid was used as a control for these experiments. The efficiency of *Sema3C* overexpression was checked by *in situ* hybridization since antibody against chick *Sema3C* are not available (see Fig. S1 in the supplementary material). The spinal cords were removed and the ventral domain was dissected out for explant cultures. *Nrp* levels were analyzed by immunocytochemistry with antibodies directed against *Nrp1* and *Nrp2*. As expected from the literature (Huber, Kania, et al., 2005), we could see that if all motor axons displayed *Nrp1* labeling on their surface, only half of them were *Nrp2*⁺. Moreover, these immunolabeling also revealed a diversity of expression levels for *Nrp1* and *Nrp2*, suggesting the existence of regulatory mechanisms setting these receptors levels at the growth cone surface (Fig. 2A). Motoneurons could then be classified into different categories from null expression

(fluorescence intensity <0,5) to high expression (fluorescence intensity >1,5 or 3) of either Nrp1 or Nrp2. Interestingly, overexpression of Sema3C led to a drop in Nrp1 expression level at the growth cone surface, more specifically by the decrease of the high Nrp1 category and the increase of the low Nrp1 one (Fig. 2B, F). This drop could be observed in Sema3CiresGFP⁺ and to a lesser extent in Sema3CiresGFP⁻ axons suggesting that Sema3C predominantly affects the cell surface Nrp1 level of neurons in which it is expressed, and to lesser extent in neighboring neurons through a paracrine pathway. Similarly, we analyzed Nrp2 cell surface level in cultured explants. Surprisingly, the percentage of high-Nrp2⁺ motor axons was increased following Sema3C overexpression in motoneurons, indicating that gain of Sema3C up-regulates cell surface Nrp2 at least in a subset of motoneurons (Fig. 2C, G). Taken together, these results revealed that intrinsic Sema3C has a differential impact on Nrp levels at the growth cone surface and could thus take part in the diversity of Nrp expression levels by motoneurons.

In order to understand how this modulation could take place, we measured the intensity of the total Nrp1 and Nrp2 pools in permeabilized axons. We observed that all motoneurons display high Nrp1 and Nrp2 expression and that total Nrp1 or Nrp2 levels were not modified by intrinsic Sema3C overexpression (Fig. 2D, E, H, I). Therefore, neuronal Sema3C does not modulate the transcription, the traduction or the axonal transport of its receptors, Nrp1 and Nrp2, but specifically acts on their availability at the growth cone surface. Interestingly, the Nrp receptors are shared between Sema3 family members, mediating repulsive responses to Sema3C but also to Sema3A and Sema3F (Giger et al., 2000). Therefore we investigated whether and if so how Sema3C, by regulating Nrp1 and Nrp2 levels, could impact on the sensitivity of motoneurons to Sema3C, Sema3A, Sema3F.

Sema3C induces motoneuron growth cone collapse

Firstly, we determined whether spinal motoneurons respond to environmental Sema3C. Indeed, depending on the neuronal type, Sema3C is known to be either an attractive or a repulsive guidance cue. For sympathetic neurons, Sema3C is a repulsive signal (Ralf H. Adams et al., 1997), whereas it is an attractive guidance cue for cortical (Bagnard et al., 1998) and dopaminergic neurons (Hernández-Montiel et al., 2008; Tamariz et al., 2010). To test Sema3C repellent activity, we performed collapse assays on motoneuron explants. Treatment of explants by Sema3C-conditioned medium induced the collapse of a significant fraction of the population of motor growth cones (Fig. 3B, $p < 0,01$, χ^2 test). Thus, secreted Sema3C is a repulsive signal for about one half of brachial motoneurons, which is consistent with the distribution of motoneurons displaying both Nrp1 and Npr2 at their axon surface. Similarly, a full dose of Sema3F-conditioned medium induced a 60% collapse rate within the motoneuron population (data not shown). Finally, we know that 75% motor axons were found collapsed by a full dose of Sema3A-conditioned medium (Moret et al., 2007). Therefore all three studied Sema3s, Sema3C, 3A and 3F act as repulsive guidance cues for motoneurons.

Intrinsic Sema3C sets motoneuronal collapse response to environmental Sema3C, 3A and 3F.

Next we investigated, in collapse assays, whether intrinsic Sema3C expression could modulate motor axon responses to these Sema3 repellents. We observed that motoneurons overexpressing Sema3CiresGFP exhibited a significant 20% decrease in their collapse response to exogenous Sema3C application (Fig. 3A, B, $p < 0,01$, χ^2 test). Similarly, overexpression of intrinsic Sema3C led to a strong decrease of the percentage of collapse to exogenous Sema3A (Fig. 3A, B, $p < 0,01$, χ^2 test).

Finally, our observation that Sema3C overexpression increased Nrp2 levels raised the possibility that the functional outcome of this regulation could be an increase of sensitivity to

Sema3F. Thus, we used a low dose of Sema3F to test the effect of Sema3C overexpression on motor neuron collapse. Consistent with our presumption, treatment with half a dose of Sema3F-conditioned medium after Sema3C overexpression lead to a significant increase in motor axons collapse rate (Fig. 3A, B, $p < 0,01$, χ^2 test).

Altogether, these functional effects are consistent with the modulations of Nrp levels. Indeed, the decrease of Nrp1 growth cone level is correlated to a drop in Nrp1 dependent Sema3A and Sema3C collapse response by motoneurons. Similarly, the Nrp2 level increase at the growth cone surface after Sema3C overexpression, matches the increase of Nrp2 dependent Sema3F collapse response. Thus our data demonstrate that intrinsic Sema3C expression oversensitizes motor growth cones to Sema3F while desensitizing them to Sema3C and Sema3A. These results revealed a complex interplay between motoneuronal Sema3C and environmental repulsive Sema3s. We then wondered how these cross-regulations between intrinsic and environmental Sema3s could impact motoneuron axon pathfinding. We hence looked for *in vivo* defects of motoneuron tracts that could result from motoneuronal Sema3C manipulations.

Proper intrinsic Sema3C expression is required for the compaction of motoneuronal tracts.

So far, our *in vitro* data showed that Sema3C expression by motoneurons modulates their sensitivity to environmental Sema3C, 3A and 3F. Our previous work has shown that intrinsic Sema3A modulations could lead to several defects of motoneuronal projection patterns (Moret et al., 2007). Hence, we analyzed the effect of Sema3C overexpression and knock-down on motoneuron projections *in vivo* at HH24 (cf. Material and Methods). A custom SiRNA cocktail directed against chick Sema3C was used. The efficiency of Sema3C knock down was checked by *in situ* hybridization (see Fig. S1 in the supplementary material).

When looking at spinal cord cross sections labeled with the motoneuronal marker Is11/2 (Tsuchida et al., 1994), we could see that motoneurons were well positioned in the ventral horn of the spinal cord after overexpression (Sema3CiresGFP) or knock-down (SiSema3C) of Sema3C (Fig. 4A). Similarly, neurofilament immunostainings revealed that motoneuron axons exited correctly the spinal cord toward the limb, with no aberrant pathfinding errors (Fig. 4A). In order to study more finely motoneuronal projection pattern, we analyzed motoneuronal tracts just after their exit from the spinal cord in whole-mount embryos (Fig. 4B). Those embryos were labeled with NgCam, a motor-specific axonal marker, and their motor tracts observed by confocal microscopy. Our analysis revealed that the width of spinal nerves containing Sema3CiresGFP⁺ motor axons was significantly increased by 10% compared to the control embryos (Fig. 4C, D, $p < 0,001$ Mann-Whitney test). Reciprocally, knock-down of Sema3C in motoneurons led to a 10% decrease in the width of corresponding spinal nerves (Fig. 4C, E, $p < 0,001$, Mann-Whitey test). Our previous study showed that similar phenotypes couldn't be linked to any additional death in the motoneuron population (Moret et al., 2007). Here as well, activated Caspase3 labeling didn't show any abnormal cell death after Sema3C knock-down (see Fig. S2 in the supplementary material). Therefore, these results indicated that intrinsic Sema3C expression in motoneurons can modulate the compaction of their nerve tracts quite early in their development.

Stereotyped positioning of motor axon tracts in Sema3 expressing target fields.

We next investigated whether the modulation of growth cone responses to exogenous Sema3s application observed *in vitro* could impact motor axon guidance *in vivo*. Axon sensitivity is now considered as a major parameter for the accurate positioning of axons in gradients of guidance cues (Löschinger et al., 2000). We thus asked whether such a fine control of axon position could also exist for the motor neuron projections in the limb and

whether *Sema3C* could contribute to it. At HH24, motor axons leave the brachial plexus to invade the limb and are sorted out according to their pool specific identity (Swanson et Lewis, 1982; Tsuchida et al., 1994). At HH26, LMCI motoneurons project in the dorsal part of the limb and form the radialis profundus nerve, whereas LMCm, those expressing intrinsic *Sema3C*, project ventrally and form both the interosseus nerve and the median nerve (Tsuchida et al., 1994; Swanson et Lewis, 1982).

First, we examined whether a high degree of fidelity and thus low inter-individual variations of motor tract spatial positioning might be found in the forelimb. To address this issue, series of confocal images of *in toto* HH26 NgCAM-immunolabelled chick embryos were taken to reconstruct the whole nerve patterns of the limb (cf. Material and Methods and Fig. 5A, B). We then superimposed the patterns of limbs from three different embryos. We could see with this method that the positioning of the median and interosseus nerves projecting ventrally perfectly matched from one embryo to the other (Fig. 5B).

Second, we carried out a detailed investigation of the *Sema3* expression gradients established in the limb by performing *in situ* hybridization in isolated limbs and on cross sections. *In toto* hybridizations showed a broad expression of those three *Sema3*s in the limb (Fig. 5C). *In situ* hybridizations on limb sections revealed that those expressions were located in the limb mass and not on its surface (Fig. 5C). Indeed, we could observe at HH24 and HH26 that *Sema3A* is mostly expressed in the ventral periphery of the limb, *Sema3F* in the dorsal and ventral periphery of the limb, and *Sema3C* in the center of the limb (Fig. 5C, D). Therefore a complex *Sema3* combinatory expression is established in the limb during motor axon innervation, which could participate in the specification of the accurate spatial positioning of motor axon tracts.

Sema3C expression by LMCm motoneurons contributes to specify the spatial positioning of their nerves in the limb.

We postulated that by allowing motor axons to properly interpret the Sema3 gradients in the limb, intrinsic expression of Sema3C by LMCm motoneurons could play a role in the stereotyped position of their motor tracts. We herein took advantage of the gain and loss-of-function experiments in the chick that enable to target only one side of the neural tube (Fig. S1B in the supplementary material). When we superimposed the control and electroporated limbs of control embryos, we could observe that ventral and dorsal patterns are highly symmetrical (Fig. 6A, B, C; Fig. S3 in the supplementary material). In contrast, in the SiSema3C electroporated embryos, we observed that the trajectories of the median nerve, arising from the LMCm pool in which Sema3C was knock-down, were deviated from their stereotyped trajectory (Fig. 6B, C; Fig. S3 in the supplementary material). Quantifications of the level of mismatch for these overlaps, between control and electroporated ventral tracts revealed that the trajectory of the median nerves is significantly affected in the Sema3C knocked down embryos (Fig. 6C, $p < 0,01$ Mann Whitney test; for quantification procedure, cf. Material and Methods). Indeed, the Si Sema3C embryos have an average mismatch level of 15/20 compared to the Si Control embryos that display an average mismatch level of 6.8/20 (Fig. 6C). In contrast, the trajectory of the nerve radialis profundus arising from the Sema3C⁻ LMCI pool and innervating the dorsal part of the limb was unaffected by the SiSema3C electroporation (Fig. 6D, “ns” Mann Whitney test). Finally, overexpressing Sema3C did not impact the stereotypy of the nerve patterns in the limb (Fig. 6B).

Altogether, our results then demonstrate that Sema3C takes part in the developmental program by which motoneurons set a proper sensitivity to target-derived repulsive Sema3s, which control the stereotyped positioning of ventral motor nerves in the limb (Fig. 7A, B).

Discussion

We report in this study that expression of *Sema3C* by motoneurons sets their response to three Semaphorin repellents from the environment: *Sema3C*, *Sema3A* and *Sema3F*. This property goes through the control of the availability of *Sema3* receptors, *Nrp1* and *Nrp2*, at the motoneuron growth cone surface. Our *in vivo* investigations provide evidence that motoneuronal *Sema3C* plays an instructive role during the formation of motor axon connections. First, we show that intrinsic *Sema3C* contributes to define the fasciculation state of the spinal nerves. Second, we report that motoneuronal *Sema3C* is required for motor axons to properly interpret a complex combinatorial gradient of *Sema3* repellents which specifies the accurate spatial positioning of motor axon tracts in the limb.

Our previous work (Moret et al., 2007) revealed that intrinsic *Sema3A* in motoneurons diminishes *Nrp1* receptor availability at the growth cone surface, and as a result, lowers axon sensitivity to environmental *Sema3A*. Here, our results show that intrinsic *Sema3C* has more complex effects, decreasing *Nrp1* but also increasing *Nrp2* availability at the growth cone surface. Consequently, intrinsic *Sema3C* confers to motor axons a very interesting capacity of balancing the respective strength of exogenous *Nrp1* and *Nrp2*-mediated *Sema3* repellents.

In vivo, we observed that overexpression of *Sema3A* and *Sema3C* increased the spinal nerve caliber. However, *Sema3A* but not *Sema3C* overexpression was found to split the nerves into several mis-directed branches ((Moret et al., 2007); present study). Several possibilities can explain these differential effects. First, *Sema3C*-mediated *Nrp1* lowering desensitizes to repulsive *Sema3A* and/or *Sema3C* from the environment but the increase of *Nrp2* at the growth cone surface enhances repulsion by *Nrp2*-dependent *Sema3s*, for instance *Sema3F*. Therefore, *Sema3C* could modify the balance of *Nrp1* and *Nrp2*-mediated environmental repulsive forces without affecting the overall pathfinding of motor axon tracts.

Second and beyond their contribution to the Semaphorin signaling, founding and following studies showed that Nrps mediate axon-axon interactions (Takagi et al., 1995; Fujisawa et al., 1997; Huettl et al., 2011). Thus, the profound defasciculation induced by *Sema3A* overexpression could result from the loss of Nrp1-mediated axon-axon contacts. Again, as *Sema3C* but not *Sema3A* overexpression impacts oppositely Nrp1 and Nrp2 levels, the overall axon-axon contacts should be modestly affected. These differences demonstrate that *Sema3C* and *Sema3A* exhibit distinct regulatory properties on motor axon fasciculation. Interestingly in the olfactory system, a sophisticated axonal sorting based on differential Nrp1 levels specifies axon position in the olfactory nerve (Imai et al., 2009). In the motor system, regulation of axon-axon contacts is crucial when motor axons reach the brachial plexus as they rearrange according to their pool identity prior to target limb innervation. At this choice point, a complex sorting allows LMCm and LMCl axons arising from the same spinal nerve to segregate, to gather with their homolog arising from other brachial nerves and then form the ventral and dorsal limb nerves (Bonanomi et Samuel L Pfaff, 2010). Thus possibly, by setting pool-specific Nrp surface levels, intrinsic *Sema3s* could participate in motor axon sorting prior to target innervation. Interesting insights in this issue should come from studies of mouse models carrying pool-specific axonal reporters. Finally, the formation of the sensorimotor circuitry involves inter-communications between motor and sensory axons, and recent work implicated Nrp1 as one of the molecules mediating this dialog (Huettl et al., 2011). Whether intrinsic *Sema3s* also sets Nrp cell surface level in sensory axons remain to be determined, but various work reported *Sema3* expression in the nascent DRG (Mauti et al.).

Motoneuronal *Sema3C* specifies LMCm tract positioning in the ventral limb

We show here that manipulation of *Sema3C* in motoneurons result in defective positioning of the LMCm motor tracts in the limb. Several work established that motor axon

trajectories in the limb are specified by a combination of guidance cues, including the Ephrins, the Semaphorins and the trophic factor GDNF (Eberhart et al., 2000; Huber, Kania, et al., 2005; Livet et al., 2002). The LMCI/LMCm dorso-ventral subdivision of motor axon innervation in the limb is controlled by the ephrin/Eph signaling. Repulsive Ephrin-As are expressed in the ventral limb and repel dorsally EphA4-expressing LMCI motoneurons (Eberhart et al., 2000). Conversely, a dorsal ephrinB2 source repels ventrally EphB-expressing LMCm motoneurons (Luria, Krawchuk, et al., 2008). The Sema signaling has also been implicated in this dorso/ventral choice, as for instance genetic removal of Nrp2 in mice results in defective dorso-ventral targeting (Huber, Kania, et al., 2005). Nevertheless beyond this dorso-ventral binary choice, how motor axon trajectories are guided in the dorsal and ventral limb territory remains very poorly understood. Indeed, it might be tightly controlled given the high degree of fidelity of motor tracts evidenced in superimposed limbs. Our findings provide new insights into this issue, revealing that an interplay between intrinsic and extrinsic Sema signaling controls the terminal steps of motor axon navigation by specifying the accurate positioning of motor axon tracts in their target field. Silencing of endogenous Sema3C selectively shifted the tract formed by motoneurons which normally express it (LMCm), without affecting the projections of those that do not (LMCI). This thus demonstrates that motoneuronal Sema3C is a specific effector of the program controlling LMCm axon tract positioning. Our overexpression experiments indicated that increasing Sema3C levels in the Sema3C-expressing population had no effect, possibly because the endogenous level was already sufficient. Ectopic Sema3C expression in the normally Sema3C⁻ motoneurons (LMCI) did not shift their axon tracts, thus suggesting that another signaling might be active in these neurons to position their tracts in the limb. Interestingly in our explant cultures, Nrp2 was present in almost all motor growth cones, but at the cell surface of only half of them. Sema3C overexpression only impacted this latter population, as

the proportion of motor growth cones exhibiting no cell surface Nrp2 was not affected. This suggests that in some motoneurons, Nrp2 cell surface availability might be regulated by a *Sema3C*-independent mechanism. It is tempting to speculate that other *Sema3* family member(s) might be implicated. Indeed, detailed analysis of expression patterns revealed the existence of a complex *Sema3* code in motoneurons (Cohen et al., 2005; Moret et al., 2007, present study). We previously showed that *Sema3A* expression was first restricted to MMCm motoneurons, allowing their axons to project towards dorsal territories. Later on, by the time motor tracts reach the plexus and progress through the forelimb, *Sema3A* expression spans to most motor neurons including the LMCs (Moret et al., 2007). *Sema3C* mRNA has a distinct expression profile. It is detected in LMCm neurons all over the period of axon elongation in the periphery. However, *Sema3C* is highly expressed only in a subset of LMCm neurons while the rest of the sub-column displays a mild expression this *Sema3*. *Sema3C* is also strongly expressed in the MMCm column at stage HH24 and seems to weaken in the MMCI at HH26. Therefore this *Sema* code might generate a temporal and spatial diversity of cell surface Nrp levels and axon sensitivities to environmental *Sema3*s which could underlie pool-specific sorting and positioning of motor axon tracts. Assessing these issues *in vivo* will be highly challenging, first because immunolabeling on sections does not allow to discriminate intracellular from extracellular Nrp protein pools and second because it also requires to map motor axons with pool-specific markers. Our findings also raise the question of how the *Sema* code is set in motoneurons. Combinations of transcription factors of *Lhx* and *Hox* family were shown to control the topography of spinal motor axons according to the identity of their related column and pool (Dasen et al., 2005; A Kania et al., 2000; Tsuchida et al., 1994). Few guidance receptors were found downstream of this transcriptional code (Artur Kania et Thomas M Jessell, 2003; Shirasaki et Samuel L Pfaff, 2002). It will be interesting to investigate the links between this transcriptional program and the *Sema* code.

Sema3C-Nrp co-expression generates diversity of motor axon responsiveness to environmental Sema3s

Together with other recent work, our data point out the versatility of ligand/receptor co-expression in guidance signaling. Cis-interactions between transmembrane EphrinA/EphA and Sema6A/PlexinA4 were shown to inhibit axon responsiveness to the exogenous ligands (Carvalho et al., 2006, 2006; Hornberger et al., 1999; Haklai-Topper et al., 2010). Recent work showed that EphA cis-attenuation in LMCm neurons and EphB cis-attenuation in LMCI ones are at work to contribute to the fine parallel EphB-ephrinB and EphA-ephrinA signaling in these two motoneuron populations, respectively (Kao et Kania, 2011). We reported that Sema3A/Nrp1 co-expression desensitized the growth cones to exogenous Sema3A (Moret et al., 2007). Unexpectedly here, we show that co-expression of Sema3C with Nrp1 and Nrp2 does not only impact the response to Sema3C, but also to SemaA and to Sema3F. Moreover, the nature of the impact can also differ, being a decrease of sensitivity to Sema3A but an increase of it to Sema3F. Thus multiple functional properties can emerge from such ligand/receptor coexpression. Interesting issues will be to assess whether these cross-regulations influence a wider range of axonal properties, such as inter axonal communications, short-term desensitization (Piper et al., 2005) and adaptation to exogenous ligand sources (Ming et al., 2002).

Acknowledgements:

This work was supported by ANR CNS program, Fondation pour la Recherche Médicale (AFM) (FRM labeled team), Association Française contre les Myopathies (AFM), PhD fellowships by MENRT and FRM. We thank J. Raper for the kind gift of Sema3A constructs and J. Falk for his helpful comments on this work.

Bibliography

- Adams, Ralf H., Lohrum, Marion, Klostermann, A., Betz, Heinrich, et Püschel, Andreas W.** (1997). The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J*, **16**, 6077-6086.
- Bagnard, D., Lohrum, M, Uziel, D., Püschel, A W, et Bolz, J.** (1998). Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development*, **125**, 5043-5053.
- Behar, O., Golden, J. A., Mashimo, H., Schoen, F. J., et Fishman, M. C.** (1996). Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature*, **383**, 525-528.
- Bonanomi, D. et Pfaff, Samuel L** (2010). Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a001735.
- Carvalho, R. F., Beutler, M., Marler, K. J. M., Knöll, B., Becker-Barroso, E., Heintzmann, R., Ng, T., et Drescher, Uwe** (2006). Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nat. Neurosci*, **9**, 322-330.
- Chen, H., Chédotal, A., He, Z., Goodman, C. S., et 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.
- Chilton, J. K. et Guthrie, Sarah** (2003). Cranial expression of class 3 secreted semaphorins and their neuropilin receptors. *Developmental Dynamics*, **228**, 726-733.
- Cohen, S., Funkelstein, L., Livet, J., Rougon, G., Henderson, C. E., Castellani, Valerie, et Mann, F.** (2005). A semaphorin code defines subpopulations of spinal motor neurons during mouse development. *Eur. J. Neurosci*, **21**, 1767-1776.
- Dasen, J. S., Tice, B. C., Brenner-Morton, S., et Jessell, Thomas M** (2005). A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell*, **123**, 477-491.
- Eberhart, J., Swartz, M., Koblar, S. A., Pasquale, E. B., Tanaka, H., et Krull, C. E.** (2000). Expression of EphA4, ephrin-A2 and ephrin-A5 during axon outgrowth to the hindlimb indicates potential roles in pathfinding. *Dev. Neurosci*, **22**, 237-250.
- Falk, J., Julien, F., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., et al.** (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron*, **48**, 63-75.
- Fujisawa, H, Kitsukawa, T, Kawakami, A., Takagi, S., Shimizu, M, et Hirata, T** (1997). Roles of a neuronal cell-surface molecule, neuropilin, in nerve fiber fasciculation and guidance. *Cell Tissue Res*, **290**, 465-470.
- Giger, R. J., Cloutier, J.-F., Sahay, A., Prinjha, R. K., Levengood, D. V., Moore, S. E., Pickering, S., Simmons, D., Rastan, S., Walsh, F. S., et al.** (2000). Neuropilin-2 Is Required In Vivo for Selective Axon Guidance Responses to Secreted Semaphorins. *Neuron*, **25**, 29-41.
- Haklai-Topper, L., Mlechkovich, G., Savariego, D., Gokhman, I., et Yaron, A.** (2010). Cis interaction between Semaphorin6A and Plexin-A4 modulates the repulsive response to Sema6A. *EMBO J*, **29**, 2635-2645.
- Hernández-Montiel, H. L., Tamariz, E., Sandoval-Minero, M. T., et Varela-Echavarría, Alfredo** (2008). Semaphorins 3A, 3C, and 3F in mesencephalic dopaminergic axon pathfinding. *J. Comp. Neurol*, **506**, 387-397.
- Hornberger, M. R., Dütting, D., Ciossek, T., Yamada, T., Handwerker, C., Lang, S., Weth, F., Huf, J., Wessel, R., Logan, C., et al.** (1999). Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron*, **22**, 731-742.

Huber, A. B., Kania, Artur, Tran, T. S., Gu, C., De Marco Garcia, N., Lieberam, I., Johnson, D., Jessell, Thomas M, Ginty, D. D., et Kolodkin, A. L. (2005). Distinct roles for secreted semaphorin signaling in spinal motor axon guidance. *Neuron*, **48**, 949-964.

Huettl, R.-E., Soellner, H., Bianchi, E., Novitch, B. G., et Huber, A. B. (2011). Npn-1 contributes to axon-axon interactions that differentially control sensory and motor innervation of the limb. *PLoS Biol*, **9**, e1001020.

Imai, T., Yamazaki, T., Kobayakawa, R., Kobayakawa, K., Abe, T., Suzuki, M., et Sakano, H. (2009). Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science*, **325**, 585-590.

Kania, A, Johnson, R. L., et Jessell, T M (2000). Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell*, **102**, 161-173.

Kania, Artur et Jessell, Thomas M (2003). Topographic motor projections in the limb imposed by LIM homeodomain protein regulation of ephrin-A:EphA interactions. *Neuron*, **38**, 581-596.

Kao, T.-J. et Kania, Artur (2011). Ephrin-Mediated cis-Attenuation of Eph Receptor Signaling Is Essential for Spinal Motor Axon Guidance. *Neuron*, **71**, 76-91.

Kitsukawa, Takashi, Shimizu, Masayuki, Sanbo, M., Hirata, Tatsumi, Taniguchi, Masahiko, Bekku, Y., Yagi, Takeshi, et Fujisawa, Hajime (1997). Neuropilin-Semaphorin III/D-Mediated Chemorepulsive Signals Play a Crucial Role in Peripheral Nerve Projection in Mice. *Neuron*, **19**, 995-1005.

Livet, J., Sigrist, M., Stroebel, S., De Paola, V., Price, S. R., Henderson, C. E., Jessell, Thomas M., et Arber, S. (2002). ETS Gene Pea3 Controls the Central Position and Terminal Arborization of Specific Motor Neuron Pools. *Neuron*, **35**, 877-892.

Löschinger, J., Weth, F., et Bonhoeffer, F. (2000). Reading of concentration gradients by axonal growth cones. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci*, **355**, 971-982.

Luo, Y., Shepherd, I., Li, J., Renzi, M. J., Chang, S., et Raper, J A (1995). A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron*, **14**, 1131-1140.

Luria, V., Krawchuk, D., Jessell, Thomas M, Laufer, E., et Kania, Artur (2008). Specification of motor axon trajectory by ephrin-B:EphB signaling: symmetrical control of axonal patterning in the developing limb. *Neuron*, **60**, 1039-1053.

Marthiens, V., Gavard, J., Padilla, F., Monnet, C., Castellani, Valérie, Lambert, M., et Mège, R.-M. (2005). A novel function for cadherin-11 in the regulation of motor axon elongation and fasciculation. *Mol. Cell. Neurosci*, **28**, 715-726.

Mauti, O., Sadhu, R., Gemayel, J., Gesemann, M., et Stoeckli, E. T. Expression patterns of plexins and neuropilins are consistent with cooperative and separate functions during neural development. *BMC Dev Biol*, **6**, 32-32.

Meléndez-Herrera, E. et Varela-Echavarría, Alfredo (2006). Expression of secreted semaphorins and their receptors in specific neuromeres, boundaries, and neuronal groups in the developing mouse and chick brain. *Brain Res*, **1067**, 126-137.

Ming, G.-li, Wong, S. T., Henley, J., Yuan, X.-bing, Song, H.-jun, Spitzer, N. C., et Poo, M.-ming (2002). Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature*, **417**, 411-418.

Moret, F., Renaudot, C., Bozon, M., et Castellani, Valérie (2007). Semaphorin and neuropilin co-expression in motoneurons sets axon sensitivity to environmental semaphorin sources during motor axon pathfinding. *Development*, **134**, 4491-4501.

Niquille, M., Garel, S., Mann, F., Hornung, J.-P., Otsmane, B., Chevalley, S., Parras, C., Guillemot, F., Gaspar, P., Yanagawa, Y., et al. (2009). Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C. *PLoS Biol*, **7**, e1000230.

- Piper, M., Salih, S., Weigl, C., Holt, C. E., et Harris, W. A.** (2005). Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. *Nat. Neurosci*, **8**, 179-186.
- Püschel, A W, Adams, R H, et Betz, H** (1995). Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron*, **14**, 941-948.
- Raper, Jonathan A** (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, **10**, 88-94.
- Shirasaki, R. et Pfaff, Samuel L** (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu. Rev. Neurosci*, **25**, 251-281.
- Swanson, G. J. et Lewis, J.** (1982). The timetable of innervation and its control in the chick wing bud. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **71**, 121 -137.
- Takagi, S., Kasuya, Y., Shimizu, M, Matsuura, T., Tsuboi, M., Kawakami, A., et Fujisawa, H** (1995). Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev. Biol*, **170**, 207-222.
- Takahashi, T., Nakamura, F., Jin, Z., Kalb, R. G., et Strittmatter, S. M.** (1998). Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci*, **1**, 487-493.
- Tamariz, E., Díaz-Martínez, N. E., Díaz, N. F., García-Peña, C. M., Velasco, I., et Varela-Echavarría, Alfredo** (2010). Axon responses of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons to Semaphorins 3A and 3C. *J Neurosci Res*, **88**, 971-980.
- Taniguchi, M, Yuasa, S., Fujisawa, H, Naruse, I., Saga, S., Mishina, M., et Yagi, T** (1997). Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron*, **19**, 519-530.
- Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S. B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T. M., et Pfaff, S. L.** (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell*, **79**, 957-970.
- Varela-Echavarría, A, Tucker, A., Püschel, A W, et Guthrie, S** (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron*, **18**, 193-207.
- Yu, T. W. et Bargmann, C. I.** (2001). Dynamic regulation of axon guidance. *Nat. Neurosci*, **4 Suppl**, 1169-1176.

Legends

Figure 1: *Sema3* expression patterns in motoneuronal pools. (A) *In situ* hybridizations of chick spinal cord cryosections at brachial level from HH24 and HH26/27 embryos. In motoneurons, these labeling show a pool specific expression (arrowheads) of both *Sema3A* and *Sema3C* but not *Sema3F*. Scale bars: 100 μ m. (B) *In situ* hybridizations and fluorescent immunostaining against *Sema3C* and *Lim3* and *Isl1* respectively on adjacent cryosections of stage HH24 chick spinal cord at brachial and thoracic levels. Merge panels show that at brachial level, *Sema3C* is expressed in both $Lim3^+/Isl1^{low}$ pool, the MMCm, and in the ventral $Lim3^-/Isl1^{low}$ pool, the LMCm. At thoracic level, *Sema3C* is expressed in both $Lim3^+/Isl1^{low}$ MMCm pool and in the $Lim3^-/Isl1^{high}$ pool, the MMCl. Scales bars: 50 μ m. (C) *In situ* hybridizations and fluorescent immunostaining against *Sema3C* and *Lim3*, *Isl1* and *FoxP1* respectively on adjacent cryosections of stage HH26/27 chick spinal cord at brachial and thoracic levels. Merge panels show that at brachial level, *Sema3C* is expressed in the $Lim3^+/Isl1^{low}/FoxP1^-$ pool, the MMCm, as well as in the $Lim3^-/Isl1^{high}/FoxP1^+$ pool, the LMCm. Expression in the LMCm defines two populations of motoneurons: the $Sema3C^{high}$, near the MMCm and the $Sema3C^{low}$ in the rest of the motor sub-column. At thoracic level, *Sema3C* is strongly expressed $Lim3^+/Isl1^{low}/FoxP1^-$ MMCm while weakly expressed in $Lim3^-/Isl1^{high}/FoxP1^-$ pool, the MMCl. Scale bars: 50 μ m.

