



HAL
open science

FONCTIONS DES MOLECULES SLITS ET ROBOS DANS LE DEVELOPPEMENT DES SYSTEMES COMMISSURAUX DU CERVEAU DES VERTEBRES

Thomas Di Meglio

► **To cite this version:**

Thomas Di Meglio. FONCTIONS DES MOLECULES SLITS ET ROBOS DANS LE DEVELOPPEMENT DES SYSTEMES COMMISSURAUX DU CERVEAU DES VERTEBRES. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : 2007PA066420 . tel-00811443

HAL Id: tel-00811443

<https://theses.hal.science/tel-00811443>

Submitted on 10 Apr 2013

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.