Figure 2: Intrinsic *Sema3C* modulates *Nrp1* and *Nrp2* availability at the growth cone surface. (A) Histogram showing the diversity of cell surface *Nrp1* and *Nrp2* fluorescence levels in control EGFP electroporated growth cones. (B,C) Histograms showing cell surface *Nrp1* and *Nrp2* fluorescence in control EGFP and *Sema3CiresEGFP* electroporated growth cones. Growth cones were classified in four categories depending on their fluorescence level. **, $p < 0,01$ with χ^2 test. (D, E) Histograms showing cell surface *Nrp1* fluorescence in control

EGFP and Sema3CiresEGFP electroporated growth cones. Fluorescence intensities were normalized to EGFP+ conditions. ***, $p < 0,001$, ns, non significant, with χ^2 test. (F-I) Nrp1, Nrp2 and NgCam immunostaining of EGFP+ and EGFP- growth cones of Sema3CiresEGFP and CtrlEGFP explants, without membrane permeabilization (F, G) and with membrane permeabilization (H, I). Scale bars: 10 μm .

Figure 3: Intrinsic Sema3C impacts the growth cone collapse response of motoneurons to repulsive Sema3C, 3A and 3F. (A) Morphology of Sema3CiresGFP electroporated growth cones labeled phalloïdin TRITC after collapse assays with control, Sema3C, Sema3A or Sema3F conditioned medium (^{CM}). Scale bar: 10 μm . (B) Histogram showing collapse percentages of growth cones electroporated (+) or non electroporated (-) either with EGFP or Sema3ciresGFP construct and treated with Control, Sema3C, Sema3A or Sema3F conditioned medium (^{CM}). Here, half a dose of Sema3F^{CM} was used for the collapse assays. The number of growth cones examined in each condition is indicated on the respective bars and results from at least two independent collapse assays. **, $p < 0,001$, ns, non significant, with χ^2 test.

Figure 4: Motoneuronal Sema3C takes part in motor tract compaction at the exit of the spinal cord. (A) Upper panel shows EGFP expression in HH24 cryosections from electroporated chick embryos Middle panel shows Neurofilament (NF) immunostaining on HH24 chick cryosections. Lower panel shows islet 1/2 immunostaining on HH24 chick sections. Modifications of neither the motoneuron positions nor their projections could be detected (arrowheads)a. Green bars indicate the electroporated side. Scale bar: 100 μm . (B) Schematic representation of motor projections exiting the spinal cord in *in toto* HH24 chick embryos. (C) Effects of Sema3ciresEGFP and Si Sema3C electroporation on spinal motor tracts fasciculation (yellow bracket). NgCam immunolabeling performed on *in toto* HH24 embryos

showing that manipulations of Sema3C levels affect the compaction of the motor tracts. Green bars indicate electroporated side. Scale bar: 100 μ m. (D,E) Histograms showing normalized motor tract width in EGFP versus Sema3CiresEGFP or Si Control versus Si Sema3C electroporated embryos. . ***, $p < 0,001$ with Mann-Whitney test.

Figure 5: The chick forelimb: a model for stereotyped motor projections in a complex Sema3 environment. (A) Procedure to obtain a composite image of the limb innervation from three different embryos. (B) Projected confocal stacks of NgCam labeled chick forelimb. The composite image shows the highly stereotyped projections pattern of the motor tracts in the limb. Scale bar: 100 μ m. (C) *In situ* hybridizations of Sema3C, 3A and 3F in chick whole mounted forelimb and limb cryosections. Dorso-Ventral, Medio-Lateral and Anterio-Posterior orientations are indicated on the upper panels. Scale bar cryosections: 100 μ m. Scale bar whole mounted: 500 μ m. (D) Schematic representation of the environmental Semaphorin code in the chick forelimb on NgCam labeled chick HH26 cryosection.

Figure 6: Intrinsic Sema3C takes part in the stereotyped projection pattern of the chick forelimb. (A) Procedure to obtain composite images of the limb innervation from electroporated and control sides of an embryo. (B) Projected confocal stacks of NgCam labeled chick forelimbs electroporated with either SiRNA or Sema3CiresEGFP preparations. Down regulation of intrinsic Sema3C leads to altered projection patterns of the ventral tracts in the forelimb, the median nerve. Scale bar: 100 μ m. (C) Graph showing the distribution of mismatch level for the superimposition of the ventral nerves projection pattern in Si Control versus Si Sema3C conditions. Embryos were classified according to the level of mismatch observed in the superimposition of the control and electroporated nerve patterns. The red line indicates the average mismatch level for each condition: 6.8/20 for the Si Control condition

and 15/20 for the Si Sema3C condition. (D) Graph showing the distribution of mismatch level for the superimposition of the dorsal nerves projection pattern in Si Control versus Si Sema3C conditions. The red line indicates the average mismatch level for each condition: 10.9/20 for the Si Control condition and 10/20 for the Si sema3C condition. (C, D) Embryos were classified according to the level of mismatch observed in the superimposition of the control and electroporated nerve patterns. Scale goes from 1 for a perfect overlap to 20 for a highly mismatched overlap, 11 Si Control electroporated embryos and 9 Si Sema3C ones were analyzed here. **, $p < 0,01$, ns, non significant with Mann-Whitney test.

Figure 7: (A) Scheme presenting the stereotyped projections of specific motor pools in the limb. (B) Scheme presenting the interplay between intrinsic and environmental Sema3s expressions for a fine-tuning of motoneurons' projection pattern in the forelimb.

Supplemental Figure S1: *Gain and loss-of-function of Sema3C are obtained by in ovo electroporation of the neural tube of chick embryos.* (A) Schematic representation of chick *in ovo* electroporation. (B) *In situ* hybridization of chick cryosections of Sema3C at stage HH24. Si Sema3C cocktail electroporation significantly down regulates Sema3C expression in the spinal cord, including in motoneurons (red arrow head). Sema3CiresEGFP electroporation leads to an overall Sema3C overexpression in the whole spinal cord, including in motoneurons (red arrow head). Scale bars: 100 μ m.

Supplemental Figure S2: Sema3C down-regulation doesn't lead to motoneuron death. Activated Caspase 3 immunofluorescence on HH24 chick cryosections didn't show any enhancement of cell death after SiRNA electroporation. Green bars indicate the electroporated side. Scale bar: 100 μ m.

Supplemental Figure S3: Examples of projected confocal stacks of NgCam labeled chick forelimbs electroporated with either Si Control or Si Sema3C preparations. Down regulation of intrinsic Sema3C leads to altered projection patterns of the ventral tracts in the forelimb in all the embryos presented. However, projection patterns of the dorsal tracts, obtained from the same confocal acquisitions, remain the same. Scale bar: 100 μ m.

Figure 1

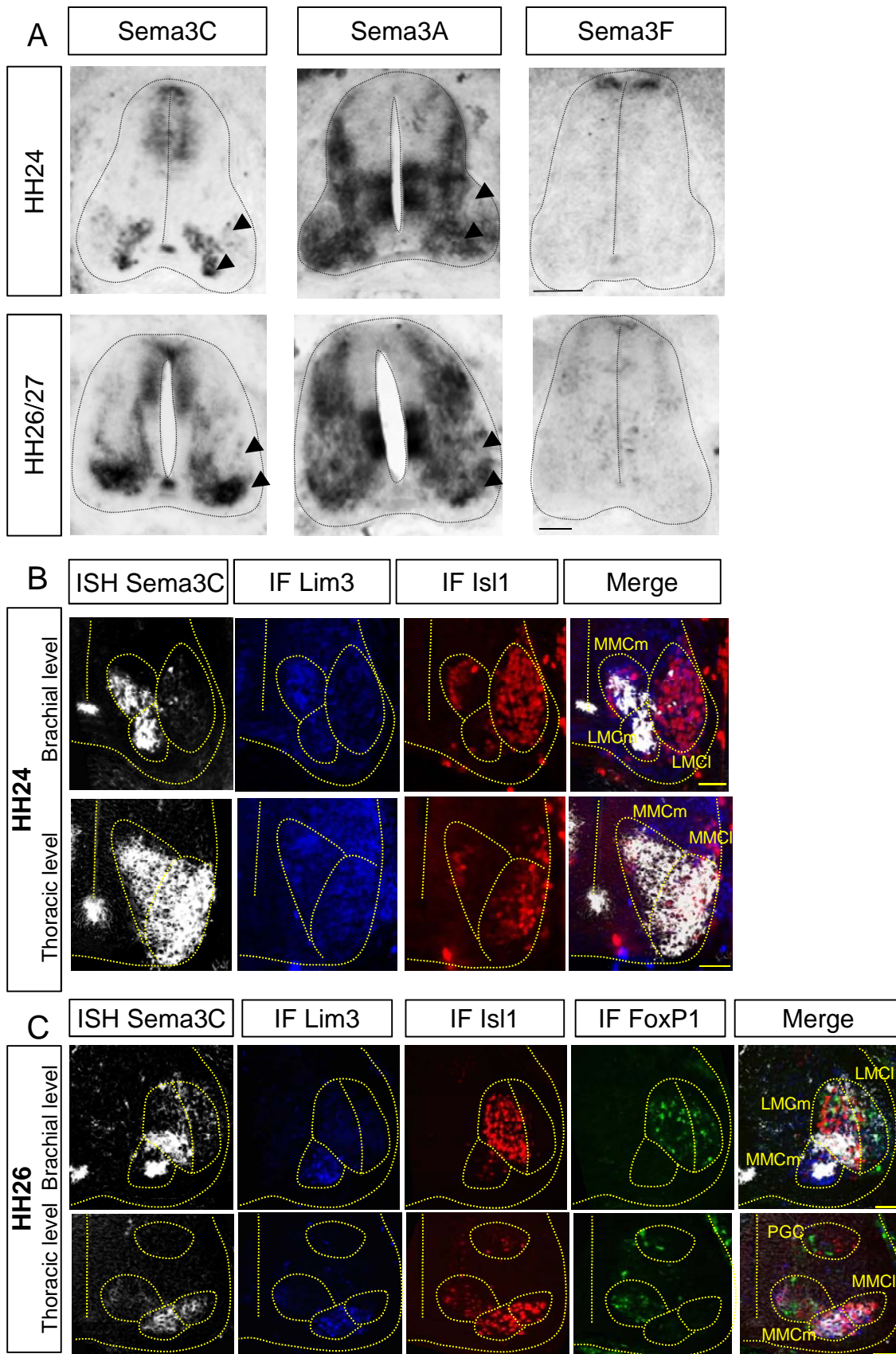


Figure 2

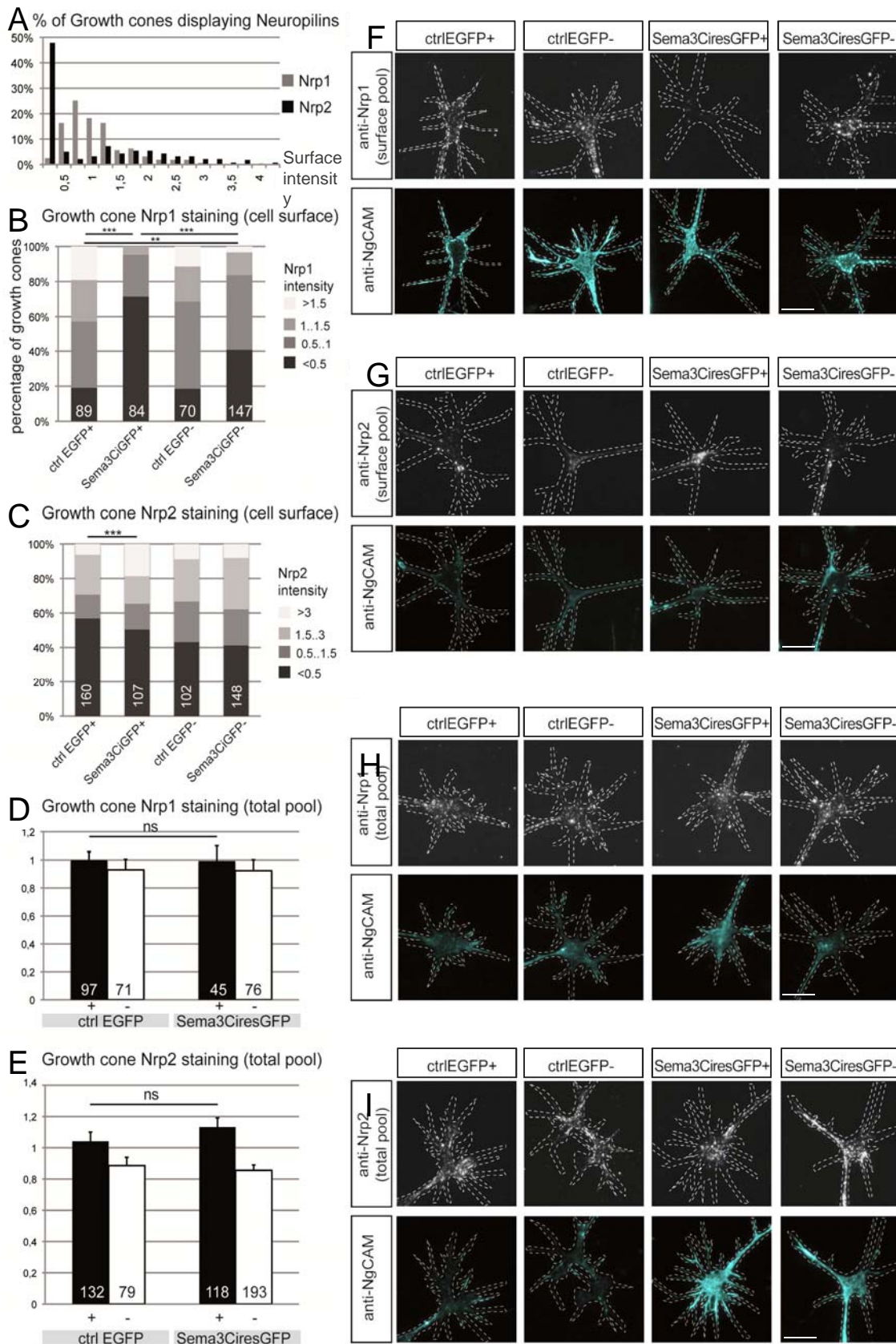


Figure 3

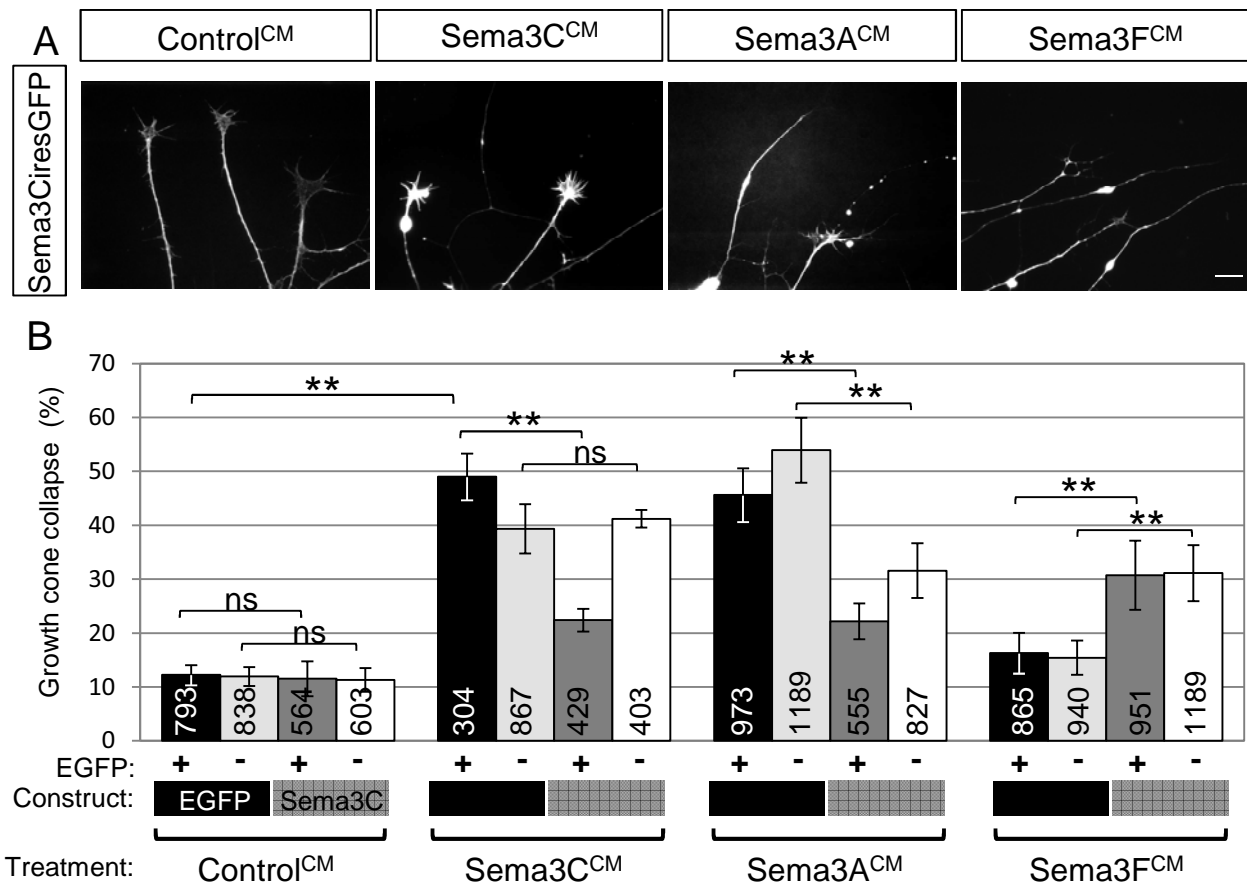
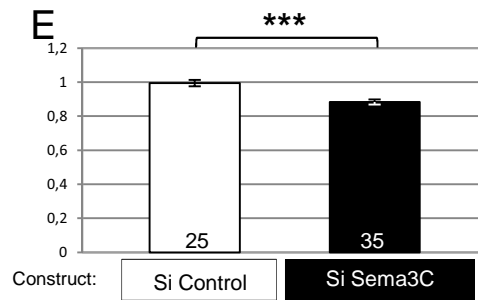
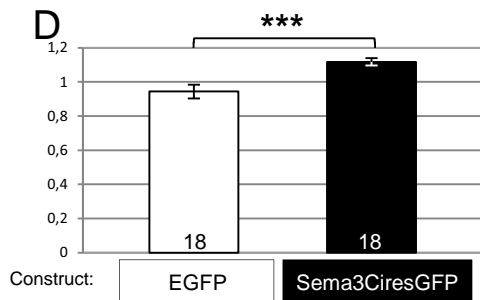
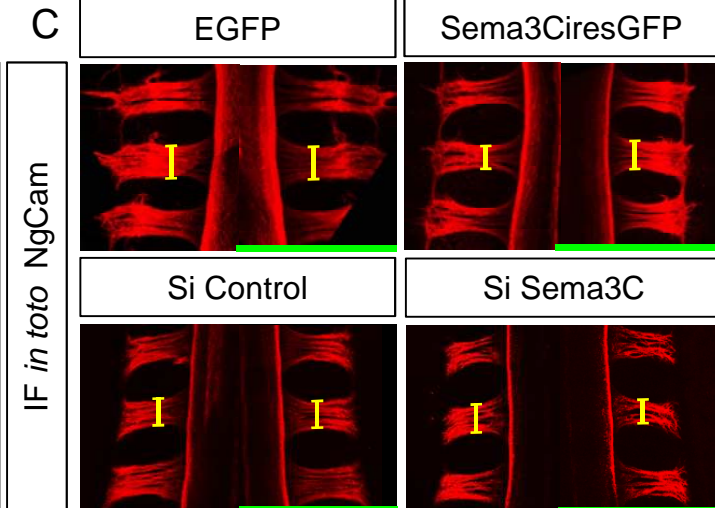
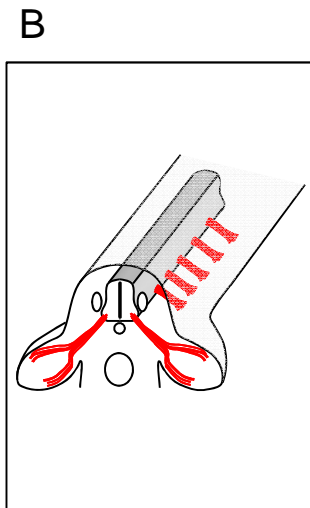
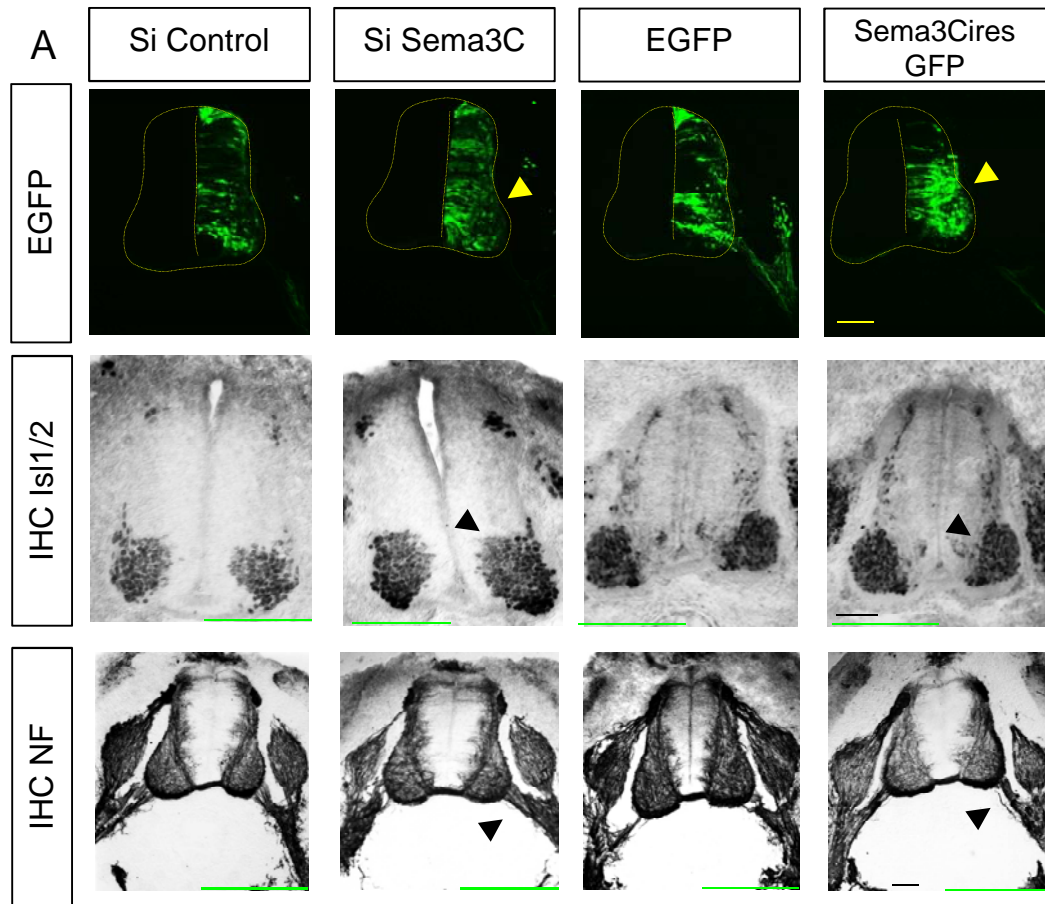


Figure 4



Normalized motor tract width

Normalized motor tract width

Figure 5

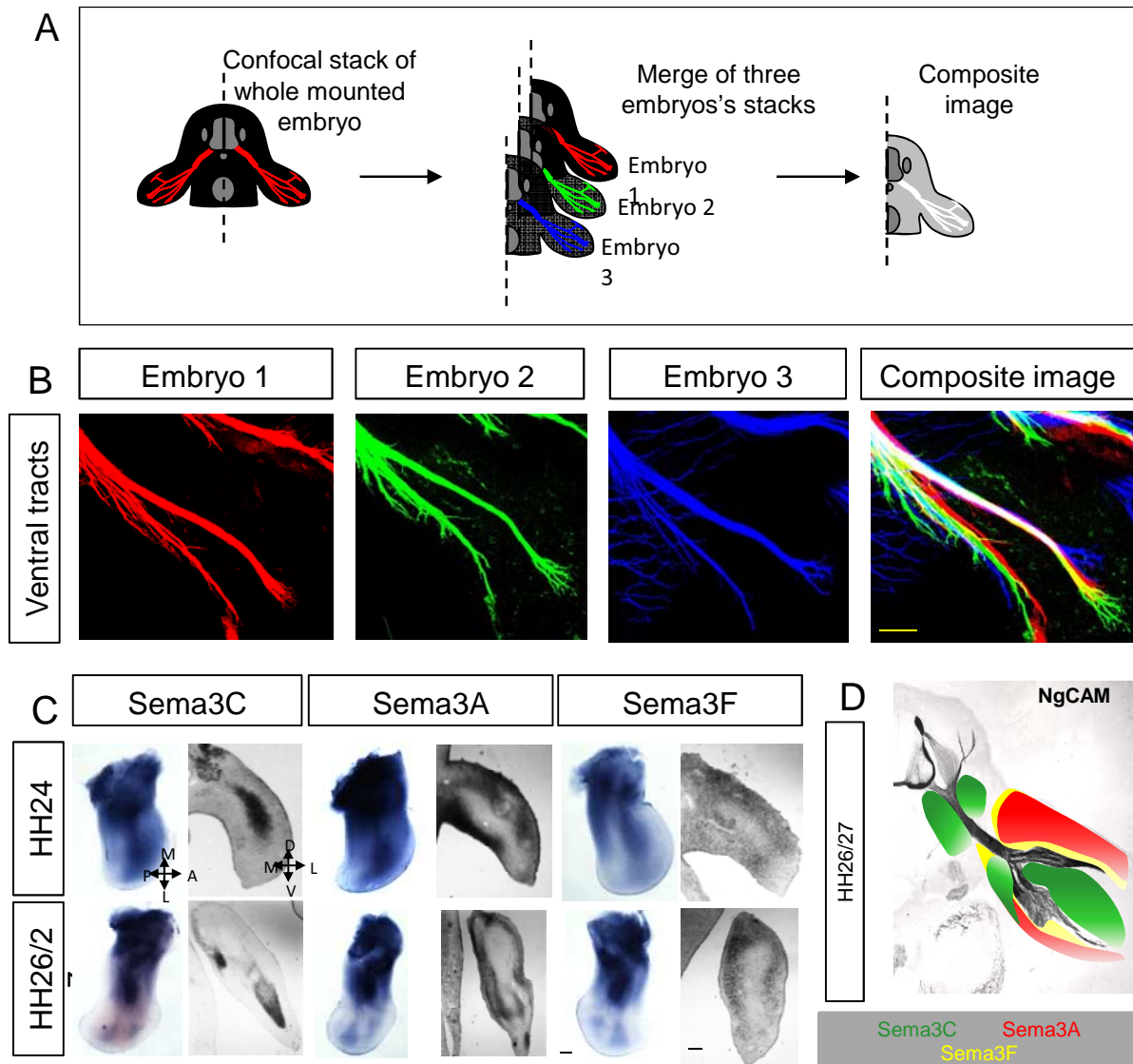


Figure 6

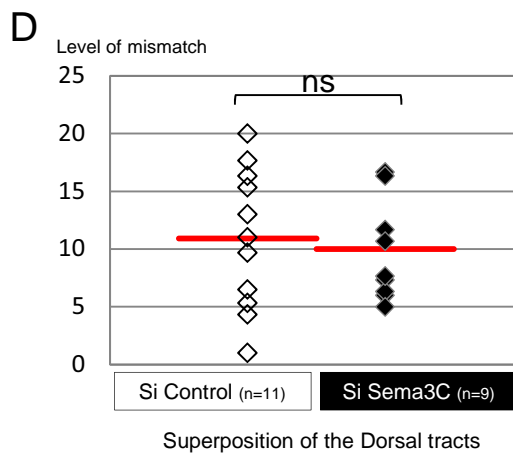
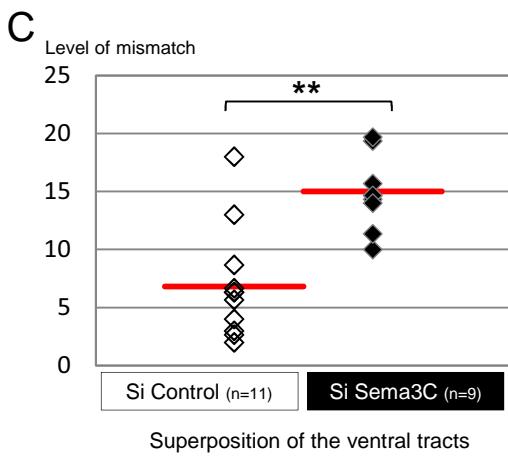
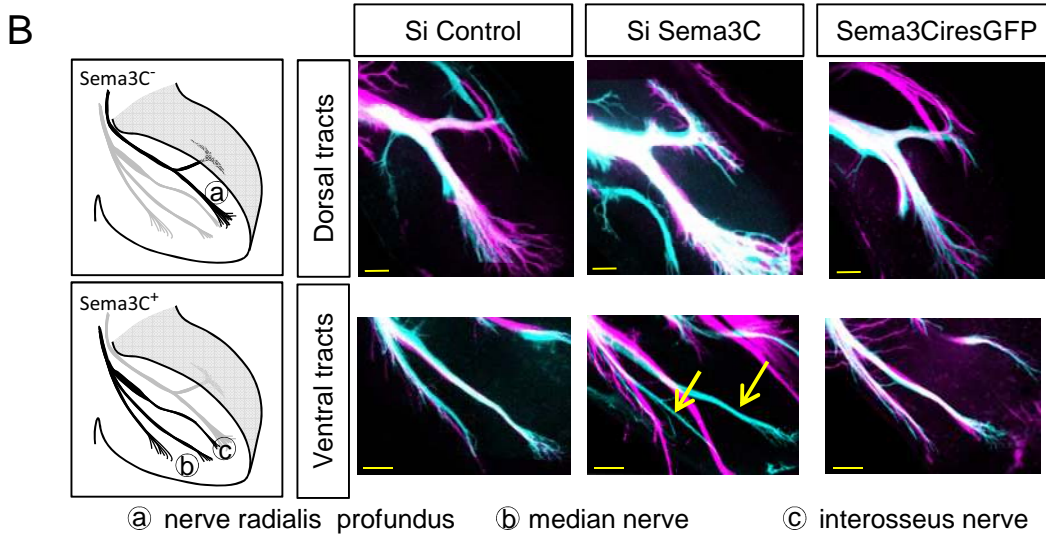
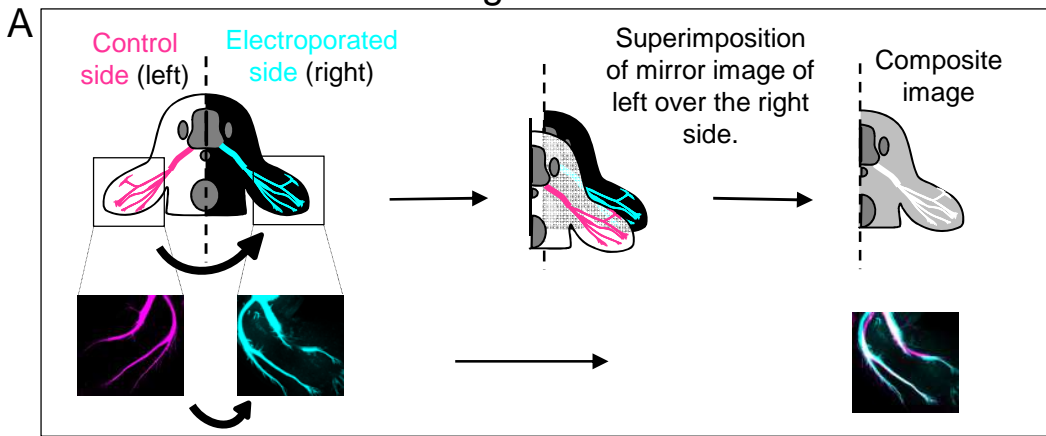


Figure 7

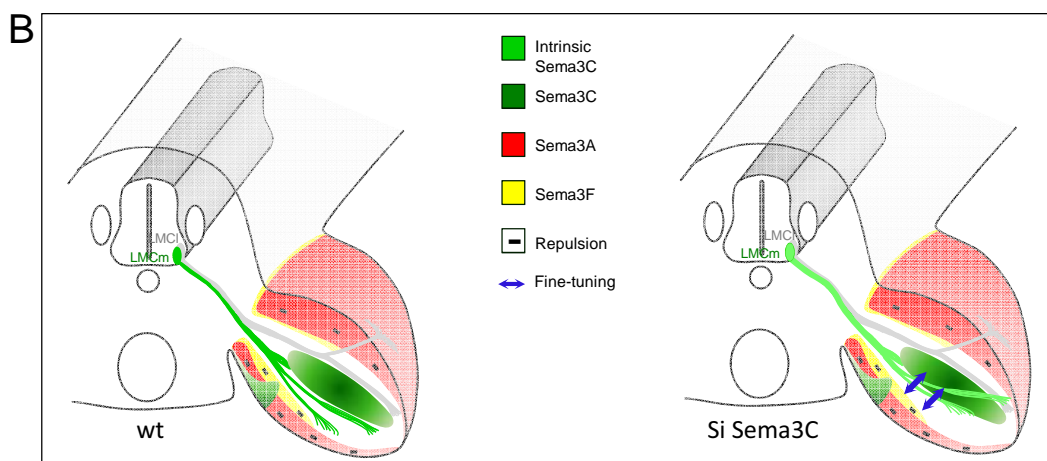
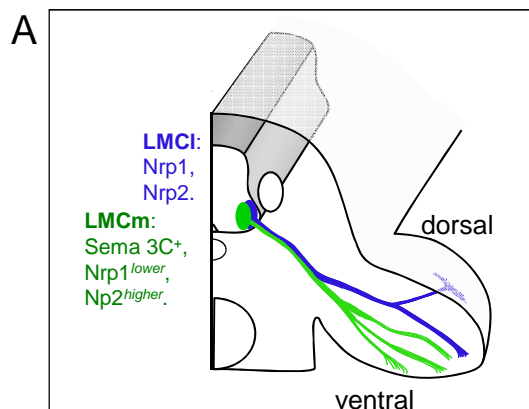


Figure S1

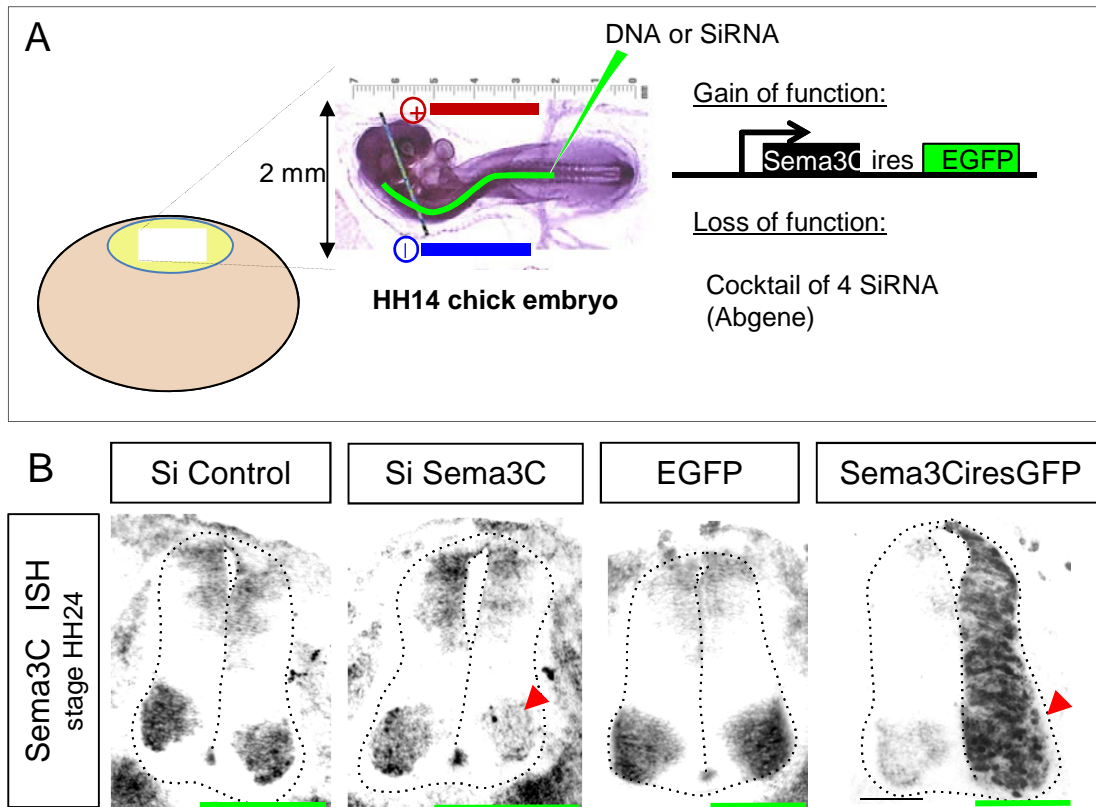


Figure S2

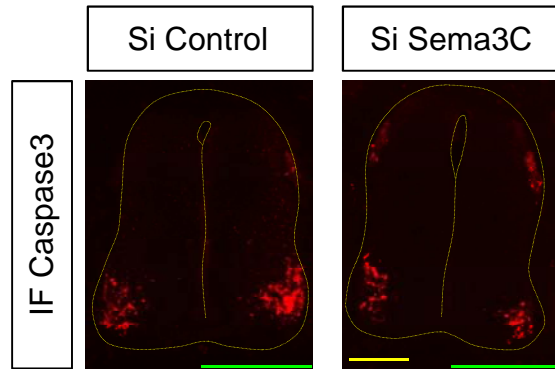
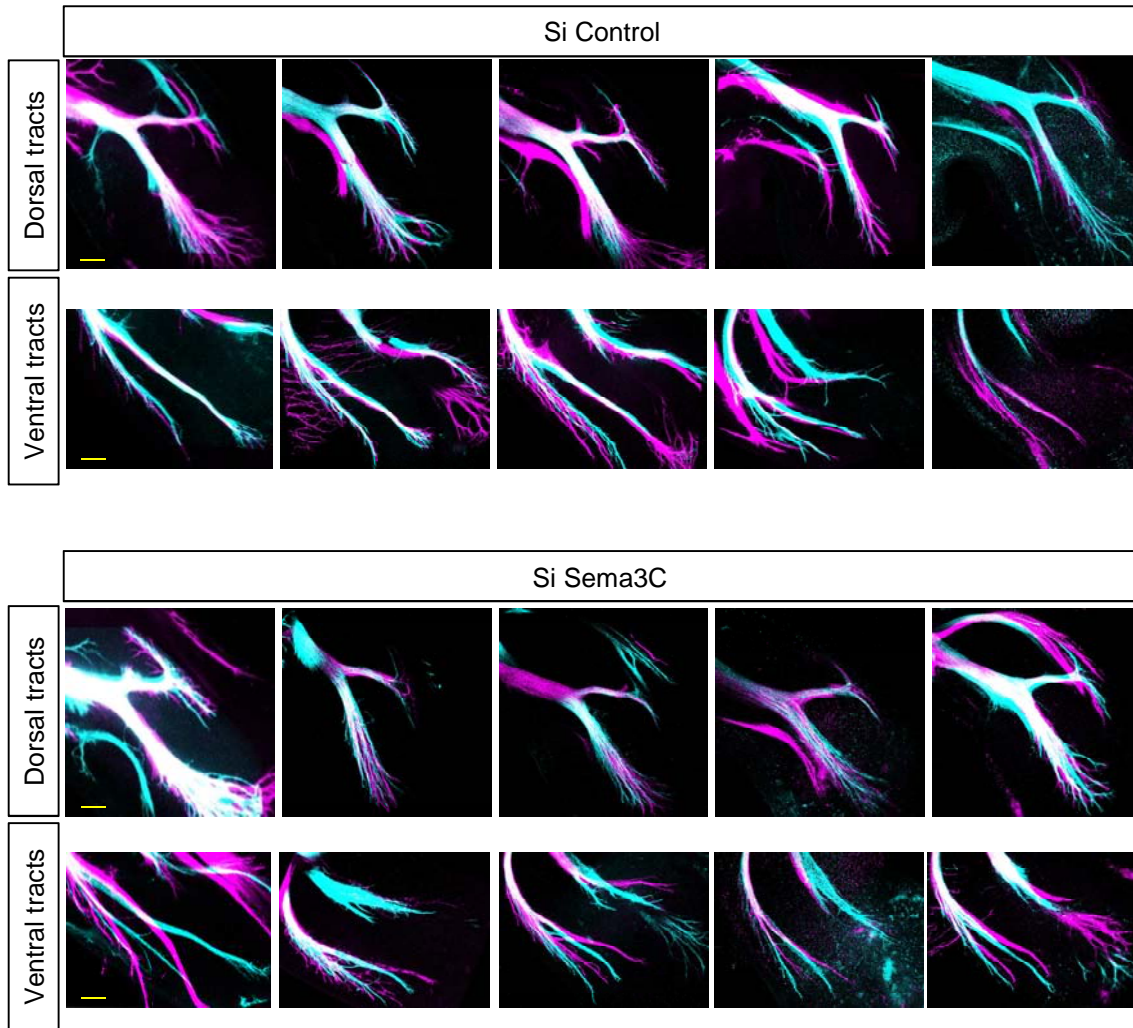


Figure S3



III Sémaphorines et progéniteurs neuraux : mise en évidence d'un code Sema dans la zone ventriculaire

Lors des premières étapes de l'étude de l'expression des différentes Sema dans la moelle épinière, j'ai eu l'occasion de mettre en évidence l'existence d'un code d'expression complémentaire au code Sema des motoneurones dans la moelle épinière. En effet, la moelle épinière est subdivisée en deux zones au cours du développement : la zone des progéniteurs neuraux, ou zone ventriculaire (ZV), et la zone de résidence des neurones différenciés ou zone du manteau (ZM) (Fig. 19). Au sein de la ZV se trouve l'ensemble des progéniteurs neuraux, organisés en domaines spécifiques dans l'axe dorso-ventral, et qui, par des mitoses successives, vont donner naissance aux futurs neurones différenciés de la moelle épinière. L'organisation dorso-ventrale des progéniteurs du tube neural est spécifiée par des combinaisons de facteurs de transcription qui, en conférant des identités distinctes aux progéniteurs, permettent l'émergence des différents sous-types neuronaux (Fig. 19). L'activation de ces facteurs de transcription est elle-même contrôlée par différents morphogènes comme Sonic Hedgehog et les BMPs émanant de territoires dorsaux et ventraux adjacents au tube neural. Cette cascade d'activation par les morphogènes et facteurs de transcription contrôle une série de processus de prolifération, survie, migration et différenciation, qui permet la transition d'un neuroépithélium simple en moelle épinière. Or, au cours de la mise en place des différentes populations neuronales de la moelle épinière, nous avons mis en évidence l'existence d'une combinaison d'expression de différentes Sémaphorines dans les progéniteurs neuraux.

Par des hybridations *in situ* réalisées sur des coupes cryostat d'embryons de poulet, nous avons en effet pu voir l'expression de différentes Sémaphorines dans la ZV de la moelle épinière. Parmi celles-ci, on retrouve par exemple Sema3A, Sema3C, Sema3B, Sema3F, Sema5B, Sema6A et Sema6D (Fig. 20). Certains domaines d'expression de ces différentes Sema se superposent, et la combinaison de ces expressions apparaît définir un véritable code d'expression de Sémaphorines dans les progéniteurs spinaux (Fig. 20). Afin de préciser ces combinaisons de Sema, le patron d'expression de deux d'entre elles, Sema3A et Sema3C a été étudié plus en détail. Pour cela, nous avons eu recours à des hybridations *in situ* fluorescentes,

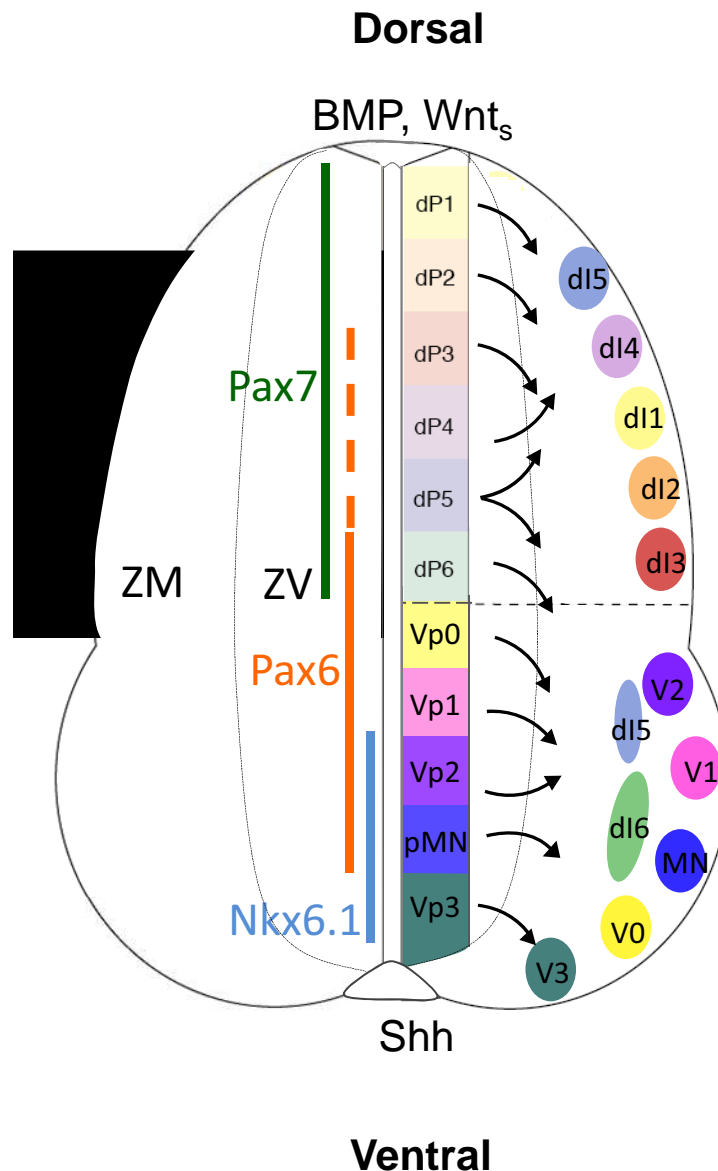


Figure 19: Représentation schématique des différents domaines progéniteurs et post-mitotiques des la moelle épinière. La zone ventriculaire (ZV) est composée de six domaine progéniteurs dans la partie dorsale de la moelle épinière et de cinq domaine progéniteurs dans la partie ventrale. Les différents domaines sont issus d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription, sous l'action des facteurs morphogènes de la plaque du plancher et de celle du toit (Shh, BMP, Wnt). Quelques exemples de facteurs de transcription sont donnés ici comme celle de Pax7 dans tous les domaines progéniteurs dorsaux, de Pax6 dans des domaines dorsaux et ventraux, et de Nkx6.1 dans les trois domaines les plus ventraux de la moelle épinière. Chaque domaine progéniteur donne naissance à une population neuronale post-mitotique qui va migrer pour prendre une place spécifique dans la zone du manteau (ZM). D'après Helms et al., 2003; Gomez-Skarmeta et al., 2003

grâce à une révélation non pas en NBT/BCIP, mais en Fast Red. Nous avons également réalisé des doubles marquages fluorescents entre ces deux Sémaphorines et des facteurs de transcription délimitant de grandes subdivisions de la ZV : Pax6, Pax7 et Nkx6.1. Ces doubles marquages nous ont permis de déterminer que Sema3A est exprimé depuis le domaine progéniteur dorsal (dP6) jusqu'au domaine progéniteur des motoneurones (pMN) tandis que Sema3C est exprimé dans tous les domaines progéniteurs dorsaux (Fig. 21). Ainsi, si le patron d'expression de ces deux Sema semble à première vue complémentaire, elles sont cependant co-exprimées dans le domaine dP6. Par des doubles hybridations *in situ*, nous avons pu confirmer cette expression des deux Sema dans un même domaine progéniteur (Fig. 21). Cependant, étant donné que l'une des deux révélations des hybridations *in situ* est faite en NBT/BCIP, assez opaque (transformé sur la figure en fausse couleur, vert) alors que l'autre est réalisée en Fast Red, fluorescent, nous n'avons pas pu déterminer si des progéniteurs co-expriment ces deux. Cependant, au vu des co-expressions observées dans les motoneurones, il est probable que certains progéniteurs neuraux puissent d'exprimer ces deux Sema en même temps.

En conclusion, ces résultats révèlent l'existence de différents domaines de co-expression de Sémaphorines au sein des progéniteurs neuraux, permettant de définir un véritable code Sémaphorine dans la zone ventriculaire de la moelle épinière. Ces observations ont conduit mon équipe à explorer plus avant la fonction de ce code. Ce projet est actuellement mené par une doctorante, Elise Arbeille. Je ne détaillerai pas plus avant ce projet, dans lequel je participe par la réalisation d'expérimentations sur le modèle de l'embryon de poulet.

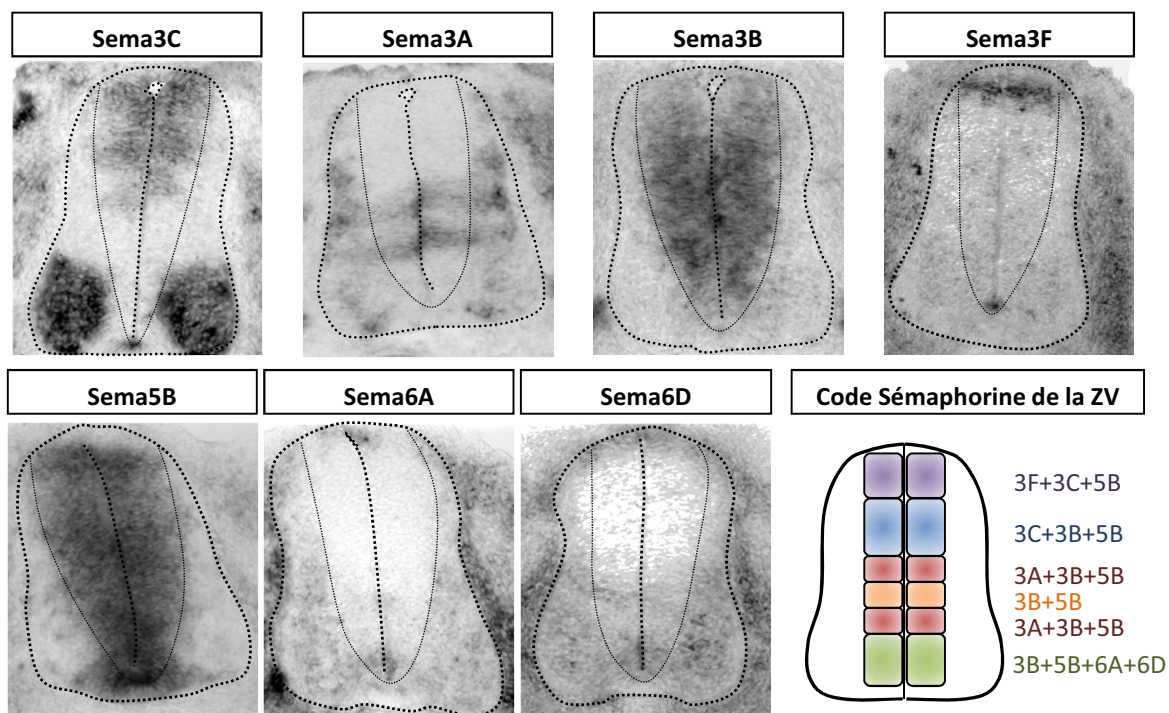


Figure 20: Mise en évidence d'un code Sémaphorine dans la zone ventriculaire de la moelle épinière en cours de développement. Des hybridations *in situ* de différents membres des Sémaphorines, sur des coupes cryostat de 20 μ m d'embryons de poulet au stade HH21, permettent de mettre en évidence des co-expression de différentes Sema dans la zone ventriculaire (ZV) de la moelle épinière. Ces co-expressions identifient des domaines distinctes de la ZV, et définissent ainsi un code Sema, par analogie avec le code de facteurs de transcription décrit dans la ZV de la moelle épinière.

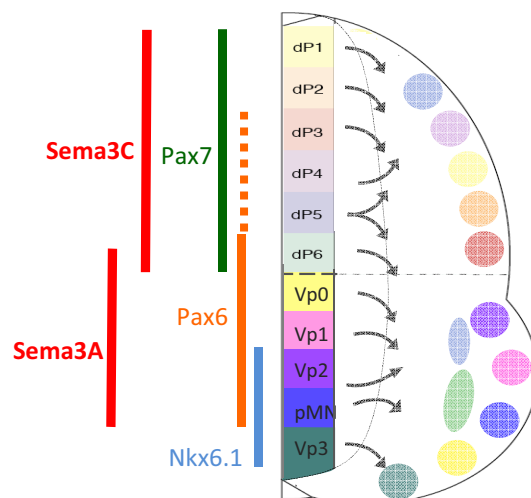
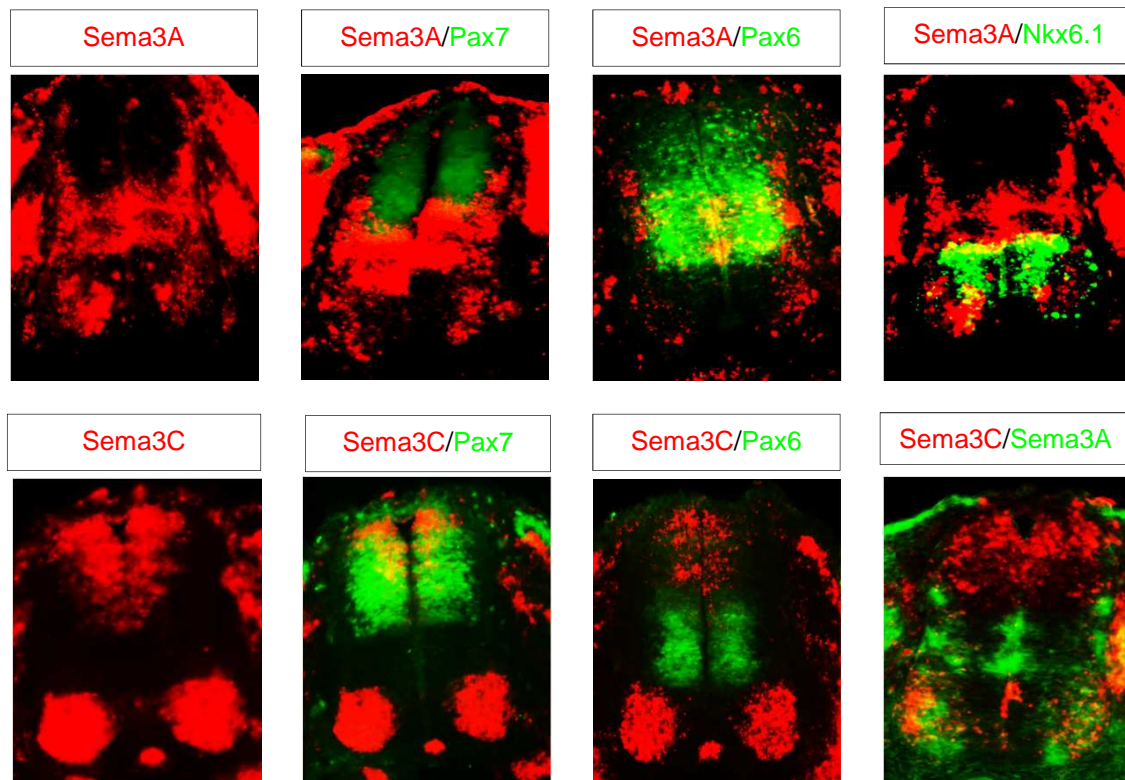


Figure 21: Sema3A et Sema3C définissent deux domaines progéniteurs chevauchants dans la zone ventriculaire. Des hybridations *in situ* fluorescentes permettent de localiser précisément les domaines d'expression de Sema3A et Sema3C dans la zone ventriculaire d'embryons de poulet au stade HH21. Des co-marquages avec différents facteurs de transcription (Pax6, Pax7 et Nkx6.1) révèlent une expression de Sema3A depuis le domaine dP6 (domaine Progéniteur Dorsal 6) jusqu'au domaine pMN (domaine des progéniteurs de MotoNeurones), tandis que Sema3C est exprimé dans tous les domaines progéniteurs dorsaux. Par ailleurs, une double hybridation *in situ* de Sema3A et Sema3C montre que leur domaines d'expression se chevauchent partiellement dans le domaine dP6. Le schéma présenté ci-dessus récapitule ces informations d'expression de Sema3A et Sema3C dans la zone ventriculaire de la moelle épinière.

CHAPITRE III : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude réalisée au cours de cette thèse permet de proposer qu'un code Sémaphorine dans les motoneurones régule le guidage des projections motrices. Nos résultats montrent que l'expression intrinsèque de Sema3C par les motoneurones de la LMCm contrôle la trajectoire stéréotypée de la branche motrice correspondante. Cette branche est positionnée par des gradients moléculaires de Sémaphorines 3A, 3C, 3F, dont l'interprétation précise nécessite une contribution de Sema3C intrinsèque (Fig. 22). Celle-ci s'exerce par la régulation fine de la disponibilité en récepteurs Nrp1 et Nrp2 à la surface des cônes de croissance des axones moteurs. Cette étude met également en évidence un rôle de Sema3C dans la fasciculation des nerfs spinaux dans l'hémi-sclérotome antérieur. Ces résultats, combinés à des résultats obtenus précédemment dans l'équipe, permettent de proposer un rôle de la modulation de réponse des axones moteurs aux signaux de guidage Sema3 de l'environnement.

1) Mécanismes de modulation de réponse par l'expression de Sema3 intrinsèque

Nous avons montré que l'expression intrinsèque de Sema3C par les motoneurones conduit à une régulation du niveau de Nrp1 et Nrp2 à la surface du cône de croissance. De même, l'étude précédente, menée par Moret et collaborateurs, a révélé que l'expression intrinsèque de Sema3A par les motoneurones permet aussi une régulation du niveau de Nrp1 à la surface des cônes de croissance (Moret et al., 2007). Or ces deux études ont montré que la quantité totale de récepteurs dans ces axones reste inchangée. De nombreuses questions se posent quant aux mécanismes par lesquels les Sema3 intrinsèques régulent les niveaux de surface des récepteurs.

- a. Les Sema3 intrinsèques ont-elles besoin d'être secrétées pour moduler le niveau de récepteur à la surface du cône de croissance ?

Les Sema3 sont connues pour être des protéines secrétées, et cette sécrétion est nécessaire pour l'attraction ou la répulsion des axones. Cependant, le manque d'anticorps efficace dirigé contre les Sema3, et le fait que les candidats soient produits à la fois par les neurones et par leur environnement rend difficile l'étude de

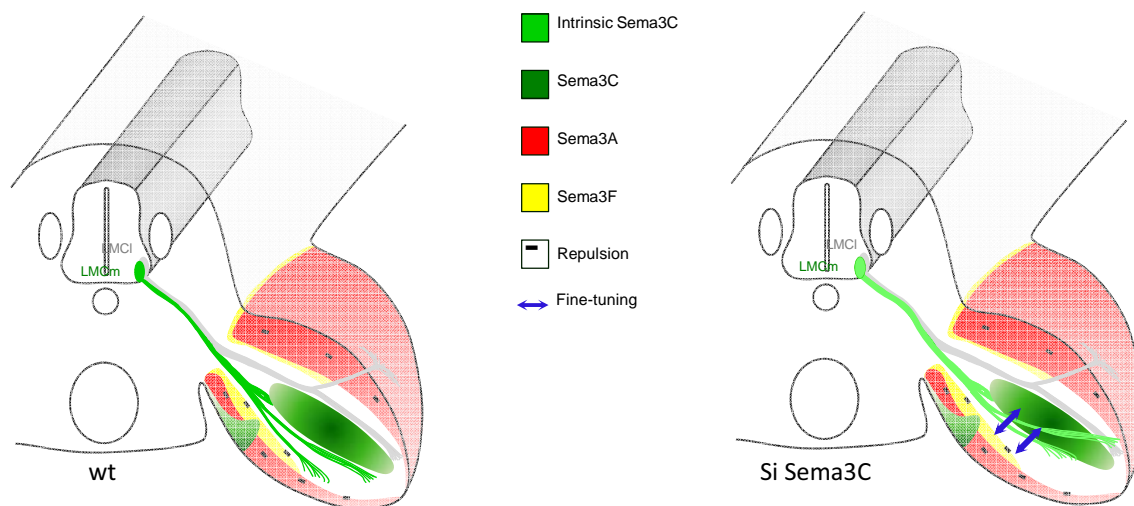


Figure 22: Représentation schématique des projections motrices stéréotypées dans le membre dans la condition sauvage et après invalidation de Sema3C. L'invalidation de Sema3C dans les motoneurones conduit les faisceaux moteurs issus de la sous-colonne motrice LMCm à se repositionner dans le membre, au cours de leur parcours final jusqu'à leur cible d'innervation.

la localisation des protéines Sema3 produites par les motoneurones. Toutefois, dans les expériences de surexpression, dans l'embryon de poulet, de formes étiquetées de Sema, on peut observer la présence d'un marquage tout le long des nerfs. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'avoir recours à un outil utilisé récemment par de Wit et collaborateurs : la pHluorine (de Wit et al., 2009). Ces auteurs ont utilisé une GFP dite pHluorine ecliptique, c'est-à-dire une GFP sensible aux pH acides, et qui ne fluoresce que dans des conditions de pH neutre comme à la membrane plasmique. De Wit a ainsi montré que Sema3A exprimé par des neurones en culture, peut être adressé et maintenu à la membrane plasmique grâce à l'interaction de son domaine basique avec les protéoglycanes de la matrice extracellulaire (de Wit et al., 2009). Il existe aussi une GFP dite pHluorine ratiométrique, qui change de couleur selon le pH du compartiment dans lequel elle se trouve et permettrait ainsi de suivre le trafic intracellulaire des Sema3 jusqu'à leur sécrétion dans l'environnement (Ashby et al., 2004). L'électroporation en faible dose de protéines fusion Sema3C::pHluorine ou Sema3A::pHluorine pourrait permettre de suivre spécifiquement l'adressage de ces Sema3 intrinsèques et éventuellement de les co-localiser avec d'autres partenaires du complexe récepteur dans les motoneurones. Cependant, il est possible que la surexpression de Sema3 intrinsèque, même en très faible quantité, modifie le système de régulation de l'adressage à la membrane puisqu'elle pourrait déjà constituer une surcharge nécessitant le recours à une voie alternative d'adressage.

Afin de déterminer si la sécrétion des Sema3 est nécessaire à leur rôle modulateur, il semble donc approprié de bloquer leur sécrétion et de tester si les régulations de récepteurs sont alors toujours observées. Cependant, les protéines secrétées et transmembranaires partagent des voies de trafic intracellulaire communes (réticulum endoplasmique rugueux, Golgi, vésicules d'exocytose), et si certaines étapes des voies d'adressage sont différentes, rien n'est connu à ce jour concernant les Sema. Ainsi, il n'est pas envisageable d'interférer directement avec la voie de sécrétion de Sema3C sans impacter l'adressage de ses récepteurs Nrp à la membrane. Il faudrait alors réaliser une mutation de Sema3C, qui perturbe sa sécrétion et donc sa présence dans l'environnement du cône de croissance, sans impacter ses capacités d'interactions avec les récepteurs. Les travaux précédemment cités de de Wit et collaborateurs nous suggèrent qu'en perturbant la rétention de Sema3C à la membrane, par une mutation de son domaine basique ou

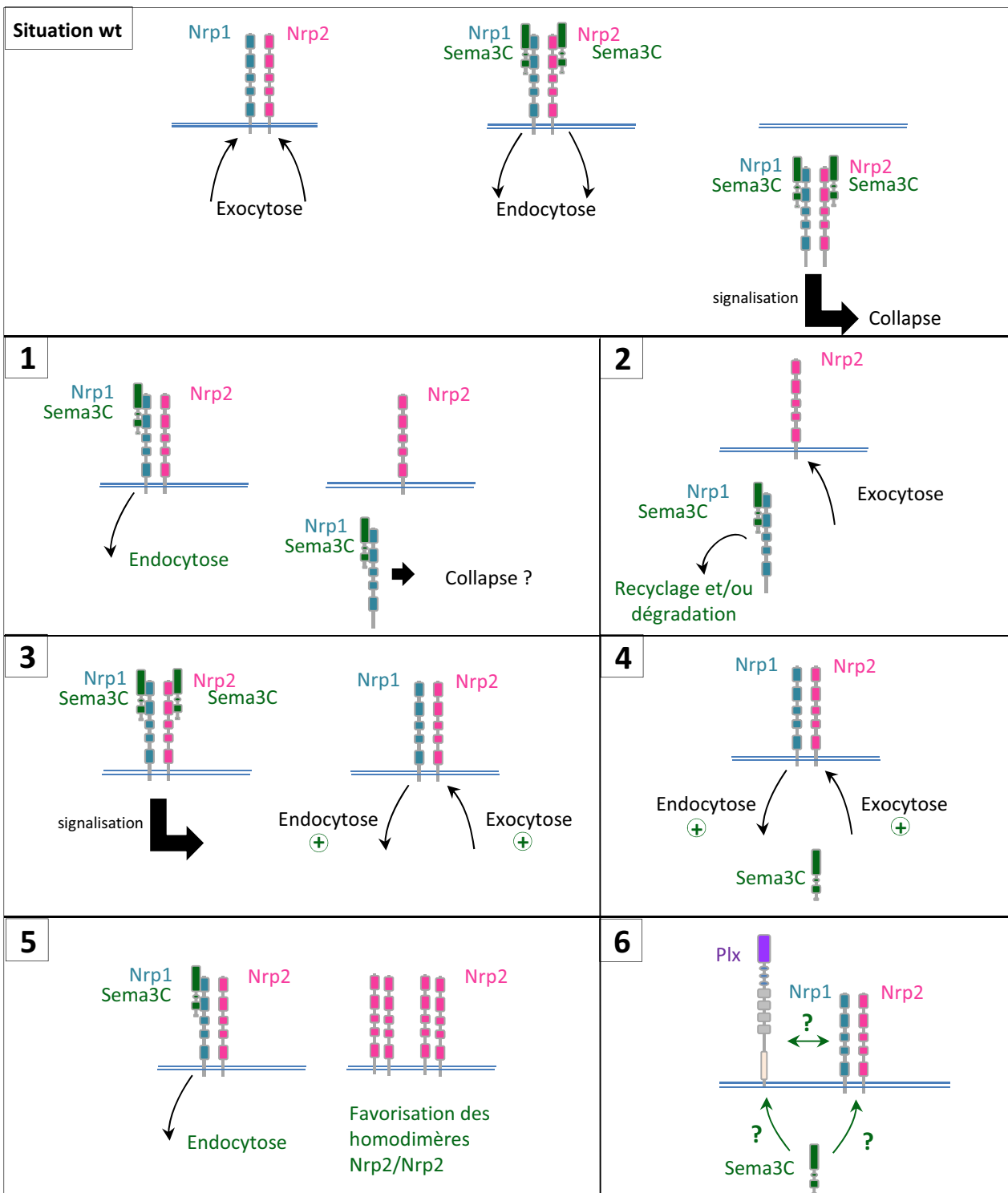


Figure 23: Mécanismes possibles de régulation des niveaux de Neuropilines par Sema3C intrinsèque, à la surface du cône de croissance des motoneurones. Dans la situation sauvage (situation wt), les Neuropilines sont adressées à la membrane par exocytose, et peuvent alors fixer la Sema3C présente dans leur environnement. Cet engagement des Nrp conduit à leur endocytose pour permettre la signalisation nécessaire à la réponse de collapse. Lorsque Sema3C est présent dans les motoneurones, on observe une diminution de Nrp1 et une augmentation de Nrp2 à la surface du cône de croissance. **1:** La fixation préférentielle de Sema3C intrinsèque sur Nrp1 conduit à son endocytose, mais sans induire de réponse de collapse à long terme. **2:** L'interaction préférentielle de Nrp1 avec Sema3C dans le cône de croissance-même le conduit vers des voies de recyclage ou de dégradation. **3:** La fixation de Sema3C intrinsèque sécrétée dans l'environnement conduit à une régulation différentielle de l'endocytose de Nrp1 et de l'exocytose de Nrp2. **4:** La fixation de Sema3C intrinsèque au sein du cône de croissance conduit à une régulation différentielle de l'endocytose de Nrp1 et de l'exocytose de Nrp2. **5:** L'endocytose de Nrp1 grâce à sema3C intrinsèque favorise la formation d'homodimères de Nrp2 et donc sa concentration à la surface du cône de croissance. **6:** Sema3C intrinsèque pourrait réguler les Nrp par l'intermédiaire des Plexines, et inversement.

un traitement par des enzymes dégradant les protéoglycanes, il serait possible de tester si la sécrétion et donc la rétention à la membrane sont nécessaires à la modulation du taux de Nrp1 et Nrp2 par les Sema3 intrinsèques.

b. Quel est le mécanisme de modulation du niveau de Nrp1 et Nrp2 à la surface du cône de croissance ?

La présence de Nrp1 et Nrp2 à la surface du cône de croissance nécessite une exocytose de ces récepteurs. Cependant, ils sont internalisés par endocytose lors de la fixation d'une Sémaphorine. Il a d'ailleurs été montré que l'endocytose du complexe récepteur initie la réponse de collapse induite par la fixation d'une Sema répulsive, comme par exemple Sema3A (Fournier et al., 2000; Castellani et al., 2004). De façon intéressante, notre étude montre que l'expression intrinsèque de Sema3C conduit à une modulation différentielle de ses récepteurs, avec une diminution de Nrp1 mais une augmentation de Nrp2 à la surface du cône de croissance. Il est tout d'abord envisageable que la baisse de Nrp1 et l'augmentation de Nrp2 à la surface du cône de croissance des motoneurones Sema3C⁺ soient imputables à une régulation différentielle de l'endocytose et de l'exocytose de Nrp1 et Nrp2 à la membrane du cône (Fig. 23). En effet, lors de la liaison du ligand Sema3A sur son complexe récepteur L1/Nrp1/PlxA1, il a été montré que l'ensemble du complexe est alors internalisé par une endocytose dépendante de la Clathrine (Fournier et al., 2000; Valérie Castellani et al., 2004; Piper et al., 2005). Ainsi, on peut imaginer qu'une liaison préférentielle de Sema3C et Sema3A sur Nrp1 conduirait alors à une endocytose des complexes récepteurs contenant Nrp1 et ainsi à une baisse de son niveau d'expression de surface uniquement. De manière surprenante, les études précédemment citées associent l'endocytose du complexe récepteur engagé à une rétraction du cône de croissance. Or nos données indiquent que l'expression intrinsèque ne s'accompagne pas d'une rétraction du cône. Se peut-il que dans notre modèle d'étude, l'endocytose de Nrp1 par la forme intrinsèque de Sema3C soit différente de l'engagement du complexe récepteur par une Sema3 environnementale ? Cependant, il est important de considérer que l'analyse des cônes de croissance suite à une application de Sema exogène est réalisée après 45 minutes de traitement. Il est donc envisageable qu'un collapse massif des cônes de

croissances, consécutif à l'internalisation de Nrp1, ait lieu dans les premières minutes de traitement, pour être ensuite suivi d'une désensibilisation. Ce type de réponse transitoire a déjà été décrit dans les travaux de Piper et collaborateurs, dans lesquels les auteurs montrent que suite à un traitement par Sema3A, les neurones rétiniens sont désensibilisés transitoirement à l'effet collapsant au cours des deux premières minutes qui suivent le traitement, avant de se resensibiliser (Piper et al., 2005). Ainsi, l'endocytose de Nrp1 en présence de Sema3C intrinsèque pourrait conduire à un collapse rapide des axones moteurs, suivi d'une phase de désensibilisation des cônes en l'état, c'est-à-dire avec Nrp1 largement internalisé et donc un état désensibilisé aux Sema3 dépendante de la présence de ce récepteur. Toutefois, à la différence des Sema environnementales, Sema3C et Sema3A sous leur forme intrinsèque maintiennent cet état de désensibilisation à long terme.

Il est également possible d'envisager une interaction directe de Sema3C intrinsèque avec Nrp1 avant l'adressage à la membrane (Fig. 23). Cette interaction précoce de Sema3C avec ce récepteur dirigerait alors les complexes récepteurs directement vers des voies de recyclage, selon un modèle analogue à l'interaction Robo/Comm chez la drosophile, ou pourrait même conduire ces complexes vers une voie de trafic intracellulaire différente de celle de Nrp2 (Keleman et al., 2002). Une telle hypothèse permet alors de proposer un mécanisme pour la régulation différentielle des récepteurs.

Enfin, on peut envisager que la régulation de la disponibilité de Nrp1 à la surface du cône de croissance soit faite de manière indirecte par une régulation de l'endocytose et/ou de l'exocytose, comme évènement secondaire suite à une signalisation dépendante du calcium, en aval de la fixation de Sema3C intrinsèque sur son récepteur, comme cela a été montré pour Sema3A (Fournier et al., 2000; Castellani et al., 2004; Piper et al., 2005) (Fig. 23).

Si les hypothèses proposées ci-dessus permettent de comprendre la diminution de Nrp1 à la surface des cônes de croissance, elles n'apportent cependant que peu d'éléments pour comprendre l'augmentation de Nrp2. Or, des travaux plus récents ont permis de montrer que les Sema3 peuvent réguler à la fois des évènements d'endocytose et d'exocytose. En effet, Tojima et collaborateurs ont montré que Sema3A participe notamment à la régulation de l'exocytose par la régulation d'une

signalisation calcique (Tojima et al., 2007, 2010). Ainsi, il est possible d'envisager que si la Sema3C exprimée par les motoneurones peut moduler l'endocytose ou le recyclage ciblé de Nrp1, peut-être que cette Sema3 intrinsèque peut favoriser l'exocytose de Nrp2, de manière directe ou non (Fig. 23). Un autre scénario envisageable serait de considérer l'augmentation de Nrp2 comme un événement secondaire, consécutif à la diminution de Nrp1 (Fig. 23). En effet, les récepteurs Nrp1 et Nrp2 peuvent former des homodimères ou des hétérodimères au sein des complexes récepteurs (Takuya Takahashi et al., 1998). De ce fait, la diminution de Nrp1 à la surface du cône pourrait favoriser la présence de complexes récepteurs riches en homodimères de Nrp2, et ainsi sa concentration à la membrane. Ici encore, le recours à une protéine pHuorine ratiométrique fusionnée avec les récepteurs Nrp1 ou Nrp2 permettrait de suivre leur trafic respectif dans les vésicules d'exocytose, d'endocytose et à la membrane plasmique selon la présence ou non d'une Sema3 intrinsèque et apporterait certainement des éléments cruciaux à la compréhension du mécanisme mis en jeu pour la régulation des récepteurs. Il est également possible d'avoir recours à des expériences d'immunoprécipitation avec des formes de Nrp2 fusionnées à deux étiquettes différentes afin de vérifier la possibilité de l'enrichissement en homodimères Nrp2/Nrp2 dans les neurones exprimant Sema3C intrinsèquement.

c. Comment est médié le guidage des motoneurones par Sema3C environnemental ?

Un autre point intéressant à étudier concerne la composition exacte du complexe récepteur qui assure la répulsion par Sema3C des motoneurones.

Plusieurs résultats suggèrent par ailleurs une participation préférentielle de Nrp1 dans la sensibilité des motoneurones à Sema3C environnemental. En effet, nous avons montré que la surexpression de Sema3C dans les motoneurones conduit à une baisse de Nrp1 et une augmentation de Nrp2 à la surface des axones. Or les tests de collapse effectués sur ces derniers montrent une baisse de sensibilité au Sema3C exogène. La corrélation de ces résultats nous permet alors de suggérer que la sensibilité au signal environnemental Sema3C serait médiée préférentiellement par Nrp1, même si l'intervention de Nrp2 dans le processus de réponse n'est pas

exclue. Cependant, des expériences supplémentaires permettraient de vérifier une telle hypothèse. Ainsi, des tests de collapse réalisés après l'inactivation de Nrp1 ou Nrp2 par interférence à l'ARN, ou leur inactivation par des anticorps bloquants, permettraient d'impliquer de manière plus directe Nrp1 ou Nrp2 dans la sensibilité des motoneurones au Sema3C environnemental. De telles expériences ont en effet permis à Niquille et collaborateurs de montrer le rôle direct de Nrp1 dans la perception du signal Sema3C, attractif pour les neurones du cortex médian (Niquille et al., 2009).

Par ailleurs, comme nous l'avons décrit précédemment, les complexes récepteurs aux Sema3 comprennent d'autres partenaires qui assurent la transduction du signal comme les Plexines, ou des molécules d'adhérences type L1 ou NrCam. Cependant, la composition des complexes récepteurs de Sema3C est encore peu connue à ce jour. En effet, seuls les complexes PlxA2/Nrp2 et PlxD1/Nrp1 ont été montrés comme acteurs directs de la transduction du signal Sema3C lors de la mise en place du système vasculaire (Brown et al., 2001). Cependant, sachant que PlxA3, un co-récepteur identifié de Nrp1, n'est pas présent dans le génome du poulet, mais qu'il partage des fonctions communes avec d'autres membres de la famille, beaucoup de co-récepteurs peuvent être envisagés pour le complexe récepteur à Sema3C dans les motoneurones. Les travaux de Mauti et collaborateurs ont d'ailleurs montré que les motoneurones expriment plusieurs candidats Plexines. En effet, des hybridations *in situ* de coupes de moelle épinière de stade HH25 ont révélé l'expression de PlxA1, B2, A4, C1, PlxD1 dans une grande partie des motoneurones dont certaines des sous-populations décrites précédemment comme par exemple la MMC. Il a également été rapporté l'expression de PlxA2 dans deux sous-populations pouvant correspondre à la MMC et la LMCI (Mauti et al.). Ces plexines peuvent donc être envisagés comme partenaires de Nrp1 et Nrp2 dans le complexe récepteur à Sema3C dans les motoneurones.

Ainsi, afin d'identifier les partenaires des complexes récepteurs, il faudrait définir la Nrp impliquée dans de tels complexes récepteurs, ainsi que la Plexine assurant la transduction du signal. Afin de répondre à ces questions, une étude des complexes par immunoprécipitation et identification des partenaires est à envisager. De plus, il est possible d'avoir recours à de l'imagerie en temps réel avec par exemple des formes fluorescentes des différents candidats potentiels et des expériences de FRET

(Fluorescence Resonance Energy Transfer) afin d'évaluer avec précision les différents membres du complexe récepteur.

- d. L'interaction de Sema3C avec les Neuropilines est-elle nécessaire et suffisante pour cette modulation ? D'autres partenaires du complexe récepteur entrent-ils en jeu dans ce processus ?

Nous nous sommes concentrés dans cette étude sur les implications de l'expression intrinsèque des Sema3 sur le trafic de Nrp1 et Nrp2. Cependant, il serait intéressant de vérifier si l'interaction directe de Sema3C avec l'une ou l'autre ou les deux Neuropilines est nécessaire à la modulation de réponse aux Sema de l'environnement. A cet effet, le recours à une pFluorine Sema3C, conjuguée à des marquages des récepteurs Nrp1 et Nrp2 permettrait d'examiner leur proximité réelle dans le cône de croissance. De plus, des mutations du site d'interaction des Sema3 intrinsèques avec les Nrp permettraient de déterminer le rôle de cette interaction dans la modulation de réponse.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier la part des autres partenaires du complexe récepteur à Sema3C dans cette modulation (Fig. 23). Des expériences préliminaires nous ont déjà permis d'observer une augmentation significative de PlxA4 dans des axones moteurs surexprimant Sema3C. Cependant, et à la différence des Neuropilines, cette augmentation de PlxA4 est visible en condition perméabilisée (pool total) comme à la surface des axones moteurs. Ces résultats nous suggèrent que l'adressage à l'axone de PlxA4 et/ou sa synthèse protéique pourraient être augmentés du fait de la présence intrinsèque de Sema3C. En contraste, ces mêmes expériences n'ont révélé aucune modification significative du niveau de PlxA1 après la surexpression de Sema3C dans les motoneurones. Ces résultats préliminaires laissent tout d'abord penser que le gain de sensibilité des motoneurones à Sema3F pourrait être dû d'une part à l'augmentation de son récepteur Nrp2 à la membrane, mais aussi à l'augmentation de son co-récepteur potentiel PlxA4 en tant que co-récepteur de Nrp2. Ces résultats évoquent également la possibilité que Sema3C intrinsèque puisse affecter l'expression des partenaires du complexe à différents niveaux. La chronologie et les liens entre ces régulations

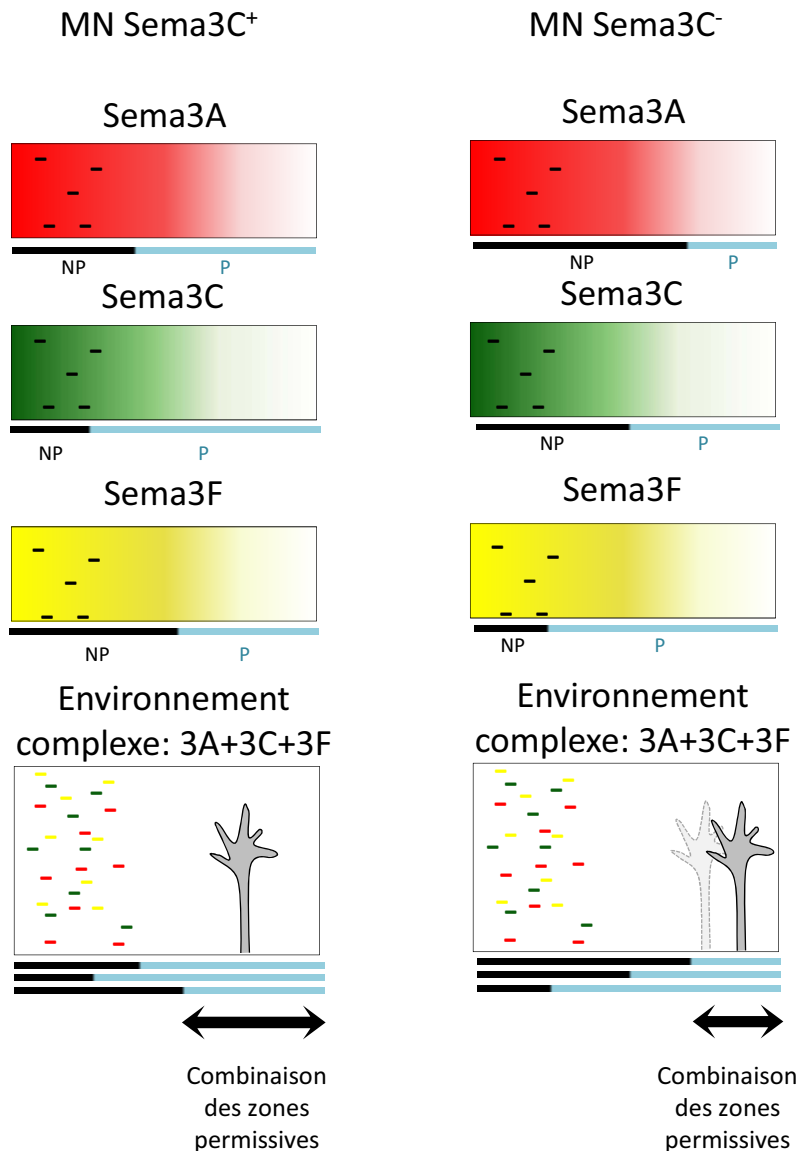


Figure 24: Représentation schématique du positionnement d'un motoneurone dans l'environnement selon sa sensibilité aux signaux Sema3 à proximité. L'expression intrinsèque de Sema3C par le motoneurone (MN) fixe sa sensibilité aux différents Sema3 de l'environnement et ainsi sa position dans l'espace. La perte de l'expression intrinsèque de Sema3C dans le motoneurone module sa sensibilité aux différents signaux de l'environnement. En effet, le motoneurone serait plus sensible à Sema3A et 3C, et moins sensible à Sema3F. Les zones permissives (P) et non permissives (NP) qui contraignent la progression de l'axone par rapport à chaque Sema3 sont alors modifiées, et l'axone adapte donc sa position.

restent encore à définir. En effet, il serait intéressant de déterminer si les variations d'expression de PlxA4 ont lieu en amont ou en aval des Nrp (Fig. 23).

Les réponses aux différentes questions ci-dessus permettraient de mieux comprendre les partenaires et les mécanismes mis en jeu dans la régulation des récepteurs Nrp1 et Nrp2 à la surface du cône de croissance, et ainsi le mode d'action des Sema3 intrinsèques, particulièrement Sema3C, sur la modulation de réponse aux Sema3 environnementales. Elles permettraient enfin de mieux comprendre la réponse répulsive au Sema3C exogène par les motoneurones.

2) Rôle des Sema3 intrinsèques dans les motoneurones

a. Sema3C intrinsèque participe au guidage stéréotypé des motoneurones dans le membre

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont également permis de mettre en évidence la participation de Sema3C exprimé par les motoneurones dans le guidage stéréotypé des motoneurones dans le membre. En effet, l'invalidation de Sema3C dans les motoneurones par électroporation d'un cocktail de siARN chez l'embryon de poulet conduit à une modification du patron de projection stéréotypé du nerf médian, qui se trouve alors déporté vers l'intérieur du membre. Par extension des résultats obtenus par les tests de collapse, il est probable que l'invalidation de Sema3C dans les motoneurones conduit à une sursensibilisation des motoneurones au collapse par Sema3A et 3C et à une désensibilisation au collapse par Sema3F. Ainsi nous pouvons expliquer le phénotype observé par une lecture altérée des multiples signaux Sema environnants et une intégration erronée du rapport des forces attractives et répulsives en présence, suite à la perte de Sema3C intrinsèque (Fig. 24). Chaque nerf se positionnerait ainsi dans la région ayant l'équilibre de forces attractive et répulsives le plus favorable à sa progression (Zhigang He et al., 2002). De plus, les défauts observés lors de l'invalidation de Sema3C dans les motoneurones ne concernent que le trajet des axones du nerf médian issu de la LMCm Sema3C⁺. Ces données suggèrent un effet autonome cellulaire, ou tout au plus très local, de la modulation de réponse par les Sema3 intrinsèques.

Une telle hypothèse requiert cependant d'affiner l'analyse du phénotype afin de mieux cerner le rôle de *Sema3C* intrinsèque dans les motoneurones. On peut se demander si la finesse des défauts observés reflète la fonction réelle de *Sema3C* intrinsèque ou si le défaut pourrait être aggravé par une invalidation totale. En effet, les stratégies d'invalidations utilisées chez l'embryon de poulet conduisent à des populations mosaïques dans lesquelles en moyenne seuls 50 à 65% de la population ont été atteints par l'électroporation, l'interférence à l'ARN n'éteignant de plus probablement pas à 100% l'expression de *Sema3C* dans ces cellules. La génération d'un modèle souris conditionnel *Sema3C^{nestinCRE}*, invalidant l'expression de *Sema3C* de manière restreinte dans la moelle épinière, en particulier dans les motoneurones, peut être alors envisagée pour répondre à cette question.

Par ailleurs, il serait idéal de pouvoir suivre spécifiquement le devenir des axones de cette LMCm lors de la mise en place des circuits sensori-moteurs. Des marquages préliminaires de la protéine EphA4, spécifique de la sous-population de la LMCI, n'ont pas révélé de mélange des populations de motoneurones au sein des nerfs moteurs du membre. Afin de procéder à une analyse plus détaillée il serait utile d'électroporer des constructions rapporteurs s'exprimant spécifiquement dans la sous-colonne LMCm. Malheureusement, des promoteurs spécifiques à une sous-colonne de motoneurones, n'ont pas encore été isolés chez le poulet à ma connaissance, et les marqueurs spécifiques connus, comme par exemple *Isl1*, sont exclusivement nucléaires et donc ne permettent pas de suivre la trajectoire des axones. Ainsi, il paraît difficile de suivre les projections axonales dans le membre d'une population spécifique de motoneurones, dont la LMCm, chez l'embryon de poulet. Pour cela, l'utilisation de modèles de souris semble là encore beaucoup plus appropriée. En effet, les outils de mutagenèse chez la souris permettraient d'introduire une séquence codante pour un rapporteur fluorescent type GFP en aval d'un gène spécifique de chaque sous-colonne de motoneurones, par exemple *Isl1* pour suivre dans le membre uniquement les axones issus de la LMCm. Sur ce même principe, il serait également possible de suivre dans le membre la trajectoire d'axones issus d'un unique pool de motoneurones parmi ceux identifiés comme par exemple le pool *Pea3⁺* qui innerve l'Anterior Latissimus Dorsi (ALD) (Dasen et al., 2005). Cela permettrait d'analyser la trajectoire stéréotypée des projections motrices de chaque pool de motoneurones sur des cibles musculaires spécifiques et peut être

de mettre en évidence des erreurs de ciblage des axones sur les muscles. Cependant, de telles manipulations supposent que le rôle mis en évidence ici pour les Sema des motoneurones chez l'embryon de poulet est conservé dans le modèle souris. Si tel est le cas, en croisant la lignée précédemment suggérée, $Sema3C^{nestinCRE}$, avec une lignée comportant un rapporteur GFP spécifique d'une sous-population de motoneurones, il serait possible de suivre des trajectoires axonales spécifiques et de mettre en évidence d'éventuels défauts. De telles études sont à envisager sur le long terme.

Enfin, afin de confirmer l'implication des Sema3 intrinsèques dans la lecture des multiples signaux Sema3 environnementaux, il serait intéressant de réaliser des tests de guidage *in vitro* avec plusieurs Sema3 intrinsèques et des combinaisons variables de Sema3 environnementales. Ce type d'expériences pourrait être envisagé par la culture de motoneurones pour lesquels l'expression de Sema3A, et/ou Sema3C a été modifiée (expériences de surexpressions ou d'invalidations), soit sur des lamelles coatées avec différentes combinaisons de Sema3 (stripe assays), soit co-cultivés avec des agrégats de cellules exprimant différentes combinaisons de Sema3, ou encore dans des chambres à gradients de Sema3 contrôlés (systèmes de gradients microfluidiques). Ce type d'expériences nous permettrait ainsi de reconstituer *in vitro* le comportement de guidage des motoneurones selon leur profil de Sema3 intrinsèque et peut être de mieux cerner les mécanismes sous-jacents. Ici encore, une étude fine du comportement de chaque population de motoneurones, identifiée par l'expression spécifique d'un rapporteur GFP, serait intéressante.

Finalement, les différentes pistes d'étude proposées précédemment permettront de mieux comprendre le rôle du code Sema intrinsèque dans les motoneurones pour le guidage stéréotypé de leurs axones dans le membre.

- b. Les Sema3 intrinsèques participent-elles à d'autres évènements lors de la mise en place des projections motrices ?

Il serait intéressant de déterminer si le code de Sema intrinsèque dans les motoneurones peut avoir un autre rôle que celui décrit ici dans le guidage axonal. En effet, la mise en place des projections motrices s'accompagne notamment de la

ségrégation de leurs corps cellulaires en groupes individualisés dans la moelle épinière. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si le positionnement des motoneurones est altéré lors de l'invalidation de Sema3C intrinsèque dans les motoneurones. En effet, les Semaphorines ont notamment été impliquées dans la régulation des adhésions cellulaires, comme par exemple les interactions axo-axonales (Huettl et al., 2011). Observée à une échelle globale, la position de ces groupes n'est pas profondément altérée par l'invalidation de Sema3C. On pourrait cependant envisager des analyses plus fines de la position et de la taille des différentes populations de motoneurones, marquées spécifiquement sur des coupes sériées d'embryons de poulet. Cependant, ici encore, le recours au modèle poulet pourrait limiter la force du phénotype puisque l'analyse se fait sur un système mosaïque dans lequel seule une partie de la population voit son expression intrinsèque de Sema3C altérée. Par ailleurs, le traçage rétrograde des différentes populations d'axones moteurs par injection de Dextran fluorescent dans le membre ne permettrait pas de marquer l'intégralité de chaque sous-colonne, rendant là encore délicate l'analyse du positionnement respectif de ces populations.

c. Les Sémaphorines participent-elles à la connectivité spécifique des différents partenaires des circuits sensori-moteurs ?

Les travaux menés au cours de cette étude ont permis de confirmer le rôle des Sema3 intrinsèques dans la modulation de la disponibilité des récepteurs Nrp1 et Nrp2 à la surface des cônes de croissance. Cependant, il est possible que les Sema intrinsèques régulent aussi l'ensemble de la composition des complexes récepteurs aux Sémaphorines, en particulier les molécules d'adhérence L1 ou NrCam qui participent à ce complexe. Par ailleurs, l'étude des souris mutantes pour Nrp1 dans les motoneurones (la lignée $Nrp1^{olig2^{-/-}}$), dans les neurones sensoriels (la lignée $Nrp1^{Ht-PA^{-/-}}$) et dans la signalisation Sémaphorine (la lignée $Nrp1^{sema^{-/-}}$) a révélé de fortes défasciculations des faisceaux de nerfs concernés, suggérant ainsi un rôle de Nrp1 dans l'adhérence axonale (A. B. Huber et al., 2005; Huettl et al., 2011). Les Sema intrinsèques pourraient donc ainsi participer indirectement à l'adhérence des neurones entre eux par la régulation de la composition des complexes récepteurs. La défasciculation des nerfs spinaux suite à l'invalidation de Sema3A ou Sema3C va

dans le sens d'une telle hypothèse (Takashi Kitsukawa et al., 1997; A. B. Huber et al., 2005; Moret et al., 2007). Mais les Sema exprimées par les motoneurons pourraient également réguler l'adhérence des nerfs moteurs avec d'autres faisceaux nerveux, comme les nerfs sensoriels, qui s'associent aux nerfs moteurs dans le sclérotome avant d'envahir le membre. Ce mécanisme d'association des nerfs moteurs et sensoriels avait été décrit dans des travaux initiaux de Landmesser et collaborateurs qui qualifiaient alors les neurones moteurs de « neurones pionniers » dont les neurones sensoriels suivent la trajectoire jusqu'au membre (L Landmesser et Honig, 1986). Une étude plus récente propose quant-à-elle un rôle pionnier des neurones sensoriels sur les motoneurons lors de l'invasion effective du membre (Huettl et al., 2011). Il est donc possible que les Sema intrinsèques, par une régulation de la composition des complexes récepteurs, régulent l'adhérence entre les nerfs sensoriels et moteurs et ainsi l'innervation conjointe qui en découle.

Par ailleurs, il a été montré que la régulation de l'adhérence des axones entre eux au niveau du plexus, notamment grâce à des molécules d'adhérences comme L1 et NCAM est un processus indispensable à la réorganisation des faisceaux et à l'innervation de la cible adéquate par les motoneurons (Tang et al., 1994). Ainsi, il est possible de corréliser la régulation, par les Sema intrinsèques, des molécules participant aux complexes récepteurs des Sema et impliquées dans des mécanismes d'adhérence (comme Nrp1 ou L1), avec une régulation des adhésions axone-axone entre les partenaires d'une même cible musculaire. Par ce type de mécanisme, les Sema intrinsèques pourraient participer à la ségrégation spécifique des différentes branches nerveuses innervant une même cible musculaire et constitueraient ainsi des éléments d'identité pour la « reconnaissance » entre eux des axones de chaque branche. Un mécanisme de reconnaissance des partenaires d'un même groupe grâce à une expression similaire de molécules d'adhérences a déjà été suggéré dans le modèle de regroupement des pools de motoneurons par l'expression commune d'une même Cadhérine proposé par Price et collaborateurs (Price et al., 2002; Guthrie, 2002). Une étude plus récente a également montré l'importance d'un tel système de reconnaissance des différents partenaires dans le système du bulbe olfactif. En effet, les auteurs ont montré que le tri des axones avant leur arrivée dans la cible est assurée par l'expression complémentaire du répulsif Sema3A par les axones DII de la région antérieure du bulbe olfactif et de son récepteur Nrp1 par les

axones DII de la région postérieure (Imai et al., 2009). La modification de cet équilibre d'expression entre les axones voisins modifie la topographie de projection des axones olfactifs dans le bulbe, normalement stéréotypée (Imai et al., 2009). Cette étude montre donc le rôle des Sémaphorines dans l'organisation des membres d'une même circuiterie entre eux afin d'obtenir une grande fiabilité dans le patron de projection.

Enfin, une autre question fondamentale concernant ce code de Sema3 intrinsèques subsiste : quels sont les régulateurs de l'expression spécifique de ces Sema3 dans les motoneurones ? En effet, rien ne semble connu à ce jour quant aux mécanismes de régulation de l'expression des Sémaphorines dans la moelle épinière. De plus, et de manière surprenante, des expériences d'hybridation *in situ* révèlent la présence d'ARN de Sema3 sous forme d'un code dans l'ensemble des progéniteurs de la moelle épinière. De telles expressions suggèrent l'existence de régulateurs spécifiques de l'expression des Sema3, dès les premiers stades de développement ainsi qu'un rôle précoce d'un code intrinsèque de Sémaphorines.

3) Rôles putatifs d'un code Sema dans les progéniteurs neuraux

L'étude réalisée au cours de cette thèse a permis de proposer un rôle du code Sema3 exprimées par les motoneurones lors de la mise en place de leurs projections axonales. Cependant, cette étude a également permis de mettre en évidence un véritable code de Sema3 dans la zone ventriculaire (ZV) de la moelle épinière, lieu de résidence des progéniteurs neuronaux. Les résultats présentés précédemment montrent en effet une combinatoire complexe de Sema3 dans la ZV, qui peut permettre la définition de domaines de progéniteurs par analogie avec les domaines définis par l'expression de combinaisons spécifiques de facteurs de transcription. Ces expressions précoces de Sema3 dans des progéniteurs neuronaux laissent penser que ces Sema3 intrinsèques pourraient jouer un rôle précoce, lors de la spécification des différentes populations cellulaires par exemple. Une telle étude fait l'objet d'un autre projet de thèse au sein de l'équipe. Cependant, dans le cadre des

circuits sensori-moteurs, il est possible de proposer quelques hypothèses pour un rôle plus précoce que celui décrit ici pour les Sema3 intrinsèques.

- a. Les Sema3 intrinsèques participent-elles à l'identité des motoneurones?

Les domaines définis par les combinatoires de Sémaphorines dans les motoneurones semblent correspondre à des sous-colonnes voire à des sous-populations des sous-colonnes motrices, qui pourraient être des pools de motoneurones. Ces observations laissent penser qu'il pourrait exister un lien entre l'identité des motoneurones et l'expression des Sema3 intrinsèques. Par ailleurs, les données bibliographiques convergent afin d'attribuer l'identité des circuits moteurs à l'action majeure d'un jeu de molécules. En effet, sous l'action du FGF et de l'Acide Rétinoïque, les motoneurones expriment alors une palette de facteurs qui spécifient leur identité, donnant ainsi naissance aux différentes sous-populations. Parmi ces facteurs d'identité, on retrouve les facteurs Wnt et Hox. Les Sémaphorines intrinsèques pourraient-elles prendre part à cette acquisition d'identité par les motoneurones? En effet, les Sema intrinsèques des motoneurones agissent-elles uniquement en aval de l'identité des motoneurones en tant que modulateurs de guidage, ou bien peuvent-elles également intervenir lors de la mise en place de cette identité ? Une étude récente a par exemple montré que la transduction de Sema3B dans des cellules tumorales humaines (MDA-MB435) conduit à une modification du niveau de certains gènes, dont l'Interleukine-8 (Rolny et al., 2008). Ces résultats montrent que les Sémaphorines peuvent être des modulateurs de la transcription de certains gènes, suggérant ainsi qu'elles pourraient participer plus directement à la mise en place de l'identité des motoneurones. Par ailleurs, Yamauchi et collaborateurs ont montré que le facteur FGF8 active directement l'expression de Sema3F dans les neurones dopaminergiques du diencéphale, au même titre que l'activation des facteurs Hox par le FGF8 mis en évidence par Dasen et collaborateurs (Yamauchi et al., 2009; Dasen et al., 2005). On peut alors se demander si Sema3F peut être un instructeur des neurones dopaminergiques, en aval de FGF8. Il serait donc intéressant de voir si l'application de FGF8 sur des progéniteurs de motoneurones peut moduler l'expression des Sema3 intrinsèques.

Par la suite, il serait possible de déterminer si ces Sema3 intrinsèques sont impliquées de manière précoce, dans la spécification de l'identité de différentes populations de motoneurones, comme les pools de motoneurones. En effet, des expériences de perte de fonction des facteurs d'identité des motoneurones, comme les facteurs ETS ou LIM, ou des différentes Sema3 intrinsèques par électroporation de siARN chez l'embryon de poulet, permettraient de déterminer si les Sema3 intrinsèques sont liées aux facteurs d'identité, et si tel est le cas, si elles agissent en amont ou en aval de tels facteurs. Des expériences préliminaires ont déjà révélées que l'inactivation de Sema3C intrinsèque ne modifie pas l'identité des progéniteurs Sema3C⁺ de la zone ventriculaire. Par ailleurs, il serait intéressant de préciser la subdivision des motoneurones par l'expression de Sema intrinsèques, notamment par des co-marquages avec les quelques marqueurs de pools identifiés à ce jour, et ce afin de situer le niveau d'identité auquel les Sema intrinsèques pourraient intervenir.

b. Le code Sema3 distingue-t-il différents circuits sensori-moteurs ?

L'identité des branches sensorielles et motrices des circuits sensori-moteurs est finement régulée. Cependant, un point critique qui a été soulevé dans l'introduction est de savoir comment s'établit la spécificité de connexion entre un partenaire sensoriel et un partenaire moteur. Différentes étapes précoces et tardives ont été mises en évidence dans la bibliographie, mais toutes illustrent l'importance de l'identité de chacun des partenaires pour la mise en place de cette connectivité spécifique. L'exemple du facteur Phox2b commun à tous les membres du circuit réflexe viscéral et crucial à leur interconnexion et particulièrement illustratif de l'existence de « gènes maîtres » pour l'identité d'un circuit (J.-F. Brunet et Pattyn, 2002; Tiveron et al., 1996). Par ailleurs, l'expression des Sémaphorines se retrouve dans les motoneurones, comme il a été décrit dans cette étude, mais également dans les neurones sensoriels. En effet, les neurones des DRG expriment par exemple Sema3A, 3C, 3B, 3F, 6A, 4B (A W Püschel et al., 1996; Moret et al., 2007; Haklai-Topper et al., 2010, observations personnelles). Ainsi, une combinatoire commune d'expression entre les neurones sensoriels et moteurs pourrait exister et participer à une identité commune des différents partenaires interconnectés au sein

d'un même circuit sensori-moteur. Il serait alors intéressant d'étudier de manière individualisée des circuits sensori-moteurs pour voir s'il existe une correspondance d'expression de Sema entre les différents partenaires. Arber et collaborateurs ont d'ailleurs récemment développé des outils viraux trans-synaptiques dérivés du virus de la rage, qui permettent l'identification spécifique des partenaires interconnectés au sein d'un circuit (Stepien et al., 2010). Ainsi, dans cette équipe, Pecho-Vrieseling et collaborateurs ont mis en évidence le rôle crucial de la signalisation complémentaire entre Sema3E par certains pools de motoneurones et PlxD1 par les neurones proprioceptifs pour leur interconnexion spécifique (Pecho-Vrieseling et al., 2009)

En définitive, mon travail de thèse a permis de mettre en évidence un rôle des Sema3 dans l'innervation stéréotypée du membre, mais il suggère également la possibilité d'un rôle plus général de l'expression des Sémaphorines par les différents partenaires des circuits sensori-moteurs, notamment dans l'identité des différents partenaires et pourquoi pas dans leur ségrégation spécifique.

CHAPITRE IV : ANNEXE

Au cours de ma thèse, j'ai également eu l'opportunité de contribuer à d'autres projets de l'équipe, basés sur l'étude d'autres fonctions des Sémaphorines.

Rôle de la Sémaphorine 3B dans la traversée de la ligne médiane par les axones commissuraux de la moelle épinière.

Lors de son projet doctoral, Homaira Nawabi a mis en évidence une modulation de réponse des axones commissuraux au répulsif Sema3B exprimé par la plaque du plancher. En effet, par des approches *in vivo* et *in vitro*, Homaira Nawabi a montré qu'avant d'atteindre la ligne médiane, les axones commissuraux expriment les membres du complexe récepteur à Sema3B : Nrp2 et PlxA1. Cependant, sous l'action de la protéase calpaïne1, le co-récepteur PlxA1 est dégradé, contribuant ainsi à l'entrée des axones commissuraux dans la plaque du plancher. Au cours de leur progression dans la plaque du plancher, les axones commissuraux sont exposés à un signal exprimé par la plaque du plancher, NrCam, qui permet d'arrêter la dégradation de PlxA1. Les axones commissuraux possèdent alors un complexe fonctionnel à Sema3B et sont donc repoussés hors de la plaque du plancher, afin de continuer leur parcours jusqu'à leur cible finale d'innervation. Ce travail a donné lieu à une publication dans le journal *Genes and Development* en 2010. Dans ce travail, il a notamment été nécessaire d'avoir recours au modèle d'électroporation de l'embryon de poulet pour introduire des formes mutées de PlxA1 comme PlxA1-pHluorine, ou bien de procéder à des surexpressions de PlxA1. Ayant déjà acquis les rudiments de telles manipulations de l'embryon de poulet, j'ai pris en charge les électroporations nécessaires pour l'avancée de ce projet.



A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates

Homaira Nawabi, Anne Briançon-Marjollet, Christopher Clark, et al.

Genes Dev. 2010 24: 396-410

Access the most recent version at doi:[10.1101/gad.542510](https://doi.org/10.1101/gad.542510)

Supplemental Material	http://genesdev.cshlp.org/content/suppl/2010/01/26/24.4.396.DC1.html
References	This article cites 42 articles, 9 of which can be accessed free at: http://genesdev.cshlp.org/content/24/4/396.full.html#ref-list-1
Open Access	Freely available online through the Genes & Development Open Access option.
Email alerting service	Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or click here

To subscribe to *Genes & Development* go to:
<http://genesdev.cshlp.org/subscriptions>

A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates

Homaira Nawabi,^{1,4} Anne Briançon-Marjollet,^{1,4} Christopher Clark,¹ Isabelle Sanyas,¹ Hyota Takamatsu,² Tatsusada Okuno,² Atsushi Kumanogoh,² Muriel Bozon,¹ Kaori Takeshima,³ Yutaka Yoshida,³ Frédéric Moret,¹ Karima Abouzid,¹ and Valérie Castellani^{1,5}

¹University of Lyon, University of Lyon 1, Claude Bernard Lyon1, CGMC, UMR, CNRS 5534, F-69000 Lyon, France; ²Department of Immunology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, 565-0871, Japan; ³Division of Developmental Biology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio 45229, USA

Commissural axon guidance requires complex modulations of growth cone sensitivity to midline-derived cues, but underlying mechanisms in vertebrates remain largely unknown. By using combinations of *ex vivo* and *in vivo* approaches, we uncovered a molecular pathway controlling the gain of response to a midline repellent, Semaphorin3B (Sema3B). First, we provide evidence that Semaphorin3B/Plexin-A1 signaling participates in the guidance of commissural projections at the vertebrate ventral midline. Second, we show that, at the precrossing stage, commissural neurons synthesize the Neuropilin-2 and Plexin-A1 Semaphorin3B receptor subunits, but Plexin-A1 expression is prevented by a calpain1-mediated processing, resulting in silencing commissural responsiveness. Third, we report that, during floor plate (FP) in-growth, calpain1 activity is suppressed by local signals, allowing Plexin-A1 accumulation in the growth cone and sensitization to Sema3B. Finally, we show that the FP cue NrCAM mediates the switch of Plexin-A1 processing underlying growth cone sensitization to Sema3B. This reveals pathway-dependent modulation of guidance receptor processing as a novel mechanism for regulating guidance decisions at intermediate targets.

[*Keywords:* Axon guidance; midline crossing; semaphorin; calpain; commissural neurons]

Supplemental material is available at <http://www.genesdev.org>.

Received June 5, 2009; revised version accepted December 18, 2009.

The developing neuronal projections navigate along highly diverse environments and manage complex pathway choices to reach their specific target tissues. Axon trajectories are specified by multiple cues, and guidance decisions crucially depend on regulatory mechanisms controlling in time and space the expression, distribution, and activity of the guidance machinery, including ligands, receptors, and signaling effectors (Yu and Bargmann 2001). The pathfinding of long-distance projections proceeds in successive stages, with regularly positioned sources of attractants keeping axons in appropriate routes, referred to as intermediate targets. For example, in vertebrates, groups of neurons in the CNS send axon projections that navigate through a key intermediate target, the floor plate (FP), in which they cross the midline. In the developing spinal cord, commissural neurons reside in the dorsal horn, and their axons navigate

ventromedially to cross the midline and turn rostrally, extending along longitudinal pathways. Axon tracts then contact various spinal and higher-center neurons to establish circuits participating in the left-right control of sensory modalities and motor behaviors (Colamarino and Tessier-Lavigne 1995). Extensive studies established that Netrins, Semaphorins, IgSFCAMs, Slits, and various morphogens combine contact and diffusible attractive and repulsive effects to control commissural axon pathfinding (Augsburger et al. 1999; Garbe and Bashaw 2004; Dickson and Gilestro 2006).

A key issue that long-distance projections have to solve is how to leave an intermediate target. One possibility is that, among the guidance cues to which they are exposed, commissural axons first perceive attractants, thus being guided toward the intermediate target, and second repellents during in-growth, thereby receiving instructions for intermediate target exit. Accordingly, spinal commissural axons are attracted to the FP by Netrins and Shh, but then lose their responsiveness to Netrins and become sensitive to midline-derived repellents of the Slit, Semaphorin, and Ephrin families (Kidd et al. 1998; Brose et al. 1999; Zou et al. 2000; Imondi and Kaprielian 2001). Very

⁴These authors contributed equally to this work.

⁵Corresponding author.

E-MAIL castellani@cgmc.univ-lyon1.fr; FAX 33-0472442685.

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.542510>. Freely available online through the *Genes & Development* Open Access option.

little is known about the mechanisms through which these modulations are achieved. Suppression of Netrin attraction has been proposed to occur upon exposure to Slits, through the association of their respective DCC and Robo receptors (Stein and Tessier-Lavigne 2001). In flies, the sensitivity to Slits is silenced at the precrossing stage through a post-translational mechanism coupling the Slit receptor Robo to the Commissureless protein and targeting the complex for proteasomal degradation. This pathway is suppressed at the midline through a yet-unknown mechanism, thus enabling commissural axons to gain responsiveness to Slits (Keleman et al. 2002; Dickson and Gilestro 2006). However, the commissural-dependent mechanism has not proven effective in vertebrates, despite the conservation of Robo/Slit signaling at the ventral midline. Genetic approaches in mice indicated that a specific spliced variant of one of the three *Robo* genes, *robo3*, controls through a yet-unknown mechanism Robo1/2 signaling and responsiveness to Slits (Chen et al. 2008). Another key but yet-unsolved issue is whether acquisition of responsiveness to guidance cues results from experience-independent processes, with neurons being sensitized through an intrinsic mechanism, or rather from context-dependent pathways, with neurons being sensitized by signals localized at intermediate targets.

In this study, we explored the role of the midline repellent Semaphorin3B (Sema3B), a class 3 Semaphorin (Sema3) that was reported in *in vitro* assays to repel commissural axons after FP crossing (Zou et al. 2000). We show that crossing and post-crossing axon trajectories are defective in *Sema3B*-null embryos, consistent with a role for Sema3B in FP exit. We identify Plexin-A1 as the signaling coreceptor of Sema3B in this system, and show that *Plexin-A1*- and *Sema3B*-null embryos exhibit similar guidance defects of spinal commissural projections. We set up cultures of isolated FP tissue and dissociated commissural neurons and demonstrate that signals released by FP cells sensitize commissural growth cones to Sema3B. Naive commissural growth cones in culture and precrossing axon segments *in vivo* express the receptor subunit Nrp2, but Plexin-A1 level is very low. Upon exposure to FP signals conferring the response to Sema3B, Plexin-A1 level is up-regulated and the protein distributes in the peripheral growth cone structures. In spinal cord explant cultures, Plexin-A1 expression was detected in axons emerging after FP crossing, while it was very low in explant cultures in which the FP was removed. When electroporated in the chick neural tube, the fluorescence of a Plexin-A1-gfpPhLuo fusion, allowing visualizing of a cell surface protein pool, is turned on upon FP crossing, which demonstrates that a switch of Plexin-A1 level occurs in this intermediate target. Decreasing and increasing Plexin-A1 levels in cultured commissural neurons and *in vivo* is sufficient for altering growth cone responsiveness to Sema3B. Through various pharmacological and siRNA-based knockdown approaches, we show that the Plexin-A1 level is actively kept low at the precrossing stage due to the processing by calpain1, and that FP signals, by suppressing this protease pathway, enable accumulation of Plexin-A1 in commissural growth

cones and sensitization to Sema3B. Consistently, calpain activity in unfixed embryonic spinal cord sections is detected in spinal neurons and precrossing axon segments, but not in crossing axon segments and FP cells. Pharmacological inhibition of calpain activity *in vivo* induces defects of FP in-growth and premature turning. Biochemical approaches demonstrated that this calpain activity directly processes Plexin-A1 at the precrossing stage. Last, we identify an active FP component, the Ig superfamily cell adhesion molecule NrCAM, in the switch of Plexin-A1 processing, triggering commissural axon sensitization to Sema3B.

Results

Sema3B/Plexin-A1 signaling is required for commissural axon guidance at the midline

We first examined *Sema3B* and *Nrp2* expression in embryonic day 11.5 (E11.5) and E12.5 developing mouse spinal cords by *in situ* hybridization. Consistent with previous work (Zou et al. 2000), *Sema3B* was found expressed at the ventral midline and in dorsal territories, while *Nrp2* mRNA was detected in the dorsal horn where commissural neurons reside (Fig. 1A; Supplemental Fig. S1A). These expression patterns were consistent with a role of Sema3B in the guidance of commissural projections. Next, we analyzed the trajectory of commissural axons in *Sema3B*-null mutant mice. Crossing and post-crossing commissural pathways were examined in spinal cord open book preparations by insertion of DiI (1,1'-dilinoleyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate) crystals in the domain of commissural cell bodies (Fig. 1B). In contrast to axons that turned rostrally after midline crossing in the wild-type embryos in 80% of cases, axons from *Sema3B*-null embryos exhibited aberrant trajectories in 60% of cases, ranging from stalling or turning in the FP, caudal instead of rostral turning, and dorsally rather than ventrally directed growth after FP crossing (number of crystals/number of embryos: 72/19 for +/+, 47/12 for +/-, and 90/13 for -/-, from four litters) (Fig. 1C). In another set of experiments, we focused on FP-crossing phenotypes and compared the proportion of DiI-labeled tracts that could exit the FP (number of crystals/number of embryos: 52/six for +/+, 28/three for +/-, and 51/four for -/-, from two litters) (Fig. 1D). More than 60% exited the FP in the wild-type embryos for only 32% in the null embryos. Thus, the genetic ablation of *Sema3B* disrupts the behavior of crossing and post-crossing commissural axons. FP and interneuron markers were not modified by the loss of *Sema3B*, suggesting that these defects reflected a requirement for Sema3B guidance activity at the ventral midline (Supplemental Fig. S1B,C). The Sema3 signaling is mediated by Plexin-A family members that are obligatory Nrp coreceptors for the activation of transduction cascades (Kruger et al. 2005; Bechara et al. 2008). Until now, there was no information regarding the identity of the Plexin-A recruited to Nrp2 for mediating Sema3B effects in axon guidance. Based on expression patterns in *in situ* hybridization performed on E12.5 coronal sections, *Plexin-A1*

Nawabi et al.

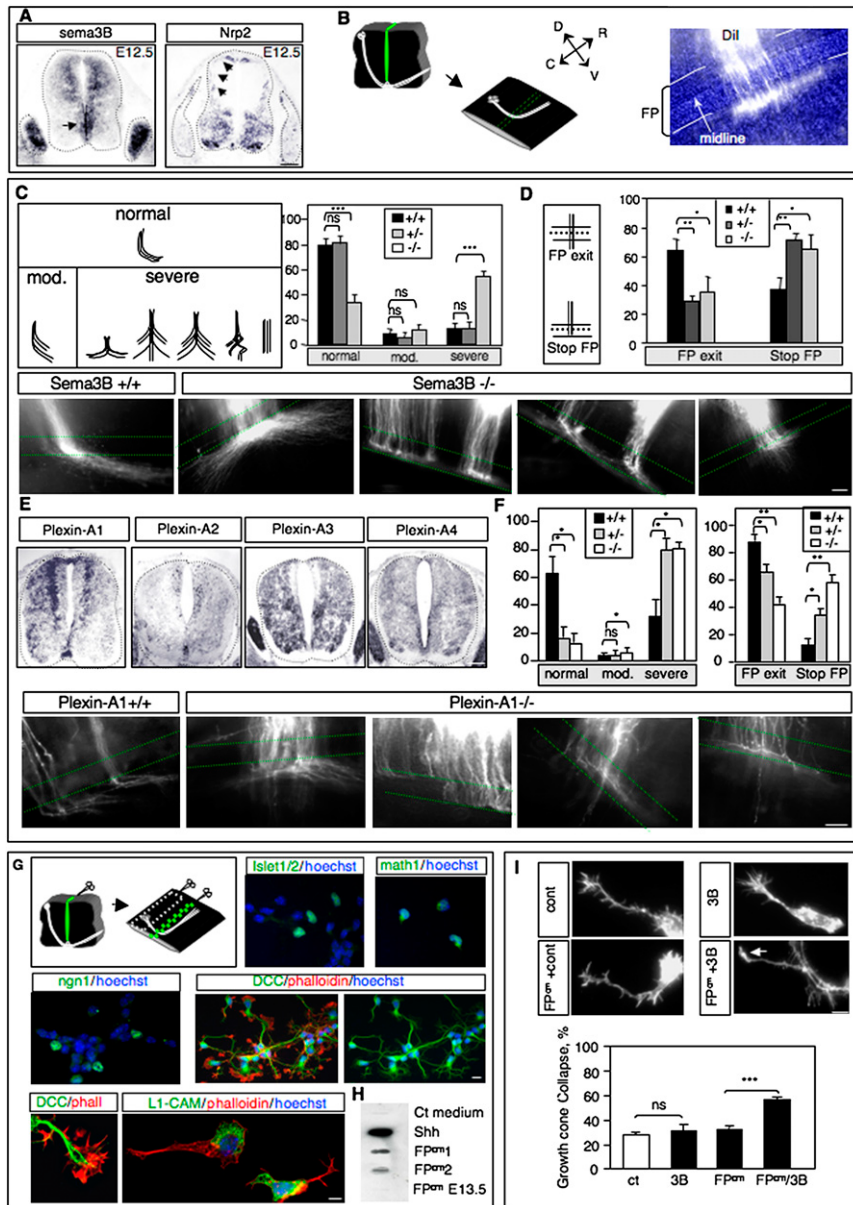


Figure 1. Crossing and post-crossing commissural defects in *Sema3B* and *Plexin-A1* knockout embryos, and gain of response to *Sema3B* induced by FP^{cm} . (A) In situ hybridization on E12.5 cross-sections showing *Sema3B* transcripts at the ventral midline and *Nrp2* in dorsal spinal cord domain of commissural neurons (arrows). (B) Schematic drawing of the spinal commissural pathway and DiI labeling in open book preparations. Green dashed lines delineate the FP positioned by phase-contrast observations. (C) Illustrations of commissural tracts in wild-type embryos (*Sema3B*^{+/+}) and various misrouting in the *Sema3B*-null embryos (*Sema3B*^{-/-}), stalling or turning in the FP, aberrant caudal turning, and dorsally directed growth. (C) Classification of commissural trajectories in normal, mild, and severe cases for *Sema3B*^{+/+}, *Sema3B*^{+/-}, and *Sema3B*^{-/-} embryos. (D) Classification focused on axon behaviors within the FP showing that, at E12.5, significantly less axon tracts exited the FP in the +/- and -/- embryos than in the +/+ embryos. (E) In situ hybridization on E12.5 cross-sections to label *Plexin-A1*, *Plexin-A2*, *Plexin-A3*, and *Plexin-A4* transcripts in the spinal cord. *Plexin-A1* mRNA is strongly detected in spinal interneurons. (F) Illustrations and diagrams of DiI labeling of commissural projections in open book preparations from *Plexin-A1*^{+/+} and *Plexin-A1*^{-/-} embryos, showing aberrant crossing and post-crossing trajectories in the *Plexin-A1*-null embryos. Bars, 100 μ m. (G) Schematic drawing of the tissue from which dissociated neuronal cultures and isolated FP tissue culture were performed. Cultured neurons express *ngn1*, *math1*, and *islet 1/2* transcription factors, and cell surface DCC markers of commissural neurons. The L1-CAM marker is restricted to the soma in axon and growth cone compartment. (H) Slot blots showing immunodetection of the FP cue Shh in two FP^{cm} samples at E12.5 and its down-regulation at E13.5. (I) Histogram and microphotographs showing that FP^{cm} triggers a *Sema3B*-induced collapse response. Bar: A, B, 15 μ m.

samples at E12.5 and its down-regulation at E13.5. (I) Histogram and microphotographs showing that FP^{cm} triggers a *Sema3B*-induced collapse response. Bar: A, B, 15 μ m.

was the strongest candidate, as its transcript was detected in dorsal interneurons, while that of the other *Plexin-A*s were not or were only weakly and/or uniformly distributed in the spinal cord (Fig. 1E; Cheng et al. 2001). We then examined spinal commissural projections in *Plexin-A1*-null embryos. DiIs were placed in open book preparations at stage E12.5/E13 (number of crystals/number of embryos: 54/six for +/+, 61/eight for +/-, and 84/seven for -/-, from five litters) (Fig. 1F). Errors of commissural axon trajectories were detected and, remarkably, they mimicked those identified in the *Sema3B*-null embryos, with premature turning, stalling in the FP, defasciculation, and caudal instead of rostral turning before and after crossing (Fig. 1F). FP and dorsal markers also were

not affected by *Plexin-A1* genetic ablation (Supplemental Fig. S2A,B). This analysis supported that Plexin-A1 is required for Semaphorin3B-mediated axon guidance in the FP.

Local FP signals confer responsiveness to Semaphorin3B

Explants assays established that commissural axons acquire responsiveness to *Sema3B* upon FP crossing (Zou et al. 2000). We confirmed this result in cocultures of open book explants with cell aggregates secreting *Sema3B*, observing that the growth of commissural axons toward cells secreting *Sema3B* was permitted when the FP was removed, but was inhibited in intact preparations

(five embryos, >15 explants/condition, three independent experiments) (Supplemental Fig. S3A). We hypothesized that the gain of response results from exposure to local signals present in the FP. To address this hypothesis, we set up cultures of isolated FP tissue to produce conditioned medium (FP^{cm}), and assessed it in a model of dissociated dorsal spinal neurons. To validate this model, we examined the expression of different commissural neuron markers (Fig. 1G). First, neurons composing the cultures expressed *Islet1/2*, *math1*, and *ngn1* transcription factors characteristic of the dl1, dl2, and dl3 pools of commissural neurons. Second, the cell surface commissural marker DCC was detected in the axons and growth cones of all cultured neurons (Fig. 1G). In vivo, L1-CAM is expressed by commissural neurons, but is present only along crossing and post-crossing axon segments (Supplemental Fig. S3B). In our model, L1-CAM was detected in the soma and, strikingly, it was excluded in most cases from the axon and the growth cone compartments, and only occasionally L1⁺ growth cones were detected (Fig. 1G; Supplemental Fig. S3B). Last initial axon outgrowth was dependent on netrin-1, as expected for commissural neurons (data not shown). Thus, cultured dissociated dorsal neurons express the markers of commissural neurons at the precrossing stage. To verify that the tissue put in culture was composed by FP cells, we assessed the presence of known soluble FP-derived cue Shh and Netrin-1 in slot blots, and could detect their presence in FP^{cm} samples (Fig. 1H; Supplemental Fig. S3C).

Next, the neuronal cultures were exposed to either control, Sema3B, or FP^{cm} treatment, or in combined application (Fig. 1I). Notably, the level of collapse was increased significantly by combined application of Sema3B and FP^{cm}, but not FP^{cm} or Sema3B alone (number of cones per condition/number of experiments: 560/seven for control, 560/seven for Sema3B, 1040/13 for FP^{cm}, and 1280/16 for FP^{cm}-Sema3B) (Fig. 1I). A similar gain of collapse was observed when the FP^{cm} was removed prior to Sema3B application, indicating that the FP^{cm} and Sema3B does not act in synergy, but rather that the FP^{cm} contains signals that capacitate commissural neurons to be responsive to Sema3B (Supplemental Fig. S3D). Commissural neurons isolated at E11.5, E12.5, and E13.5 all failed to collapse upon Sema3B exposure, indicating that neurons are unlikely to acquire responsiveness through maturation, at least in these culture conditions (Supplemental Fig. S3E).

Plexin-A1 level is up-regulated by FP signals in commissural growth cones

We hypothesized that responsiveness to Sema3B could be gained through regulation at the receptor complex level. Changes in expression levels, availability, or spatial distribution of some subunits could allow the growth cone to assemble a functional receptor only within the FP. To test this idea, we first examined the distribution of the receptor subunits in spinal commissural axons by immunohistochemistry on E11.5 cross-sections. The specificity of the anti-Plexin-A1 antibodies used for the study was controlled in transfected cells and in cross-sections of

Plexin-A1-null embryos (Supplemental Fig. S4A,B). Nrp2 could be detected along both precrossing, crossing, and post-crossing axon shafts (Fig. 2A). Interestingly, Plexin-A1 expression was very weak in precrossing segments, but was strongly up-regulated in crossing and post-crossing segments (Fig. 2A). This raised first the possibility that commissural neurons are unresponsive to Sema3B due to the lack of Plexin-A1 in the growth cone, and second that Plexin-A1 expression and/or distribution could be modified during FP in-growth to allow commissural axons acquiring responsiveness to Sema3B. We thus investigated whether the FP^{cm} in our culture assay could regulate the expression of Plexin-A1. Interestingly, in the basal condition, Plexin-A1 was present in the central domain, but absent from the peripheral growth cone structures, playing key roles in the perception of extracellular signals. Remarkably, FP^{cm} application induced Plexin-A1 spreading in the growth cone filopodia (Fig. 2B). These observations were confirmed by counting of Plexin-A1 clusters (Fig. 2B). We found that the number of Plexin-A1 clusters increased by only 16% in the central domain, but by 160% in the filopodia. This was not due to morphological modifications, since the number of filopodia per growth cone was statistically comparable in all conditions (Fig. 2B). Thus, FP signals induce Plexin-A1 to accumulate in the filopodia.

We also asked whether the Plexin-A1 level is regulated by the FP^{cm} by performing quantitative fluorescence measurement, and found significant increase of the total Plexin-A1 pool in the soma and the growth cone (Fig. 2C,D). This result was confirmed with a second anti-Plexin-A1 antibody recognizing a different Plexin-A1 epitope (Supplemental Fig. S4A). A similar increase was also found when the quantitative analysis was restricted to the surface pool of Plexin-A1 (Fig. 2D). Such an increase was not observed for another Plexin-A family member, Plexin-A2 (Fig. 2E). Nrp2 was also not obviously modified after exposure to FP signals (Supplemental Fig. S5). We assessed the Plexin-A1 level with a complementary biochemical approach (Fig. 2F). Fresh dorsal spinal cord tissue was isolated for ex vivo stimulation by FP^{cm} and control treatments, and was processed for Western blot analysis. As expected, the Plexin-A1 level was increased by twofold in the FP^{cm} condition compared with the control, while the Nrp2 level remained comparable (Fig. 2F). To provide direct evidence that Plexin-A1 up-regulation takes place in axons that cross the FP, spinal cord explants in which the FP was either removed or left intact were cultured in a three-dimensional substrate and labeled with anti-DCC and anti-Plexin-A1 antibodies (Fig. 2G). Plexin-A1 and DCC levels were measured in growth cones that had or had not crossed the FP. We found that the DCC level remained constant in both conditions, while the Plexin-A1 level increased by 36% in growth cones that crossed the FP, thus demonstrating that axons must cross the FP to up-regulate Plexin-A1 (–FP, 64 growth cones; +FP, 34 growth cones; two independent experiments).

Next, we used the chick embryo to investigate the regulation of the Plexin-A1 level upon FP crossing in vivo. To validate this animal model for our question, we

Nawabi et al.

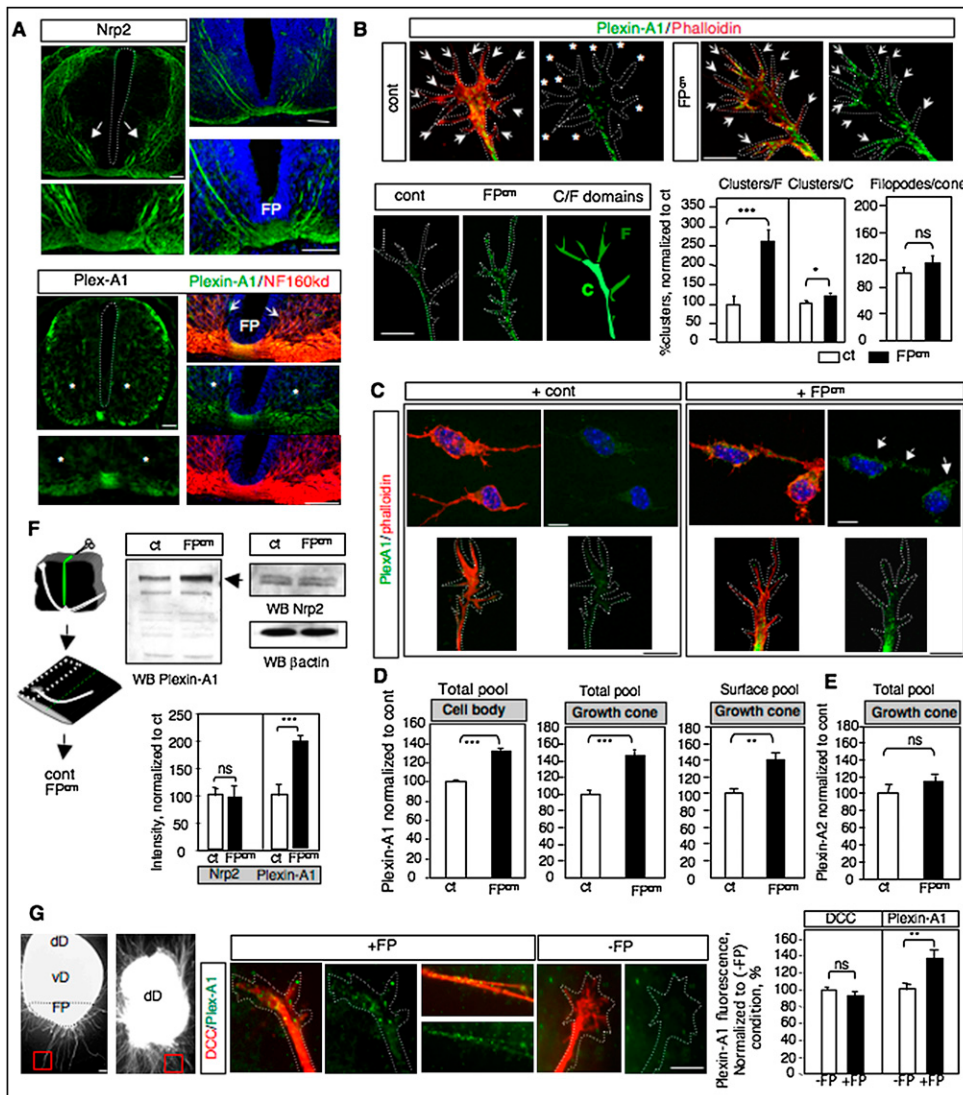


Figure 2. The Plexin-A1 level is increased by FP signals. (A) Immunolabeling of the Sema3B receptor subunits Nrp2 and Plexin-A1 (green) in E11.5 cross-sections with nuclear counterstaining (blue). Nrp2 is expressed on precrossing segments. Plexin-A1 is initially very low and is up-regulated in crossing and post-crossing segments. Bars, 100 μ m. (B) Microphotographs illustrating the difference of Plexin-A1 filopodial distribution between control and FP^{cm} conditions (white arrows and stars). Counting of Plexin-A1 clusters in the central and peripheral growth cone domains. Treatment with FP^{cm} induces a strong increase of Plexin-A1 clusters in the peripheral domain without modifying the number of filopodia per growth cone. Increase of Plexin-A1 clusters in the central domain is very modest. Bar, 15 μ m. (C) Illustrations of Plexin-A1 immunolabeling (in green, phalloidin in red) in neuronal cultures showing Plexin-A1 increase in the FP^{cm} condition, in the soma, and in the growth cone. Bar, 15 μ m. (D) The histograms summarize the quantitative analysis of Plexin-A1 fluorescence in the soma and the growth cones (total pool and cell surface) and its increase by FP signals. (E) Plexin-A2 fluorescence in the growth cones is not up-regulated by FP signals. (F) Western blot analysis of the Plexin-A1 level in fresh dorsal spinal tissue stimulated with control (cont) and FP^{cm}. (Left panel) Experimental procedure. (Right panel) Rise of the Plexin-A1 but not the Nrp2 level in Western blot. The histogram shows quantification of band intensity and the increase of Plexin-A1 but not Nrp2 in the FP^{cm} condition, compared with control. (G) Explant assays with spinal cord tissue in which the FP was removed or was not removed. Illustration and quantification of DCC and Plexin-A1 growth cone fluorescence in commissural axons that crossed or did not cross the FP. Bar, 15 μ m. (dD) Dorsal domain of the spinal cord; (vD) ventral domain of the spinal cord.

confirmed that chick commissural neurons are unresponsive to Sema3B at the basal level, but acquire responsiveness to Sema3B upon exposure to chick FP^{cm} (Supplemental Fig. S6). To visualize the cell surface expression of Plexin-A1, the coding sequence was fused to gfp pHluorin, a Ph-sensitive gfp that fluoresces in compartments with

neutral pH such as the cell membrane, but very weakly in acidic intracellular compartments (Jacob et al. 2005). After transfection of the vector encoding Plexin-A1-Phluo in COS7 cells, the fluorescence was almost restricted to the cell surface, contrasting with a control egfp fusion membrane protein that was, in addition, detected in intracellular

compartments; Fig. 3A). Next, *Plexin-A1PhLuo* was electroporated at very low levels (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) in the chick neural tube. Under these conditions, Plexin-A1-PhLuo was detected in dividing neuroepithelial cells and post-mitotic cells settling in the mantle (Fig. 3B). In commissural neurons, the fluorescence was visible in the soma and the proximal axon segment but was very weak in the pre-crossing axon segment, thus indicating that the Plexin-A1-PhLuo level was successfully repressed at the pre-crossing stage. Remarkably, intense fluorescence was

detected in growth cones and axon segments after FP crossing (total of six embryos, 100% penetrance of the observation) (Fig. 3C). This compartmentalized pattern was never observed in embryos electroporated with *egfp* (total of six embryos) (Fig. 3D). To quantify these observations, *Plexin-A1-PhLuo* and *egfp* were coelectroporated with *rfp* (Fig. 3E). In the Plexin-A1-PhLuo condition, commissural growth cones were red prior to FP crossing, becoming yellow in the FP, while in the *egfp* condition, growth cones were already yellow before FP entry (Fig. 3E).

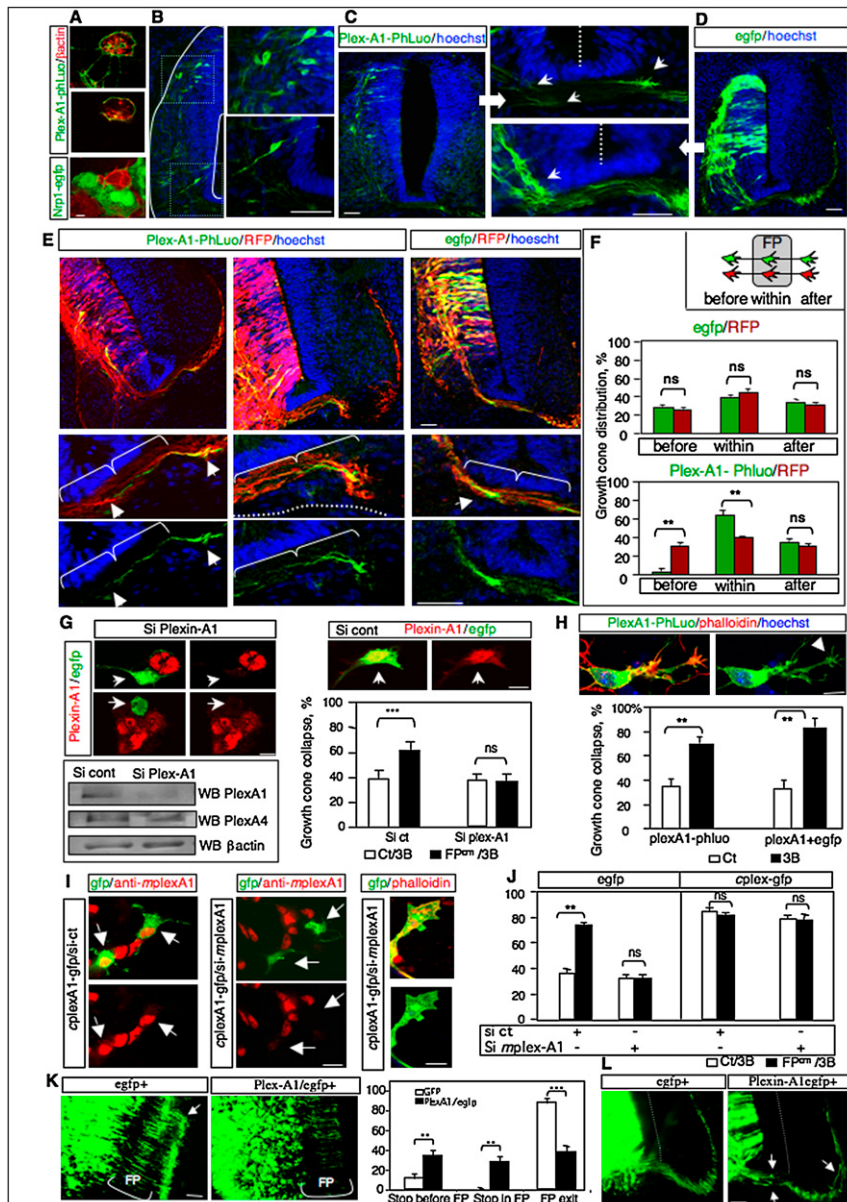


Figure 3. Plexin-A1 up-regulation in commissural growth cones during FP crossing and gain of response to Sema3B. (A) Two Z-scans showing restricted Plexin-A1-PhLuo cell surface expression in COS7 cells. (B–D) Electroporation of *Plexin-A1PhLuo* or *egfp* in the chick neural tube. Plexin-A1-PhLuo is visible in polarized neuroepithelial cells, lateral post-mitotic soma, and initial axon segments, but is weakly detected along pre-crossing commissural axons, compared with *egfp* (white arrows). Note the bright fluorescence of Plexin-A1-PhLuo after FP crossing (right white arrow). (E) *Plexin-A1-PhLuo/RFP* and *egfp/RFP* coelectroporation. (Left panel) Yellow growth cones are detected before crossing in the *egfp/RFP* but not the *Plexin-A1-PhLuo/RFP* condition. In the right panels, Plexin-A1-PhLuo green fluorescence is switched on upon FP crossing, unlike *rfp*, which is detected before FP entry. (F) Distribution of green and red growth cones before FP in-growth, in the FP, and after FP exit in the *Plexin-A1-PhLuo/RFP* and *egfp/RFP* conditions, showing the extremely low number of green *Plexin-A1-PhLuo* growth cones at the pre-crossing stage. Bar, 100 μm . (G) Microphotographs of siRNA-mediated knockdown of Plexin-A1 expression (red) in cultured dorsal spinal neurons labeled with *gfp* (green). Western blot showing the knockdown of Plexin-A1 but not Plexin-A4 by the si-*Plexin-A1*, and the lack of effect of the si-control (si-*cont*). The histogram shows the loss of FP^{cm}-induced collapse responsiveness to Sema3B in the Plexin-A1 knockdown condition. (H) Plexin-A1-PhLuo overexpressed in commissural neurons is present at the soma and growth cone surface. Histogram showing that overexpressed Plexin-A1-PhLuo and vsv-Plexin-A1 both confer to commissural growth cones responsiveness to Sema3B. Bar, 15 μm . (I) Rescue of Plexin-A1 restores the sensitivity to Sema3B. Illustrations of combined siRNA and *gfp-Plexin-A1* cotransfection showing that mouse Plexin-A1 (*mPlexin-A1*) was

knocked down (labeled with mouse-specific anti-Plexin-A1) and replaced by chick *gfp-Plexin-A1* (*cPlexin-A1*, *gfp* label). *cPlexin-A1* is present in the growth cones. Bar, 20 μm . (J) The histograms show the results of a collapse assay and the rescue by *cPlexin-A1*. (K) Illustrations and quantifications of Dil labeling in open book preparations after electroporation of *Plexin-A1/egfp* or *egfp* at high concentration in the chick embryo. Plexin-A1 but not *egfp* overexpression induced defects of FP crossing. (White arrow in the *egfp* condition) Post-crossing tract. Bar, 100 μm . (L) *Gfp* staining in cross-sections illustrating growth cone stalling at the FP entry in the Plexin-A1 but not *egfp* condition. (White arrows) Stalling growth cones and aberrant post-crossing axon trajectories. Bar, 100 μm .

Nawabi et al.

We counted the number of growth cones in the red and green channels before FP entry, within the FP, and after FP exit in the Plexin-A1-PhLuo/rfp and egfp/rfp conditions (total of 73 sections from six embryos, 587 growth cones). The number of growth cones distributed equally before and after FP crossing in the egfp/rfp controls. In striking contrast, the number of green but not red fluorescent growth cones in the Plexin-A1-PhLuo condition was strongly shifted to the crossing and post-crossing categories (Fig. 3F). Thus, in vivo, the Plexin-A1 cell surface level is kept very low in commissural growth cones at the precrossing stage and is up-regulated during FP-in-growth.

If the Plexin-A1 level is central to the regulation of growth cone responsiveness, then modifying Plexin-A1 levels should alter commissural growth cone behaviors. Accordingly, knockdown should invalidate the sensitization, and overexpression should mimic the effect of FP signals and confer responsiveness to Semaphorin 3B. First, Plexin-A1 was knocked down in cultured neurons by siRNA transfection. Efficiency and specificity were controlled by immunolabeling in cultured commissural neurons and in Western blot (Fig. 3G). Analysis of growth cone behaviors showed that those extending from neurons in which Plexin-A1 was silenced were unable to acquire responsiveness to Semaphorin 3B upon exposure to FP^{cm} (50 neurons analyzed per condition, two independent experiments) (Fig. 3G). Second, the Plexin-A1 level was increased by overexpression of Plexin-A1-PhLuo in cultured commissural neurons (Fig. 3H). Intense fluorescence was detected in the soma and growth cone compartment, demonstrating the ectopic accumulation of overexpressed Plexin-A1 at the growth cone surface. In this condition, the growth cones were found responsive to the collapsing effect of Semaphorin 3B in the absence of FP^{cm}. As control for Plexin-A1-PhLuo functionality, similar results were obtained after transfection of a vsv-tagged Plexin-A1 form (Supplemental Fig. S7A). Similar results were obtained in neurons isolated from the chick embryo (Supplemental Fig. S7B). We also performed rescue experiments (Fig. 3I). siRNA directed against endogenous mouse *Plexin-A1* (*mPlexA1*) was cotransfected with chick Plexin-A1-egfp fusion (*cPlexA1*), which escapes the silencing. Knockdown and overexpression was confirmed by immunolabeling with a Plexin-A1 antibody recognizing *mPlexA1* but not *cPlexA1*, and gfp observations to detect *cPlexA1*. We observed in a collapse assay that *cPlexA1* could rescue the sensitivity of neurons in which endogenous *mPlexA1* was abolished (Fig. 3J). As observed in the overexpression-alone condition, the sensitization was no longer dependent on FP^{cm}. Thus, an artificial increase of the Plexin-A1 level mimics the effect of the FP^{cm} and is sufficient for conferring responsiveness to Semaphorin 3B. We also examined the consequences of knockdown of another Plexin-A, Plexin-A3, which appeared to be expressed by commissural neurons. Nevertheless, siRNA transfection, which efficiently and specifically extinguished Plexin-A3, did not prevent commissural axon responses to Semaphorin 3B (Supplemental Fig. S7C).

We next assessed the consequences of in vivo Plexin-A1 overexpression. *Plexin-A1* and *egfp* constructs were overexpressed by electroporation in the chick neural tube

(total of 24 embryos, 240 crystals). Given that Semaphorin 3B is produced at the midline, but also along the precrossing axon route, premature responsiveness should affect the growth of precrossing axons and their entry in the FP. The pattern of commissural projections was first examined by insertion of DiI in the dorsal domain of open book preparations (Fig. 3K). In embryos overexpressing Plexin-A1/egfp but not egfp alone, a significant proportion of commissural axons failed to reach and enter the FP (Fig. 3K; Supplemental Fig. S7D). Transversal sections were also performed to visualize the trajectory of individual egfp⁺ axons. Consistent with the in toto DiI analysis, growth cones accumulated at the FP entry in the Plexin-A1/egfp⁺ but not egfp⁺ condition (Fig. 3L). This phenotype was thus consistent with the acquisition of the precrossing commissural response to the FP-repellent Semaphorin 3B.

FP signals suppress proteolytic calpain1 activity to increase Plexin-A1 level

Next, we explored the metabolic pathways by which FP signals trigger increase of the Plexin-A1 level. We assessed activation of protein synthesis and, conversely, inhibition of proteasomal degradation, as both of these pathways were described to regulate guidance receptor levels at the midline (Brittis et al. 2002; Garbe and Bashaw 2004). We took a pharmacological approach in our culture assay, and quantified the Plexin-A1 level in the soma and the growth cone compartments. Application of MG132, a proteasome inhibitor, had no detectable effect on the Plexin-A1 level in both the soma and the growth cone (Fig. 4A). Surprisingly, inhibition of protein synthesis with anisomycin prevented the FP^{cm}-triggered gain of Plexin-A1 in the soma, but notably not in the growth cone (Fig. 4B,E). Thus, these pathways are unlikely to control the increase of Plexin-A1 levels by FP signals. We then assessed the possible implication of proteolytic processing by first applying a cocktail of inhibitors that blocks a panel of proteases, such as serine proteases, cysteine proteases, and metalloproteases (Fig. 4C). Interestingly, in the soma and the growth cone, this treatment increased Plexin-A1 and induced its accumulation in the filopodia in the control condition, fully mimicking the FP^{cm} condition. Moreover, combined pharmacological and FP^{cm} treatments did not produce additive effects, thus likely affecting a common pathway. We investigated the nature of the protease and found that specific inhibition of the cysteine protease calpain1 with ALLn (1 μ M) recapitulated the effect of the cocktail (Fig. 4D,E). In contrast, Nrp2 level was not found increased by calpain1 inhibition (Supplemental Fig. S8A). The presence of calpain1 in commissural neurons was confirmed by immunolabeling (Fig. 4F). If calpain1 maintains Plexin-A1 at low levels, then its inhibition should confer responsiveness to Semaphorin 3B. Calpain1 was thus knocked down with siRNA transfected in neuronal cultures. Efficiency and specificity of the siRNAs were controlled in immunolabeling and Western blots (50 neurons per condition, two independent experiments) (Fig. 4G; Supplemental Fig. S8B). Analysis in collapse assays demonstrated

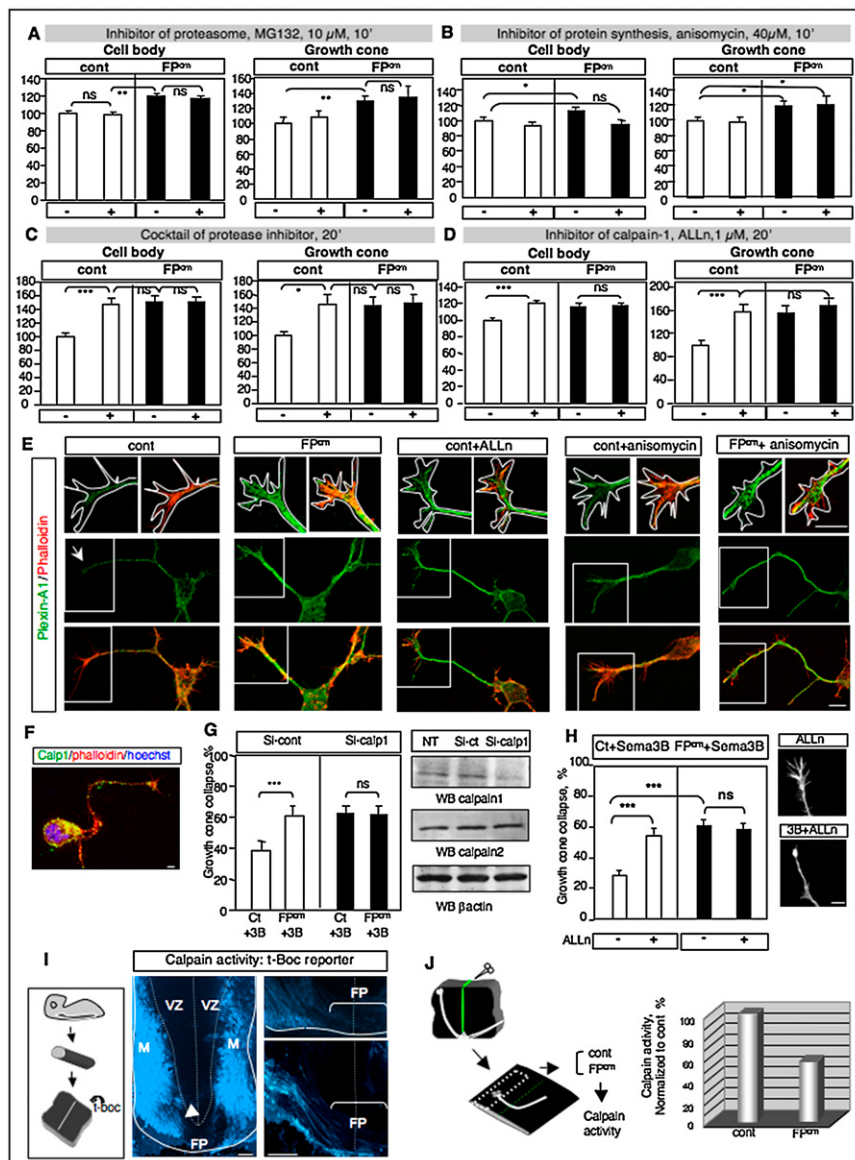


Figure 4. The Plexin-A1 level is regulated by a calpain1-dependent protease pathway. (A) Application of the proteasome inhibitor MG132 has no effect on Plexin-A1 levels, both in control and FP^{cm} conditions. (B) Inhibition of protein synthesis with anisomycin blocked FP^{cm}-induced Plexin-A1 up-regulation in the soma but had no effect in the growth cone. Note that applications were shortened to 10 min to limit cytotoxicity. FP^{cm}-induced increase of Plexin-A1 is attenuated but still significant. (C) A cocktail of protease inhibitors increased the Plexin-A1 level in the soma and the growth cone when applied in the basal condition, but not with FP^{cm}. (D) Inhibition of calpain1 had similar effects. (E) Illustrations of neuronal cultures showing that protein synthesis inhibition does not prevent FP^{cm}-induced increase of Plexin-A1 (green) in the growth cone. Illustrations of increase of Plexin-A1 and accumulation in the filopodia (green) induced by the calpain1 inhibitor ALLN as with the FP^{cm}, compared with control. Anisomycin treatment does not prevent Plexin-A1 accumulation in the FP^{cm} condition. (F) Coimmunolabeling of calpain1 (green) and phalloidin (red) in cultured commissural neurons. Bar, 15 μm. (G) Calpain1 knockdown experiments with siRNA. Immunoblots of neuroblastoma cell lysates showing the efficiency of the si-calp but not the si-control (si-cont) to silence endogenous calpain1. Calpain-2 level is not altered by the si-calp. The histogram shows acquisition of growth cone collapse response to Sema3B in the basal condition induced by calpain1 silencing. (H) Collapse assay showing that calpain1 inhibition with ALLN (1 μM) conferred responsiveness to Sema3B in the basal condition (control). Bar, 15 μm. (I) Endogenous calpain activity in unfixed chick spinal cord sections using

t-Boc. The fluorescence is detected in the mantle (M) but not in the ventricular zone (VZ) and the FP. The magnification illustrates the sharp decrease of fluorescence in commissural axons entering the FP. Bar, 100 μm. (J) Measure of endogenous calpain activity in dorsal spinal tissue stimulated with FP^{cm}. The histogram presents the decreased rate of calpain1 activity in tissue treated with FP^{cm} normalized to control condition.

that application of the calpain1 inhibitor ALLN (1 μM) in the neuronal cultures conferred responsiveness to Sema3B, in the absence of FP^{cm} (number of growth cones per condition: 155 for control, 126 for control/ALLN, 123 for FP, and 127 for FP/ALLN; two independent experiments) (Fig. 4H). Knockdown of calpain1 with siRNA resulted in similar effects (Fig. 4H).

These data suggested that calpains might be active in commissural neurons to process Plexin-A1 at the pre-crossing stage but not in crossing axons, due to the action of the FP signals. To address this issue, we first investigated the pattern of calpain activity in the developing chick spinal cord (Fig. 4I). Spinal cords were isolated from

HH25 (Hamburger and Hamilton 25) embryos, rapidly sectioned into 200-μm-thick slices; incubated for 15 min with the calpain activity reporter t-Boc, whose cleavage produces blue fluorescence (Robles et al. 2003); and observed immediately with a confocal microscope. As expected, intense fluorescence was detected in the mantle where post-mitotic spinal neurons reside. In contrast, any fluorescent staining was detected in the ventricular zone containing the progenitors and the FP. Notably, although the t-Boc fluorescence in cell populations along the commissural pathway prevented assessment of calpain activity in commissural axons in the dorsal and intermediate spinal cord domains, at more ventral positions,

Nawabi et al.

t-Boc fluorescence was very clear in precrossing fibers, abruptly disappearing in crossing axon segments at all confocal Z positions (Fig. 4I).

Second, we measured endogenous calpain activity in fresh dorsal spinal cord tissue after exposure to control and FP^{cm} treatments using a biochemical approach that, unlike t-boc staining, allowed quantitative analysis. Consistent with our model, decrease of calpain activity by 52% was found in the samples stimulated with FP^{cm} compared with the controls, and the decrease could be reproduced in four independent experiments (Fig. 4J).

If calpain activity is required for precrossing commissural axon guidance, its inhibition should produce guidance defects at the FP. To address this issue, intraperitoneal injections of MDL28170 (or calpain inhibitor III), a calpain inhibitor that crosses the blood-brain barrier and efficiently inhibits calpain activity in the CNS (Markgraf et al. 1998; Mingorance-Le Meur and O'Connor 2009), were performed in pregnant mice at successive E10.5 and E11.5. Commissural axon trajectories were

analyzed in open book preparations of E12.5 embryos (number of crystals/number of embryos: 73/six for vehicle and 204/nine for MDL28170) (Fig. 5A). In the vehicle-treated animals, commissural axons reached the FP in almost all cases, whereas in the MDL28170-treated animals, commissural axons stopped growing, turned in both directions, or stalled at the FP entry in 25% of the cases. The crossing and post-crossing trajectories of axons that could reach the FP were not deeply modified, and axons turned in an appropriate direction after FP crossing. Thus, calpain activity is required for commissural axons to reach and enter the FP, consistent with our finding that calpain activity silences precrossing commissural responsiveness to the FP cue Sema3B.

Finally, we examined whether Plexin-A1 is processed through direct or indirect action of calpain1. First, we performed an *in vitro* cleavage assay (Fig. 5B). *Plexin-A1* was translated *in vitro* in the presence of MetS35, and the product was incubated with purified active calpain1 and analyzed in Western blot. We found that Plexin-A1 is cleaved into two major fragments of apparent molecular masses of 55 kDa and 45 kDa. Inhibition of calpain1 activity by EDTA blocked the processing. Positive control of calpain activity was done with a known calpain target, the focal adhesion kinase (FAK). Second, Plexin-A1 tagged in Nter with Flag was transfected in COS7 cells. The cells were incubated by ALLn or control treatment, and Plexin-A1 band patterns were compared in Western blot (Fig. 5C). We observed two Plexin-A1 bands at ~70 kDa and 50 kDa in the control condition that were strongly reduced when calpain1 activity was inhibited with ALLn. Similar band patterns were observed using N-ter vsv-Plexin-A1 fusion and gfp-Plexin-A1 fusion (data not shown). Differences of masses between these two assays likely reflected post-translational modifications in cell lines. Thus, the Plexin-A1 extracellular domain is processed by calpains. Third, we examined whether such processed fragments could be detected in spinal dorsal

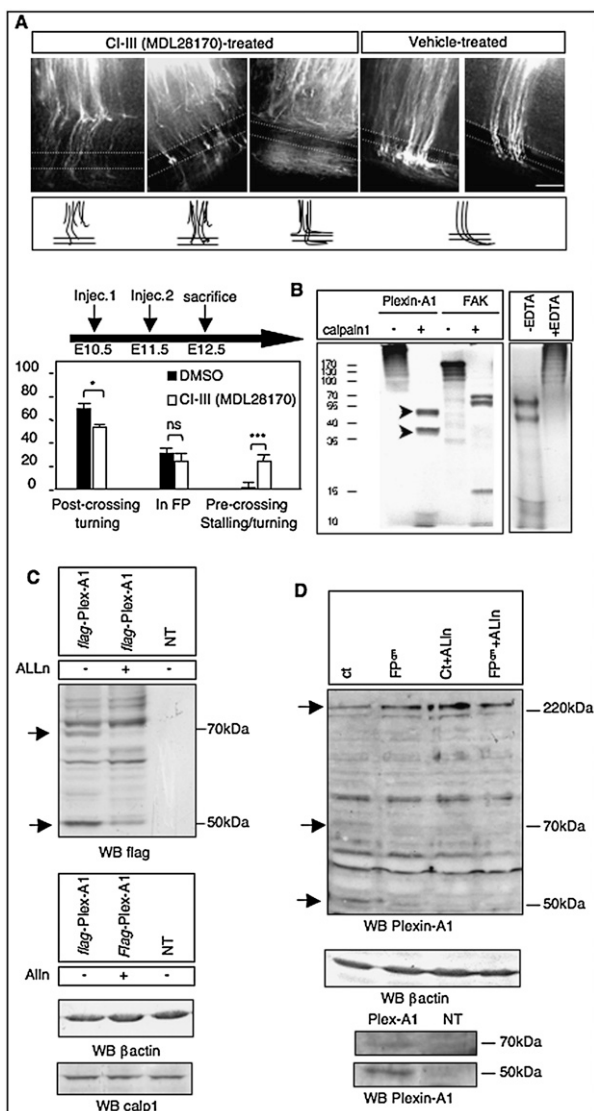


Figure 5. Calpain is required for precrossing commissural axon guidance and cleaves Plexin-1. (A) Illustrations and quantifications of DiI labeling in open book preparations. Inhibition of calpain activity induces significant defects of precrossing axon behaviors, with axons failing to enter the FP or turning before crossing. Bar, 100 μ m. (B) Autoradiography of Western blot showing that *in vitro* translated Plexin-A1 is cleaved by active calpain1 into two main fragments. Positive control: FAK. Plexin-A1 is not processed when calpain1 is inhibited by EDTA. (C) Western blot showing that Flag-Plexin-A1 transfected in COS7 cells is processed by endogenous calpain1 into two fragments. The fragments are reduced by ALLn application. (Right panel) Western blot to detect calpain1 and β actin in the same samples. (D) Western blot showing Plexin-A1 processing in fresh dorsal tissue in control and FP^{cm} conditions. Inhibition of calpain1 by ALLn in the control condition induced accumulation of full-length Plexin-A1 and reduction of the processed fragments. The band patterns of control + ALLn and FP^{cm} are similar. ALLn application in the FP^{cm} condition does not modify the band pattern. (Bottom panel) Plexin-A1-processed fragments are detected with the same anti-PlexinA1 antibody in transfected COS cells but not in nontransfected control COS7 cells (NT).

tissue (Fig. 5D). Dorsal spinal cords were dissected from E12.5 embryos, and were treated with control and FP^{cm} in the presence and absence of ALLn. Plexin-A1 band patterns were compared in Western blot using an antibody recognizing Plexin-A1 extracellular epitopes. Notably, in the control condition, the full-length Plexin-A1 band was strongly increased by ALLn, while conversely, the processed fragments that we found present in the samples were strongly decreased. As expected, the Plexin-A1 band pattern of FP^{cm} and control + ALLn was similar, and the presence of ALLn in the FP^{cm} did not modify the band pattern (Fig. 5C). Thus, these experiments provided evidence that calpain1 activity in spinal commissural

neurons cleaves Plexin-A1, and that this processing is suppressed by FP signals.

The FP cue NrCAM regulates Plexin-A1 level and commissural responsiveness to Sema3B

In the next step, we explored the nature of the active components mediating the gain of response to Sema3B. NrCAM was an interesting candidate due to its high and restricted expression in the FP, and its functional properties to regulate axon growth and guidance during the formation of various commissural tracts (Fig. 6A; Falk et al. 2005; Williams et al. 2006). Moreover, metalloprotease-mediated release of

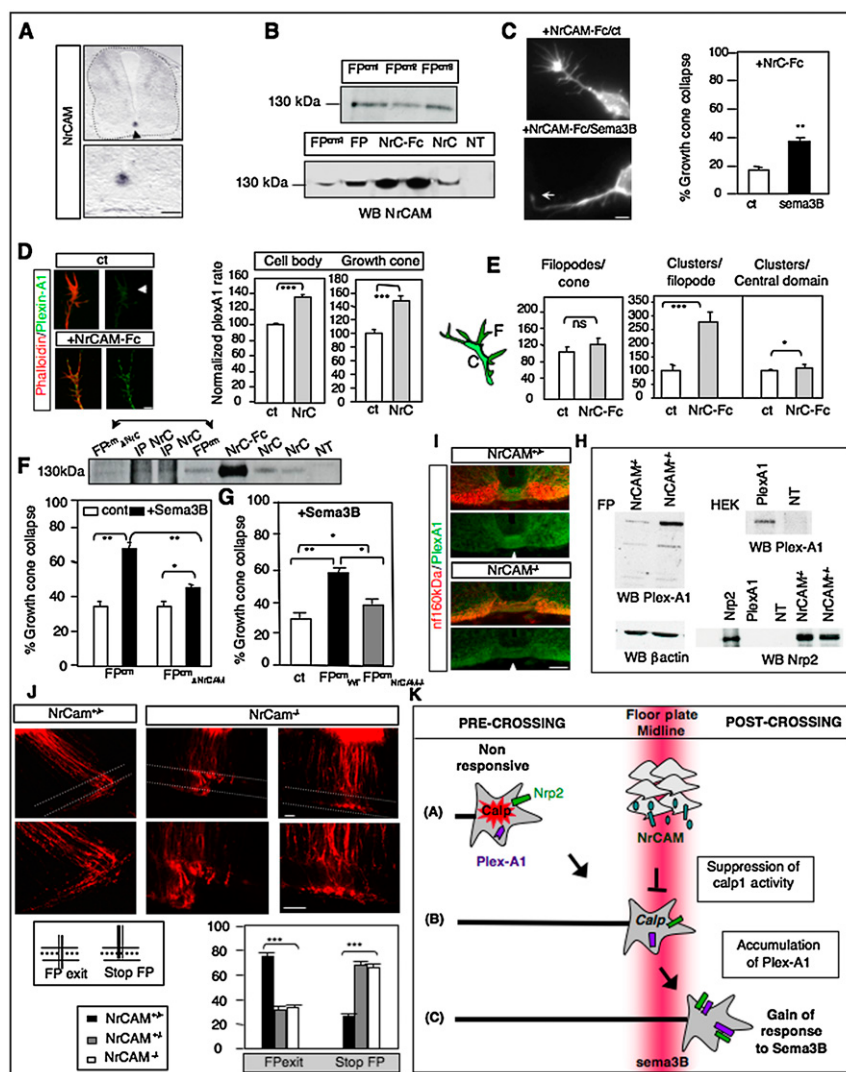


Figure 6. NrCAM is an active FP cue in the regulation of the Plexin-A1 level and acquisition of responsiveness to Sema3B. (A) In situ hybridization on E12.5 cross-sections showing mRNA transcript of *NrCAM* in the FP. (B) Western blot showing detection of NrCAM in four independent samples of FP^{cm} and in FP extracts (FP). (C) Collapse assay with chimeric NrCAM-Fc. Application of NrCAM-Fc combined with Sema3B allows commissural neurons to acquire responsiveness to Sema3B, while NrCAM-Fc, when applied alone, has no effect. (D) Application of NrCAM-Fc triggers a significant increase of Plexin-A1 levels in the soma and growth cones of cultured commissural neurons. (E) Plexin-A1 clusters accumulate in the growth cone peripheral domain upon exposure to NrCAM-Fc, while the number of filopodia per growth cone remains comparable. (F) NrCAM was biochemically depleted from the FP^{cm} through immunoprecipitation with anti-NrCAM antibody (compare bands pointed to by the arrow). The Western blot shows strong reduction of NrCAM detection in this sample (FP^{cm}_{ΔNrCAM}) compared with native FP^{cm}. In functional collapse assays, the efficiency of FP^{cm}_{ΔNrCAM} to trigger responsiveness to Sema3B was significantly decreased, compared with native FP^{cm}. In the experiments using FP^{cm}_{ΔNrCAM}, the control (cont) medium was also preincubated with an antibody to normalize possible non-relevant effects of the biochemical depletion. (G) FP was isolated from the *NrCAM* mutant mouse line to produce FP^{cm}. This medium was significantly less efficient than the wild-type FP^{cm}. (H) Immunohistochemical labeling of E12.5 cross-sections showing a decrease of Plexin-A1 reactivity in the FP of *NrCAM*^{-/-} embryos, compared with wild-type embryos. (I) The Plexin-A1 level

in FP extracts from *NrCAM*^{+/+} and *NrCAM*^{-/-} embryos was compared in Western blot. NrCAM deficiency induced a strong decrease of the Plexin-A1 level, while the Nrp2 level remained constant. (J) Analysis of commissural projections in open book preparations from the *NrCAM* mouse line. The microphotographs and histogram show that *NrCAM* deficiency induced significant defects of FP crossing, with axons stalling in the FP. Bar: A, H, J, 100 μm; C, D, 15 μm. (K) Model for the mechanisms controlling the acquisition of Sema3B responsiveness at the ventral midline. (Panel A) At the precrossing stage, active calpain1 cleaves the signaling coreceptor Plexin-A1 and silences Sema3B responsiveness. (Panel B) During FP in-growth, commissural axons are exposed to FP signals that suppress calpain1 activity. (Panel C) Plexin-A1 is allowed to accumulate in the growth cones, thus sensitizing them to Sema3B. This guidance response participates in the FP exit.

Nawabi et al.

active NrCAM ectodomain has been reported, making it possible that soluble NrCAM contributes to the property of the FP^{cm}. We thus assessed the presence of NrCAM in the FP^{cm} by Western blot and could detect, with an antibody recognizing NrCAM extracellular epitopes, a 130-kDa NrCAM form corresponding to NrCAM ectodomain (Fig. 6B). We next assessed the functional properties of NrCAM ectodomain in our neuronal assay. Soluble NrCAM-Fc was applied to commissural neurons. While the level of collapse was very low in the presence of NrCAM-Fc alone, it significantly increased when NrCAM was applied with Sema3B, indicating that NrCAM-Fc could trigger responsiveness to Sema3B (Fig. 6C). As expected, NrCAM-Fc application could also increase Plexin-A1 level in commissural cell bodies and growth cones, and the protein accumulated in the growth cone peripheral domain (Fig. 6D,E). Next, to determine whether NrCAM contributes to the property of the FP^{cm}, NrCAM was depleted from the medium by immunoprecipitation with an anti-NrCAM antibody. As controlled by Western blot, this procedure strongly reduced the NrCAM level in the FP^{cm} (Fig. 6F). This FP^{cm}_{ΔNrCAM} was applied to commissural neurons, and its efficiency in triggering growth cone responsiveness to Sema3B was significantly attenuated (Fig. 6F). We also assessed the consequence of *NrCAM* genetic ablation by producing FP^{cm} from *NrCAM*-null embryos. Consistently, the effect of the FP^{cm} was almost totally abrogated, indicating that NrCAM is a major active component of the FP^{cm} (Fig. 6G). To validate these data, we investigated whether NrCAM deficiency alters Plexin-A1 level in the FP. First, immunolabeling was performed on E12.5 *NrCAM*^{+/+} and *NrCAM*^{-/-} embryonic cross-sections. We observed a decrease of Plexin-A1 labeling in the FP of the *NrCAM*-null embryos compared with wild-type embryos (Fig. 6H). Second, FP tissue was dissected from *NrCAM*^{-/-} and *NrCAM*^{+/+} embryos originating from the same littermates, and the Plexin-A1 band pattern was analyzed in Western blot. The Plexin-A1 band was strongly decreased in the samples from *NrCAM*^{-/-} embryos compared with those of the wild-type embryos, while, as control, Nrp2 level remained similar (Fig. 6I). By altering the Plexin-A1 level and subsequently the gain of response to Sema3B, NrCAM deficiency would then be expected to impair FP exit. Consistently, in open book preparations labeled with DiI, we found that a significant proportion of axon tracts stalled in the FP of the *NrCAM*^{-/-} embryos instead of exiting the FP to turn rostrally, as observed in *NrCAM*^{+/+} embryos (Fig. 6J).

Discussion

The present study identifies a pathway-dependent mechanism in vertebrates by which spinal commissural axons acquire sensitivity to a midline-derived repellent of the Semaphorin family. Sema3s share typical receptor organization in multimolecular complexes (Kruger et al. 2005). We found that precrossing commissural axons are maintained unresponsive to Sema3B by the protease calpain1, processing the signaling moiety of the Sema3B

receptor complex, Plexin-A1, to prevent expression of the integral protein in commissural growth cones. Exposure to the local FP signal NrCAM suppresses this processing, enabling full-length Plexin-A1 accumulation in crossing commissural growth cones, thus switching on their responsiveness to Sema3B (Fig. 6K).

Semaphorin3B/Plexin-A1 signaling regulates guidance decisions at the ventral midline

Several ligand/receptor pairs regulate commissural axon guidance at the midline, playing synergic and complementary roles (Garbe and Bashaw 2004). First, Netrin/DCC and Shh/BOC attract commissural axons toward the FP (Okada et al. 2006). Repulsive Slit/Robo signaling ensures that axons exit the FP and do not cross the midline again. Nevertheless, genetic loss of Robo signaling (*Robo1* and *Robo2*) does not totally abolish FP exit, thus indicating that other cues participate in this process (Dickson and Gilestro 2006). Recent work identified SCF1 as an additional cue whose growth-promoting effect helps commissural axon exiting the FP (Gore et al. 2008). Ephrin-Bs are other candidates, particularly Ephrin-B3, which is expressed by the FP (Kadison et al. 2006). Zou et al. (2000) showed that important guidance decisions in the FP are mediated by the Semaphorin receptor Nrp2. We found that, in *Sema3B*-null mutant mice, commissural axons often stall in the FP or grow at aberrant directions after midline crossing. These defects are very similar to those observed in the *Nrp2* knockouts, thus showing that Sema3B might be the Nrp2 ligand required in vivo for proper commissural guidance at the midline. Nevertheless, despite their common expression at the ventral midline, Slits and Sema3B chemorepellents likely have specific roles, since the recrossing of commissural axons characterizing the loss of Robo/Slit signaling was not detected in the *Sema3B* knockouts. We could identify Plexin-A1 as the Plexin-A family member mediating Sema3B responses in spinal commissural axons. Likewise, Plexin-A1 is synthesized by commissural neurons, and its invalidation by siRNA abolishes the Sema3B-induced collapse response of their growth cones, normally triggered by FP signals. Moreover, *Sema3B*- and *Plexin-A1*-null embryos develop similar guidance defects of commissural projections at the FP.

Processing of guidance receptor by calpains: a mechanism for silencing Sema3B responsiveness at precrossing stage

In *Drosophila*, responsiveness of precrossing commissural axons to Slit is silenced through coupling of the Slit receptor Robo to Commissureless, and sorting for proteasome degradation (Dickson and Gilestro 2006). In vertebrates, a spliced variant of one of the three *Robo* gene products, Robo-3.1, appears as a functional equivalent of *Drosophila* Commissureless, preventing through a yet-undetermined mechanism Robo1 and Robo2 from mediating responsiveness to Slits at the precrossing stage (Sabatier et al. 2004; Chen et al. 2008). The present study

highlights a novel mechanism by which precrossing commissural responses are silenced, based on processing of guidance receptors.

An interesting aspect of this pathway is that it does not prevent ligand/receptor interaction as for the Robo/Slit pair in *Drosophila* and possibly in vertebrates, since Nrp2 sorting to the growth cone surface is not prevented. Rather, it precludes accumulation of full-length signaling moiety of the receptor complex specifically transducing Sema3B in these neurons. This mechanism is advantageous and well-suited to the Semaphorin signaling, as it enables the other receptor subunit, Nrp2, to engage in other complexes.

Calpains are calcium-dependent cysteine proteases, regulating various processes. For example, they play pivotal roles in cell motility and synaptic functions by cleaving components of adhesion complexes and neurotransmitter receptors (Carragher and Frame 2002; Wu and Lynch 2006). Their functions during neuronal development are less characterized, but calpains are present in neuronal growth cones, are activated by intracellular calcium transients to reduce growth cone motility, and also are found downstream from Semaphorin5B (To et al. 2007). Interestingly, calpains process rather than degrade proteins, and are seen as regulators of protein functions, modulating protein-protein interactions, phosphorylation state, distribution, and traffic (Carragher and Frame 2002). Our data indicate that calpain1 is active in commissural neurons and maintains the integral form of Plexin-A1 at very low levels at the precrossing stage by cleaving the Plexin-A1 extracellular domain, generating two fragments that can be detected in Western blot. This processing could take place before protein sorting to the cell membrane. Likewise, previous studies reported detection of calpain in the lumen of endoplasmic reticulum and golgi vesicles, thus being at an appropriate location for cleaving neosynthesized target proteins during their intracellular traffic (Hood et al. 2004, 2006). Alternatively, Plexin-A1 could be cleaved at the cell surface, since increasing evidence indicates that calpains are externalized and can be retained to the membrane surface through association with proteoglycans (Abe et al. 1998; Nishihara et al. 2001; Frangie et al. 2006; Peltier et al. 2006). Several of our results support an important role for calpain activity during precrossing commissural axon guidance. First, in the spinal cord sections, calpains were found active in spinal neurons and precrossing commissural axon segments. Second, inhibition of calpain activity in vivo resulted in strong defects of commissural axon behaviors before FP crossing: axons failing to enter the FP, turning before FP crossing, or even not reaching the FP. Interestingly, all of these defects were also induced by Plexin-A1 overexpression in the chick embryo, thus supporting that calpain-1 activity prevents Plexin-A1 expression at the precrossing stage. Whether this protease suppresses precrossing commissural responses to other midline repellents by processing guidance receptors other than Plexin-A1, such as Robo1/2 or Eph receptors, is an intriguing possibility that will be assessed in future studies.

Commissural axons acquire Sema3B responsiveness through a pathway-dependent mechanism, implicating local FP signals

Our results showed that suppression of calpain activity in the FP is instrumental for the gain of commissural responsiveness to Sema3B. Several data support this conclusion. First, in unfixed spinal cord sections, calpain were not active in FP cells or in the crossing axon tract. Second, we found that the FP tissue released signals that inhibit calpain activity in spinal tissue. Third, suppression of calpain activity could increase integral Plexin-A1 levels in acute dorsal tissues and cultured commissural neurons and induce responsiveness to Sema3B.

Commissural axons were found to acquire responsiveness to a variety of repellents, but whether this occurs through a pathway-dependent or pathway-independent mechanism remains unclear. In the *Xenopus* visual system, the temporal switch from attractive to repulsive behavior of retinal axons to Netrin1 does not depend on pathway experience (Shewan et al. 2002). Our data do not support the view that such an experience-independent mechanism operates to confer responsiveness to Sema3B at the midline. First, dorsal spinal neurons isolated from early E11 to late E13.5 were equally unresponsive to exogenous Sema3B application (Supplemental Fig. S3B). Second, in open book preparations, removing the FP was sufficient to abolish the repulsive behavior of commissural neurons to a focal source of Sema3B. Finally, neurons became sensitive to Sema3B upon exposure to FP^{cm}, independent from the developmental stage at which they were collected. Our data thus support that signals emanating from intermediate target cells play pivotal roles in the switch of responsiveness.

Consistently, we could show that the Ig superfamily cell adhesion molecule NrCAM is an active FP component, regulating the Plexin-A1 level and acquisition of responsiveness to Sema3B. High levels of NrCAM transcripts were detected in the FP, and the protein was present in the FP^{cm}. In our neuronal assay, soluble NrCAM mimicked the FP^{cm}, triggering responsiveness to Sema3B and increase of the PlexinA1 level. In contrast, neither Netrin-1 nor Shh could recapitulate the gain of responsiveness to Sema3B conferred by the FP^{cm} (H Nawabi and V Castellani, unpubl.). Moreover, the biochemical or genetic depletion of NrCAM strongly altered the properties of the FP^{cm}. In vivo, strong decrease of the Plexin-A1 level in the FP of NrCAM-null embryos was found and significant amounts of axon tracts abnormally stalled in the FP. NrCAM is expressed by various developing neuronal projections, and several previous studies implicated it in the regulation of axon navigation, as receptors or coreceptors for environmental guidance cues (Lustig et al. 2001; Falk et al. 2005; Williams et al. 2006). Likewise, NrCAM interaction with Nrp2 was found to be required for axons to normally form the anterior commissure in the brain, and NrCAM expression is required by RGC axons to form proper patterns of ipsilateral/contralateral commissures in the visual system (Falk et al. 2005; Williams et al. 2006). Interestingly, NrCAM is highly expressed in specialized

Nawabi et al.

glial structures in the ventral midline—not only in the spinal cord, but also in all upper floors of the CNS (Lustig et al. 2001)—but how NrCAM glial sources contribute to axon pathfinding remains unknown. The present work establishes a novel function for NrCAM as an intermediate target cue regulating the expression level of guidance receptors in the growth cones to control pathway choices at the ventral midline.

Materials and methods

Genotyping and vector cloning

Genotyping was performed as described in Falk et al. (2005), Yoshida et al. (2006), Takegahara et al. (2006), and Sakurai et al. (2001). Mouse Plexin-A1-PhLuorin was generated by introducing in Nter the coding sequence of the PhLuorin cloned from a vector encoding GABA A-PhLuorin-gfp (Jacob et al. 2005). Gfp was fused in Nter of the coding sequence of chick Plexin-A1.

Western blot

Spinal cords from E12.5 embryos were prepared in an open book configuration. Tissues were treated with control supernatant and FP^{cm} with or without ALLn (10 μ M; Sigma) for 30 min. Dissected tissues were lysed in 2 \times laemmli buffer. Cos7 cells transfected (Exgen, Euromedex) with Flag-plexinA1, vsv-Plexin-A1, and gfp-Plexin-A1 were treated for 1 h with ALLn (10 μ M; Sigma). Samples were analyzed by Western blot using goat anti-Nrp2 (1/1000; R&D), rabbit anti-plexA1 (1/1000; AbCAM), anti-Calpain1 and anti-Calpain2 (1/500, Santa Cruz Biotechnologies), anti-NrCAM (1/1000; AbCAM), anti-vsv (1/1000; Sigma), anti-Flag (1/1000), and anti- β -actin (1/1000; Sigma) antibodies.

Cocultures, explant cultures, cultures of dissociated neurons, and collapse assay

FPs were isolated from E12.5 embryos and cultured in three-dimensional plasma clots (Castellani et al. 2000) in B27-supplemented Neurobasal medium (Gibco). The supernatant was collected after 48 h. For coculture experiments, HEK 293 cells were transfected with plasmids encoding either Sema3B-Alcaline Phosphatase fusion protein or control Alcaline Phosphatase. Cell aggregates were cocultured with spinal cord open books as described in Falk et al. (2005). Cocultures and spinal cord explants with or without FP were grown for 24 or 48 h, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), and stained with phalloidin-TRITC or with an anti-neurofilament antibody, or with anti-DCC antibody (BD Bioscience) and anti-PlexinA1 antibody (Santa Cruz Biotechnologies). Axon outgrowth was quantified by measuring axon length using Image J software. Plexin A1 and DCC fluorescence levels were quantified with Image J software, as in Moret et al. (2007). For the collapse assay, dorsal spinal cord tissues from E11.5, E12.5, or E13.5 embryos were dissociated, and cells were plated into polylysine- and laminin-coated glass coverslips in Neurobasal supplemented with B27, glutamine (Gibco), and Netrin-1 (R&D) medium. After 1 or 2 d in vivo (DIV), neurons were incubated with control or FP^{cm} or different molecules for 30 min at 37°C. Then Sema3B-AP was added on cells for 30 min at 37°C. Cells were fixed in PFA 4%/1.5% sucrose and labeled with phalloidin-TRITC (1/500; Sigma). Collapsed growth cones were scored as in Falk et al. (2005). The following were used: protease inhibitor cocktail (Sigma), calpain inhibitor I, ALLn (1 μ M; Sigma), actinomycin D (0.5 μ g/mL; Sigma), MG132

(10 μ M; Sigma), anisomycin (40 μ M; Sigma), and Shh (2 μ g/mL; Sigma). siRNA to Plexin-A1, calpain1, and control siRNA (Santa Cruz Biotechnologies) were transfected with Lipofectamin2000 according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen). Statistical comparisons were done with Student's *t*-test for collapse assays and ANOVA for analysis of fluorescence level: (*) *P*-value < 0.05; (**) *P*-value < 0.01; (***) *P*-value < 0.001.

Immunohistochemistry, in situ hybridization, and t-Boc assay

Immunolabeling of neuronal cultures and sections was performed with antibodies anti-Plexin-A1 (1/100; Santa Cruz Biotechnologies, AbCAM, Chemicon), anti-Plexin-A2 (1/100; Santa Cruz Biotechnologies), anti-Nrp2 (1/100; R&D), anti-L1-CAM (1/100; Chemicon), anti-Ngn1 (1/100; Santa Cruz Biotechnologies), anti-Math1 (1/250; Chemicon), anti-Robo3 (1/100; R&D), and anti-calpain1 (1/100; Santa Cruz Biotechnologies). Nuclei were stained with bisbenzimidazole (Promega) and actin with TRITC-phalloidin. Twenty-microgram cryosections were prepared from embryos fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in gelatin 7.5%/sucrose 15%, and incubated overnight at 4°C with antibodies anti-Nrp2 (1/100; R&D), anti-Plexin-A1 (1/100; AbCAM), and anti-Neurofilament (160 kDa, 1/100; RMO Zymed), and secondary antibodies Alexa 594, Alexa 488 (1/500; Invitrogen), and Fluoroprobe 546 (1/100) with bisbenzimidazole (1/1000; Promega). Chromogenic immunostaining and in situ hybridization were performed as described in Moret et al. (2007). For the t-Boc assay, 180 μ M fresh cross-sections from embryonic spinal cords were incubated for 10 min with t-BOC (20 μ M; Invitrogen). Staining was observed immediately using a confocal microscope.

Calpain inhibition in vivo

The calpain inhibitor III (in DMSO, diluted at 12.5 mg/kg; MDL28170, Calbiochem) was dissolved in saline solution (0.9% NaCl) and injected intraperitoneally into pregnant mice (Charles River) at 10.5 and 11.5 d post-coitum (dpc). The mice were sacrificed at 12.5 dpc, and the spinal cords from embryos were collected for open book preparations and DiI labeling. Controls were performed with DMSO-treated animals.

DiI staining on spinal cord open books

Spinal cords were prepared in an open book conformation and fixed in 4% PFA for 2 h. Small crystals of DiI (Invitrogen) were inserted in the dorsal part of one hemicord. Axon trajectories were observed using fluorescence microscopy after 48 h.

In ovo electroporation

In ovo electroporation of chick embryos (*Gallus gallus*, EARL Morizeau) was performed as described previously (Moret et al. 2007). Plasmids encoding Plexin-A1, egfp, or rfp were diluted at 2 μ g/ μ L in PBS, and at 0.5 μ g/ μ L for Plexin-A1-PhLuorin.

Analysis of calpain activity and in vitro cleavage assay

Isolated dorsal spinal cord fresh tissue was incubated for 30 min at 37°C with control and FP^{cm} supernatants, and was treated according to the manufacturer's instructions (Calbiochem). Calpain activity was measured by fluorogenic activity (Victor 3 multilabel counter, Perkin Elmer). Vectors encoding Plexin-A1 and FAK were transcribed and translated in vitro (TNT T7 kit, Promega) in the presence of Met^{S35}. The products were incubated with active calpain1 (Calbiochem), and were analyzed by

electrophoresis and autoradiography. EDTA was added in some experiments.

Statistical analysis

Statistics were done with ANOVA for quantification of Plexin-A1 levels and Student's *t*-test in all other cases. (***) $P < 0.0001$; (***) $P < 0.001$; (*) $P < 0.01$; (ns) not significant.

Acknowledgments

We thank J. Sanes and F. Rathjen for their gift of the Sema3B and NrCAM mouse lines, respectively; Camille Charoy and Cecile Herbreteau for their help; Geraldine Gouzer for her gift of plasmid; and the Center of Quantimetry of the University of Lyon1, Rockefeller. This work is supported by CNRS, Association Française contre les Myopathies (AFM), and ANR to V.C.; and AFM fellow to H.N. K.T. is supported by NIH grant RO1NS065048. Y.Y. is supported by NIH grant RO1NS065048.

References

- Abe M, Oda N, Sato Y. 1998. Cell-associated activation of latent transforming growth factor- β by calpain. *J Cell Physiol* **174**: 186–193.
- Augsburger A, Schuchardt A, Hoskins S, Dodd J, Butler S. 1999. BMPs as mediators of roof plate repulsion of commissural neurons. *Neuron* **24**: 127–141.
- Bechara A, Nawabi H, Moret F, Yaron A, Weaver E, Bozon M, Abouzeid K, Guan JL, Tessier-Lavigne M, Lemmon V, et al. 2008. FAK–MAPK-dependent adhesion disassembly downstream of L1 contributes to semaphorin3A-induced collapse. *EMBO J* **27**: 1549–1562.
- Brittis PA, Lu Q, Flanagan JG. 2002. Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target. *Cell* **110**: 223–235.
- Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. 1999. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96**: 795–806.
- Carragher NO, Frame MC. 2002. Calpain: A role in cell transformation and migration. *Int J Biochem Cell Biol* **34**: 1539–1543.
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G. 2000. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* **27**: 237–249.
- Chen Z, Gore BB, Long H, Ma L, Tessier-Lavigne M. 2008. Alternative splicing of the Robo3 axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion. *Neuron* **58**: 325–332.
- Cheng HJ, Bagri A, Yaron A, Stein E, Pleasure SJ, Tessier-Lavigne M. 2001. Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* **32**: 249–263.
- Colamarino SA, Tessier-Lavigne M. 1995. The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* **81**: 621–629.
- Dickson BJ, Gilestro GF. 2006. Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 651–675.
- Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyos-Becerra C, Bozon M, Rougon G, Grumet M, Puschel AW, et al. 2005. Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* **48**: 63–75.
- Frangie C, Zhang W, Perez J, Dubois YC, Haymann JP, Baud L. 2006. Extracellular calpains increase tubular epithelial cell mobility. Implications for kidney repair after ischemia. *J Biol Chem* **281**: 26624–26632.
- Garbe DS, Bashaw GJ. 2004. Axon guidance at the midline: From mutants to mechanisms. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**: 319–341.
- Gore BB, Wong KG, Tessier-Lavigne M. 2008. Stem cell factor functions as an outgrowth-promoting factor to enable axon exit from the midline intermediate target. *Neuron* **57**: 501–510.
- Hood JL, Brooks WH, Roszman TL. 2004. Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Biol Chem* **279**: 43126–43135.
- Hood JL, Brooks WH, Roszman TL. 2006. Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: An organelle transient. *Bioessays* **28**: 850–859.
- Imondi R, Kaprielian Z. 2001. Commissural axon pathfinding on the contralateral side of the floor plate: A role for B-class ephrins in specifying the dorsoventral position of longitudinally projecting commissural axons. *Development* **128**: 4859–4871.
- Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, Haydon PG, Moss SJ. 2005. Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABA_A receptors. *J Neurosci* **25**: 10469–10478.
- Kadison SR, Makinen T, Klein R, Henkemeyer M, Kaprielian Z. 2006. EphB receptors and ephrin-B3 regulate axon guidance at the ventral midline of the embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci* **26**: 8909–8914.
- Keleman K, Rajagopalan S, Cleppien D, Teis D, Paiha K, Huber LA, Technau GM, Dickson BJ. 2002. Comm sorts robo to control axon guidance at the *Drosophila* midline. *Cell* **110**: 415–427.
- Kidd T, Russell C, Goodman CS, Tear G. 1998. Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* **20**: 25–33.
- Kruger RP, Aurandt J, Guan KL. 2005. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 789–800.
- Lustig M, Erskine L, Mason CA, Grumet M, Sakurai T. 2001. Nr-CAM expression in the developing mouse nervous system: Ventral midline structures, specific fiber tracts, and neuropil regions. *J Comp Neurol* **21**: 13–28.
- Markgraf CG, Velayo NL, Johnson MP, McCarty DR, Medhi S, Koehl JR, Chmielewski PA, Linnik MD. 1998. Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **29**: 152–158.
- Mingorance-Le Meur A, O'Connor TP. 2009. Neurite consolidation is an active process requiring constant repression of protrusive activity. *EMBO J* **28**: 248–260.
- Moret F, Renaudot C, Bozon M, Castellani V. 2007. Semaphorin and neuropilin co-expression in motoneurons sets axon sensitivity to environmental semaphorin sources during motor axon pathfinding. *Development* **134**: 4491–4501.
- Nishihara H, Nakagawa Y, Ishikawa H, Ohba M, Shimizu K, Nakamura T. 2001. Matrix vesicles and media vesicles as nonclassical pathways for the secretion of m-Calpain from MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **285**: 845–853.
- 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.
- Peltier J, Bellocq A, Perez J, Doublier S, Dubois YC, Haymann JP, Camussi G, Baud L. 2006. Calpain activation and secretion

Nawabi et al.

- promote glomerular injury in experimental glomerulonephritis: Evidence from calpastatin-transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* **17**: 3415–3423.
- Robles E, Huttenlocher A, Gomez TM. 2003. Filopodial calcium transients regulate growth cone motility and guidance through local activation of calpain. *Neuron* **38**: 597–609.
- Sabatier C, Plump AS, Le M, Brose K, Tamada A, Murakami F, Lee EY, Tessier-Lavigne M. 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**: 157–169.
- Sakurai T, Lustig M, Babiarz J, Furley AJ, Tait S, Brophy PJ, Brown SA, Brown LY, Mason CA, Grumet M. 2001. Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. *J Cell Biol* **17**: 1259–1273.
- Shewan D, Dwivedy A, Anderson R, Holt CE. 2002. Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway. *Nat Neurosci* **5**: 955–962.
- Stein E, Tessier-Lavigne M. 2001. Hierarchical organization of guidance receptors: Silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**: 1928–1938.
- Takegahara N, Takamatsu H, Toyofuku T, Tsujimura T, Okuno T, Yukawa K, Mizui M, Yamamoto M, Prasad DV, Suzuki K, et al. 2006. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat Cell Biol* **8**: 615–622.
- To KC, Church J, O'Connor TP. 2007. Combined activation of calpain and calcineurin during ligand-induced growth cone collapse. *Mol Cell Neurosci* **36**: 425–434.
- 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* **18**: 535–547.
- Wu HY, Lynch DR. 2006. Calpain and synaptic function. *Mol Neurobiol* **33**: 215–236.
- Yoshida Y, Han B, Mendelsohn M, Jessell TM. 2006. PlexinA1 signaling directs the segregation of proprioceptive sensory axons in the developing spinal cord. *Neuron* **52**: 775–788.
- Yu TW, Bargmann CI. 2001. Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci* **4**: 1169–1176.
- Zou Y, Stoeckli E, Chen H, 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.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, Ralf H., Lohrum, Marion, Klostermann, Andreas, Betz, Heinrich, et Püschel, Andreas W. (1997). The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J*, **16**, 6077-6086.

Agalliu, D., Takada, S., Agalliu, I., McMahon, A. P., et Jessell, Thomas M. (2009). Motor Neurons with Axial Muscle Projections Specified by Wnt4/5 Signaling. *Neuron*, **61**, 708-720.

Allan, D. W. et Greer, J. J. (1998). Polysialylated NCAM expression during motor axon outgrowth and myogenesis in the fetal rat. *J. Comp. Neurol*, **391**, 275-292.

Ashby, M. C., Ibaraki, K., et Henley, J. M. (2004). It's green outside: tracking cell surface proteins with pH-sensitive GFP. *Trends in Neurosciences*, **27**, 257-261.

Bai, G., Chivatakarn, O., Bonanomi, D., Lettieri, K., Franco, L., Xia, C., Stein, Elke, Ma, L., Lewcock, J. W., et Pfaff, Samuel L. (2011). Presenilin-dependent Receptor Processing is Required for Axon Guidance. *Cell*, **144**, 106-118.

Bechara, A., Nawabi, H., Moret, F., Yaron, Avraham, Weaver, E., Bozon, M., Abouzid, K., Guan, J.-L., Tessier-Lavigne, Marc, Lemmon, V., et al. (2008). FAK-MAPK-dependent adhesion disassembly downstream of L1 contributes to semaphorin3A-induced collapse. *EMBO J*, **27**, 1549-1562.

Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, Geneviève, Haigh, J., Chauvet, S., et Mann, F. (2010). VEGFR2 (KDR/Flk1) Signaling Mediates Axon Growth in Response to Semaphorin 3E in the Developing Brain. *Neuron*, **66**, 205-219.

Bonanomi, D. et Pfaff, Samuel L (2010). Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a001735.

Bouquet, C. et Nothias, F. (2007). Molecular Mechanisms of Axonal Growth. Dans, Bagnard, D. (éd), *Axon Growth and Guidance*. Springer New York, New York, NY, p. 1-16.

Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T M, et Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*, **101**, 435-445.

Bron, R., Vermeren, M., Kokot, N., Andrews, W., Little, G. E., Mitchell, K. J., et Cohen, J. (2007). Boundary cap cells constrain spinal motor neuron somal migration at motor exit points by a semaphorin-plexin mechanism. *Neural Dev*, **2**, 21.

Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C S, Tessier-Lavigne, M, et Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*, **96**, 795-806.

Brown, C. B., Feiner, L, Lu, M. M., Li, J., Ma, X., Webber, A. L., Jia, L., Raper, J A, et Epstein, J. A. (2001). PlexinA2 and semaphorin signaling during cardiac neural crest development. *Development*, **128**, 3071-3080.

Brownstone, R. M. et Bui, T. V. (2010). Spinal interneurons providing input to the final common path during locomotion. *Prog. Brain Res*, **187**, 81-95.

Brunet, J.-F. et Pattyn, A. (2002). Phox2 genes -- from patterning to connectivity. *Current Opinion in Genetics & Development*, **12**, 435-440.

Buck, K. B. et Zheng, J. Q. (2002). Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *J. Neurosci*, **22**, 9358-9367.

Butler, A. B. et Hodos, W. (2005). Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation John Wiley and Sons.

Campbell, D. S. et Holt, C E (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*, **32**, 1013-1026.

Castellani, V, De Angelis, E., Kenwrick, S., et Rougon, G (2002). Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A.

EMBO J., **21**, 6348-6357.

Castellani, V, Chédotal, A, Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., et Rougon, G (2000). Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between *Sema3A* and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron*, **27**, 237-249.

Castellani, Valérie, Falk, J., et Rougon, Geneviève (2004). Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol. Cell. Neurosci.*, **26**, 89-100.

Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., Segu, L., Buhot, M.-C., Jessell, Thomas M., Henderson, C. E., et al. (2007). Gating of *Sema3E*/*PlexinD1* Signaling by *Neuropilin-1* Switches Axonal Repulsion to Attraction during Brain Development. *Neuron*, **56**, 807-822.

Chen, H. H. et Frank, E (1999). Development and specification of muscle sensory neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **9**, 405-409.

Chen, H, He, Z, Bagri, A., et Tessier-Lavigne, M (1998). Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron*, **21**, 1283-1290.

Chen, H.-H., Hippenmeyer, S., Arber, Silvia, et Frank, Eric (2003). Development of the monosynaptic stretch reflex circuit. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**, 96-102.

Chen, Hang, Chédotal, Alain, He, Zhigang, Goodman, Corey S, et Tessier-Lavigne, Marc (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, H. J., Bagri, A., Yaron, A, Stein, E, Pleasure, S. J., et Tessier-Lavigne, M (2001). *Plexin-A3* mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron*, **32**, 249-263.

Cohen, S., Funkelstein, L., Livet, J., Rougon, Geneviève, Henderson, C. E., Castellani, Valerie, et Mann, F. (2005). A semaphorin code defines subpopulations of spinal motor neurons during mouse development. *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 1767-1776.

Dalla Torre di Sanguinetto, S. A., Dasen, J. S., et Arber, Silvia (2008). Transcriptional mechanisms controlling motor neuron diversity and connectivity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **18**, 36-43.

Das, R. M., Van Hateren, N. J., Howell, G. R., Farrell, E. R., Bangs, F. K., Porteous, V. C., Manning, E. M., McGrew, M. J., Ohyama, K., Sacco, M. A., et al. (2006). A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon. *Dev. Biol.*, **294**, 554-563.

Dasen, J. S. (2009). Chapter 4 Transcriptional Networks in the Early Development of Sensory-Motor Circuits. Dans, *Development of Neural Circuitry*. Academic Press, p. 119-148.

Dasen, J. S., Liu, J.-P., et Jessell, Thomas M. (2003). Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of *Hox-c* activity. *Nature*, **425**, 926-933.

Dasen, J. S., Tice, B. C., Brenner-Morton, S., et Jessell, Thomas M (2005). A *Hox* regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell*, **123**, 477-491.

Dickson, B. J. (2002). Molecular Mechanisms of Axon Guidance. *Science*, **298**, 1959 -1964.

Dontchev, V. D. et Letourneau, P. C. (2003). Growth cones integrate signaling from multiple guidance cues. *J. Histochem. Cytochem.*, **51**, 435-444.

Dudanova, I., Gatto, G., et Klein, R. (2010). *GNDF* acts as a chemoattractant to support *ephrinA*-induced repulsion of limb motor axons. *Curr. Biol.*, **20**, 2150-2156.

Dykes, I. M., Tempest, L., Lee, S.-I., et Turner, E. E. (2011). Brn3a and islet1 act epistatically to regulate the gene expression program of sensory differentiation. *J. Neurosci*, **31**, 9789-9799.

Eberhart, J., Barr, J., O'Connell, S., Flagg, A., Swartz, M. E., Cramer, K. S., Tosney, Kathryn W., Pasquale, Elena B., et Krull, Catherine E. (2004). Ephrin-A5 Exerts Positive or Inhibitory Effects on Distinct Subsets of EphA4-Positive Motor Neurons. *The Journal of Neuroscience*, **24**, 1070 -1078.

Ensini, M., Tsuchida, T. N., Belting, H. G., et Jessell, T.M. (1998). The control of rostrocaudal pattern in the developing spinal cord: specification of motor neuron subtype identity is initiated by signals from paraxial mesoderm. *Development*, **125**, 969 -982.

Falk, J., Julien, F., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, Geneviève, Grumet, M., et al. (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron*, **48**, 63-75.

Feldner, J., Reimer, M. M., Schweitzer, J., Wendik, B., Meyer, D., Becker, T., et Becker, C. G. (2007). PlexinA3 restricts spinal exit points and branching of trunk motor nerves in embryonic zebrafish. *J. Neurosci*, **27**, 4978-4983.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., et Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.

Fournier, A. E., Nakamura, Fumio, Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, Robert G., et Strittmatter, Stephen M. (2000). Semaphorin3a Enhances Endocytosis at Sites of Receptor–F-Actin Colocalization during Growth Cone Collapse. *The Journal of Cell Biology*, **149**, 411 -422.

Fraser, A. G., Kamath, R. S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., et Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, **408**, 325-330.

Gherardi, E., Love, C. A., Esnouf, R. M., et Jones, E. Y. (2004). The sema domain. *Curr. Opin. Struct. Biol*, **14**, 669-678.

Giger, Roman J, Cloutier, J.-F., Sahay, A., Prinjha, R. K., Levengood, Dorothy V, Moore, S. E., Pickering, S., Simmons, D., Rastan, S., Walsh, F. S., et al. (2000). Neuropilin-2 Is Required In Vivo for Selective Axon Guidance Responses to Secreted Semaphorins. *Neuron*, **25**, 29-41.

Gu, C., Yoshida, Y., Livet, J., Reimert, D. V., Mann, F., Merte, J., Henderson, C. E., Jessell, Thomas M, Kolodkin, Alex L, et Ginty, David D (2005). Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science*, **307**, 265-268.

Guthrie, S. (2002). Neuronal development: sorting out motor neurons. *Curr. Biol*, **12**, R488-490.

Haklai-Topper, L., Mlechkovich, G., Savariego, D., Gokhman, I., et Yaron, Avraham (2010). Cis interaction between Semaphorin6A and Plexin-A4 modulates the repulsive response to Sema6A. *EMBO J*, **29**, 2635-2645.

He, Zhigang, Wang, K. C., Koprivica, V., Ming, Guoli, et Song, H.-J. (2002). Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system. *Sci. STKE*, **2002**, re1.

Helmbacher, F., Dessaud, E., Arber, Silvia, deLapeyrière, O., Henderson, C. E., Klein, R., et Maina, F. (2003). Met signaling is required for recruitment of motor neurons to PEA3-positive motor pools. *Neuron*, **39**, 767-777.

Helms, A. W. et Johnson, J. E. (2003). Specification of dorsal spinal cord

interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol*, **13**, 42-49.

Hollyday, M. et Jacobson, R. D. (1990). Location of motor pools innervating chick wing. *J. Comp. Neurol*, **302**, 575-588.

Huber, A. B., Kania, Artur, Tran, T. S., Gu, C., De Marco Garcia, N., Lieberam, I., Johnson, D., Jessell, Thomas M, Ginty, David D, et Kolodkin, Alex L (2005). Distinct roles for secreted semaphorin signaling in spinal motor axon guidance. *Neuron*, **48**, 949-964.

Huettl, R.-E., Soellner, H., Bianchi, E., Novitch, B. G., et Huber, A. B. (2011). Npn-1 contributes to axon-axon interactions that differentially control sensory and motor innervation of the limb. *PLoS Biol*, **9**, e1001020.

Imai, T., Yamazaki, T., Kobayakawa, R., Kobayakawa, K., Abe, T., Suzuki, M., et Sakano, H. (2009). Pre-target axon sorting establishes the neural map topography. *Science*, **325**, 585-590.

Inoue, K.-ichi, Ozaki, S., Shiga, T., Ito, K., Masuda, T., Okado, N., Iseda, T., Kawaguchi, S., Ogawa, M., Bae, S.-C., et al. (2002). Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat. Neurosci*, **5**, 946-954.

Jessell, T M (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat. Rev. Genet*, **1**, 20-29.

Ji, S.-J., Zhuang, B., Falco, C., Schneider, A., Schuster-Gossler, K., Gossler, A., et Sockanathan, S. (2006). Mesodermal and neuronal retinoids regulate the induction and maintenance of limb innervating spinal motor neurons. *Developmental Biology*, **297**, 249-261.

Kania, A, Johnson, R. L., et Jessell, T M (2000). Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell*, **102**, 161-173.

Kania, Artur et Jessell, Thomas M (2003). Topographic motor projections in the limb imposed by LIM homeodomain protein regulation of ephrin-A:EphA interactions. *Neuron*, **38**, 581-596.

Kantor, D. B., Chivatakarn, O., Peer, K. L., Oster, S. F., Inatani, M., Hansen, M. J., Flanagan, J. G., Yamaguchi, Y., Sretavan, D. W., Giger, Roman J, et al. (2004). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron*, **44**, 961-975.

Kawakami, A., Kitsukawa, T, Takagi, S., et Fujisawa, H (1996). Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J. Neurobiol.*, **29**, 1-17.

Keleman, K., Rajagopalan, S., Cleppien, D., Teis, D., Paiha, K., Huber, L. A., Technau, G. M., et Dickson, B. J. (2002). Comm Sorts Robo to Control Axon Guidance at the Drosophila Midline. *Cell*, **110**, 415-427.

Keynes, R J et Stern, C. D. (1984). Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature*, **310**, 786-789.

Kitsukawa, Takashi, Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, Masahiko, Bekku, Y., Yagi, Takeshi, et Fujisawa, Hajime (1997). Neuropilin-Semaphorin III/D-Mediated Chemorepulsive Signals Play a Crucial Role in Peripheral Nerve Projection in Mice. *Neuron*, **19**, 995-1005.

Klostermann, A, Lohrum, M, Adams, R H, et Püschel, A W (1998). The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J. Biol. Chem*, **273**, 7326-7331.

Koblar, S. A., Krull, C E, Pasquale, E B, McLennan, R., Peale, F. D., Cerretti, D. P., et Bothwell, M. (2000). Spinal motor axons and neural crest cells use different molecular guides for segmental migration through the rostral half-somite. *J.*

Neurobiol, **42**, 437-447.

Kolk, S. M., Gunput, R.-A. F., Tran, T. S., van den Heuvel, D. M. A., Prasad, A. A., Hellemons, A. J. C. G. M., Adolfs, Y., Ginty, David D, Kolodkin, Alex L, Burbach, J. P. H., et al. (2009). Semaphorin 3F is a bifunctional guidance cue for dopaminergic axons and controls their fasciculation, channeling, rostral growth, and intracortical targeting. *J. Neurosci.*, **29**, 12542-12557.

Kolodkin, A L, Levengood, D V, Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R J, et Ginty, D D (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*, **90**, 753-762.

Koppel, A. M., Feiner, Leonard, Kobayashi, H., et Raper, Jonathan A (1997). A 70 Amino Acid Region within the Semaphorin Domain Activates Specific Cellular Response of Semaphorin Family Members. *Neuron*, **19**, 531-537.

Kozlov, G., Perreault, A., Schrag, J. D., Park, M., Cygler, M., Gehring, K., et Ekiel, I. (2004). Insights into function of PSI domains from structure of the Met receptor PSI domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **321**, 234-240.

Kramer, E. R., Knott, L., Su, F., Dessaud, E., Krull, Catherine E, Helmbacher, F., et Klein, R. (2006). Cooperation between GDNF/Ret and ephrinA/EphA4 signals for motor-axon pathway selection in the limb. *Neuron*, **50**, 35-47.

Landmesser, L (1978). The distribution of motoneurons supplying chick hind limb muscles. *J. Physiol. (Lond.)*, **284**, 371-389.

Landmesser, L et Honig, M. G. (1986). Altered sensory projections in the chick hind limb following the early removal of motoneurons. *Dev. Biol*, **118**, 511-531.

Lee, S. K. et Pfaff, S L (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat. Neurosci*, **4 Suppl**, 1183-1191.

Lee, S., Lee, B., Joshi, K., Pfaff, Samuel L, Lee, J. W., et Lee, S.-K. (2008). A regulatory network to segregate the identity of neuronal subtypes. *Dev. Cell*, **14**, 877-889.

Lentz, S. I., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., et Snider, W. D. (1999). Neurotrophins support the development of diverse sensory axon morphologies. *J. Neurosci*, **19**, 1038-1048.

Liang, X., Song, M.-R., Xu, Z., Lanuza, G. M., Liu, Y., Zhuang, T., Chen, Y., Pfaff, Samuel L., Evans, S. M., et Sun, Y. (2011). Isl1 Is required for multiple aspects of motor neuron development. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **47**, 215-222.

Lin, J. H., Saito, T., Anderson, D. J., Lance-Jones, C., Jessell, T M, et Arber, S (1998). Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression. *Cell*, **95**, 393-407.

Livet, J., Sigrist, M., Stroebel, S., De Paola, V., Price, S. R., Henderson, C. E., Jessell, Thomas M., et Arber, Silvia (2002). ETS Gene Pea3 Controls the Central Position and Terminal Arborization of Specific Motor Neuron Pools. *Neuron*, **35**, 877-892.

Luo, Y., Raible, D., et Raper, Jonathan A. (1993). Collapsin: A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*, **75**, 217-227.

Luria, V. et Laufer, E. (2007). Lateral motor column axons execute a ternary trajectory choice between limb and body tissues. *Neural Dev*, **2**, 13.

Luria, V., Krawchuk, D., Jessell, Thomas M, Laufer, E., et Kania, Artur (2008). Specification of motor axon trajectory by ephrin-B:EphB signaling: symmetrical control of axonal patterning in the developing limb. *Neuron*, **60**, 1039-1053.

De Marco Garcia, N. V. et Jessell, Thomas M. (2008). Early Motor Neuron Pool Identity and Muscle Nerve Trajectory Defined by Postmitotic Restrictions in Nkx6.1 Activity. *Neuron*, **57**, 217-231.

Mauti, O., Domanitskaya, E., Andermatt, I., Sadhu, R., et Stoeckli, E. T. (2007). Semaphorin6A acts as a gate keeper between the central and the peripheral nervous system. *Neural Dev*, **2**, 28.

Mauti, O., Sadhu, R., Gemayel, J., Gesemann, M., et Stoeckli, E. T. Expression patterns of plexins and neuropilins are consistent with cooperative and separate functions during neural development. *BMC Dev Biol*, **6**, 32-32.

Moret, F., Renaudot, C., Bozon, M., et Castellani, Valérie (2007). Semaphorin and neuropilin co-expression in motoneurons sets axon sensitivity to environmental semaphorin sources during motor axon pathfinding. *Development*, **134**, 4491-4501.

Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T, Kalb, R G, et Strittmatter, S M (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron*, **21**, 1093-1100.

Nawabi, H., Briançon-Marjollet, A., Clark, C., Sanyas, I., Takamatsu, H., Okuno, T., Kumanogoh, A., Bozon, M., Takeshima, K., Yoshida, Y., et al. (2010). A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes & Development*, **24**, 396 -410.

Niquille, M., Garel, S., Mann, F., Hornung, J.-P., Otsmane, B., Chevalley, S., Parras, C., Guillemot, F., Gaspar, P., Yanagawa, Y., et al. (2009). Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C. *PLoS Biol*, **7**, e1000230.

Oakley, R. A. et Tosney, K W (1993). Contact-mediated mechanisms of motor axon segmentation. *J. Neurosci*, **13**, 3773-3792.

Oakley, R. A., Lefcort, F. B., Clary, D. O., Reichardt, L. F., Prevet, D., Oppenheim, R. W., et Frank, E (1997). Neurotrophin-3 promotes the differentiation of muscle spindle afferents in the absence of peripheral targets. *J. Neurosci*, **17**, 4262-4274.

Paddison, P. J. (2008). RNA interference in mammalian cell systems. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **320**, 1-19.

Palaisa, K. A. et Granato, M. (2007). Analysis of zebrafish sidetracked mutants reveals a novel role for Plexin A3 in intraspinal motor axon guidance. *Development*, **134**, 3251-3257.

Pecho-Vrieseling, E., Sigrist, M., Yoshida, Y., Jessell, Thomas M., et Arber, Silvia (2009). Specificity of Sensory-Motor Connections Encoded by Sema3e-PlexinD1 Recognition. *Nature*, **459**, 842-846.

Piper, M., Salih, S., Weinl, C., Holt, Christine E, et Harris, W. A. (2005). Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. *Nat. Neurosci*, **8**, 179-186.

Price, S. R., De Marco Garcia, N. V., Ranscht, B., et Jessell, Thomas M (2002). Regulation of Motor Neuron Pool Sorting by Differential Expression of Type II Cadherins. *Cell*, **109**, 205-216.

Püschel, A W, Adams, R H, et Betz, H (1995). Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron*, **14**, 941-948.

Püschel, A W, Adams, R H, et Betz, H (1996). The sensory innervation of the mouse spinal cord may be patterned by differential expression of and differential responsiveness to semaphorins. *Mol. Cell. Neurosci.*, **7**, 419-431.

Roffers-Agarwal, J. et Gammill, L. S. (2009). Neuropilin receptors guide distinct phases of sensory and motor neuronal segmentation. *Development*, **136**, 1879-1888.

Rolny, C., Capparuccia, L., Casazza, A., Mazzone, M., Vallario, A., Cignetti, A., Medico, E., Carmeliet, P., Comoglio, Paolo M, et Tamagnone, Luca (2008).

The tumor suppressor semaphorin 3B triggers a prometastatic program mediated by interleukin 8 and the tumor microenvironment. *J. Exp. Med.*, **205**, 1155-1171.

Rousso, D. L., Gaber, Z. B., Wellik, D., Morrisey, E. E., et Novitch, B. G. (2008). Coordinated Actions of the Forkhead Protein Foxp1 and Hox Proteins in the Columnar Organization of Spinal Motor Neurons. *Neuron*, **59**, 226-240.

Schneider, V. A. et Granato, M. (2003). Motor axon migration: a long way to go. *Dev. Biol.*, **263**, 1-11.

Sendtner, M., Pei, G., Beck, M., Schweizer, U., et Wiese, S. (2000). Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res*, **301**, 71-84.

Sharma, K., Leonard, A. E., Lettieri, K., et Pfaff, Samuel L. (2000). Genetic and epigenetic mechanisms contribute to motor neuron pathfinding. *Nature*, **406**, 515-519.

Sharma, K., Sheng, H. Z., Lettieri, K., Li, H., Karavanov, A., Potter, S., Westphal, H., et Pfaff, Samuel L (1998). LIM Homeodomain Factors Lhx3 and Lhx4 Assign Subtype Identities for Motor Neurons. *Cell*, **95**, 817-828.

Shewan, D., Dwivedy, A., Anderson, R., et Holt, C E (2002). Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway. *Nat. Neurosci*, **5**, 955-962.

Shirasaki, R. et Pfaff, Samuel L (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu. Rev. Neurosci*, **25**, 251-281.

Shirasaki, R., Lewcock, J. W., Lettieri, K., et Pfaff, Samuel L. (2006). FGF as a Target-Derived Chemoattractant for Developing Motor Axons Genetically Programmed by the LIM Code. *Neuron*, **50**, 841-853.

Sockanathan, S. et Jessell, Thomas M. (1998). Motor Neuron-Derived Retinoid Signaling Specifies the Subtype Identity of Spinal Motor Neurons. *Cell*, **94**, 503-514.

Sockanathan, S., Perlmann, T., et Jessell, Thomas M. (2003). Retinoid Receptor Signaling in Postmitotic Motor Neurons Regulates Rostrocaudal Positional Identity and Axonal Projection Pattern. *Neuron*, **40**, 97-111.

Song, H., Ming, G, He, Z, Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M, et Poo, M. (1998). Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science*, **281**, 1515-1518.

Squire, L. R., Berg, D., Bloom, F. E., Lac, S. du, Ghosh, A., et Spitzer, N. C. (2008). *Fundamental Neuroscience 3^e éd.* Academic Press Inc.

Stein, E et Tessier-Lavigne, M (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science*, **291**, 1928-1938.

Stepien, A. E., Tripodi, M., et Arber, Silvia (2010). Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells. *Neuron*, **68**, 456-472.

Takahashi, Takuya, Nakamura, Fumio, Jin, Z., Kalb, Robert G., et Strittmatter, Stephen M. (1998). Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci*, **1**, 487-493.

Tamagnone, L, Artigiani, S., Chen, H, He, Z, Ming, G. I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M L, Goodman, C S, Poo, M., et al. (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell*, **99**, 71-80.

Tang, J., Rutishauser, U., et Landmesser, L (1994). Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron*, **13**, 405-414.

Taniguchi, M, Yuasa, S., Fujisawa, H, Naruse, I., Saga, S., Mishina, M., et Yagi, T (1997). Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron*, **19**, 519-530.

Thaler, J. P., Koo, S. J., Kania, Artur, Lettieri, K., Andrews, S., Cox, C., Jessell, Thomas M, et Pfaff, Samuel L (2004). A postmitotic role for Isl-class LIM homeodomain proteins in the assignment of visceral spinal motor neuron identity. *Neuron*, **41**, 337-350.

Tiret, L., Le Mouellic, H., Maury, M., et Brûlet, P. (1998). Increased apoptosis of motoneurons and altered somatotopic maps in the brachial spinal cord of Hoxc-8-deficient mice. *Development*, **125**, 279-291.

Tiveron, M. C., Hirsch, M. R., et Brunet, J. F. (1996). The expression pattern of the transcription factor Phox2 delineates synaptic pathways of the autonomic nervous system. *J. Neurosci*, **16**, 7649-7660.

Tojima, T., Akiyama, H., Itofusa, R., Li, Y., Katayama, H., Miyawaki, A., et Kamiguchi, H. (2007). Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat. Neurosci.*, **10**, 58-66.

Tojima, T., Itofusa, R., et Kamiguchi, H. (2010). Asymmetric clathrin-mediated endocytosis drives repulsive growth cone guidance. *Neuron*, **66**, 370-377.

Tosney, K. et Landmesser, LT (1985). Growth cone morphology and trajectory in the lumbosacral region of the chick embryo. *The Journal of Neuroscience*, **5**, 2345-2358.

Tosney, K W (1987). Proximal tissues and patterned neurite outgrowth at the lumbosacral level of the chick embryo: deletion of the dermamyotome. *Dev. Biol*, **122**, 540-558.

Tosney, K W et Landmesser, L. T. (1985). Specificity of early motoneuron growth cone outgrowth in the chick embryo. *J. Neurosci*, **5**, 2336-2344.

Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S. B., Baldassare, M., Edlund, T., Jessell, T. M., et Pfaff, S. L. (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell*, **79**, 957-970.

Tuttle, R. et O'Leary, D. D. (1998). Neurotrophins rapidly modulate growth cone response to the axon guidance molecule, collapsin-1. *Mol. Cell. Neurosci.*, **11**, 1-8.

Varshavsky, A., Kessler, O., Abramovitch, S., Kigel, B., Zaffryar, S., Akiri, G., et Neufeld, G. (2008). Semaphorin-3B is an angiogenesis inhibitor that is inactivated by furin-like pro-protein convertases. *Cancer Res*, **68**, 6922-6931.

Vermeren, M. M., Cook, G. M. W., Johnson, A. R., Keynes, Roger J., et Tannahill, D. (2000). Spinal Nerve Segmentation in the Chick Embryo: Analysis of Distinct Axon-Repulsive Systems. *Developmental Biology*, **225**, 241-252.

Vikis, H. G., Li, W., He, Z, et Guan, K. L. (2000). The semaphorin receptor plexin-B1 specifically interacts with active Rac in a ligand-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 12457-12462.

Vinay, L., Brocard, F., Pflieger, J. F., Simeoni-Alias, J., et Clarac, F. (2000). Perinatal development of lumbar motoneurons and their inputs in the rat. *Brain Res. Bull*, **53**, 635-647.

Wang, H. U. et Anderson, D. J. (1997). Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron*, **18**, 383-396.

Wen, Z. et Zheng, J. Q. (2006). Directional guidance of nerve growth cones. *Current Opinion in Neurobiology*, **16**, 52-58.

Winberg, Margaret L., Mitchell, K. J., et Goodman, Corey S. (1998). Genetic Analysis of the Mechanisms Controlling Target Selection: Complementary and

Combinatorial Functions of Netrins, Semaphorins, and IgCAMs. *Cell*, **93**, 581-591.

Winberg, Margaret L., Tamagnone, Luca, Bai, J., Comoglio, Paolo M., Montell, D., et Goodman, Corey S. (2001). The Transmembrane Protein Off-Track Associates with Plexins and Functions Downstream of Semaphorin Signaling during Axon Guidance. *Neuron*, **32**, 53-62.

de Wit, J., Toonen, R. F., et Verhage, M. (2009). Matrix-Dependent Local Retention of Secretory Vesicle Cargo in Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*, **29**, 23 -37.

Wu, Y., Wang, G., Scott, S. A., et Capecchi, M. R. (2008). Hoxc10 and Hoxd10 regulate mouse columnar, divisional and motor pool identity of lumbar motoneurons. *Development*, **135**, 171-182.

Yamauchi, K., Mizushima, S., Tamada, A., Yamamoto, N., Takashima, S., et Murakami, F. (2009). FGF8 signaling regulates growth of midbrain dopaminergic axons by inducing semaphorin 3F. *J. Neurosci.*, **29**, 4044-4055.

Yazdani, U. et Terman, J. R. (2006). The semaphorins. *Genome Biol*, **7**, 211.

Yu, T. W. et Bargmann, C. I. (2001). Dynamic regulation of axon guidance. *Nat. Neurosci*, **4 Suppl**, 1169-1176.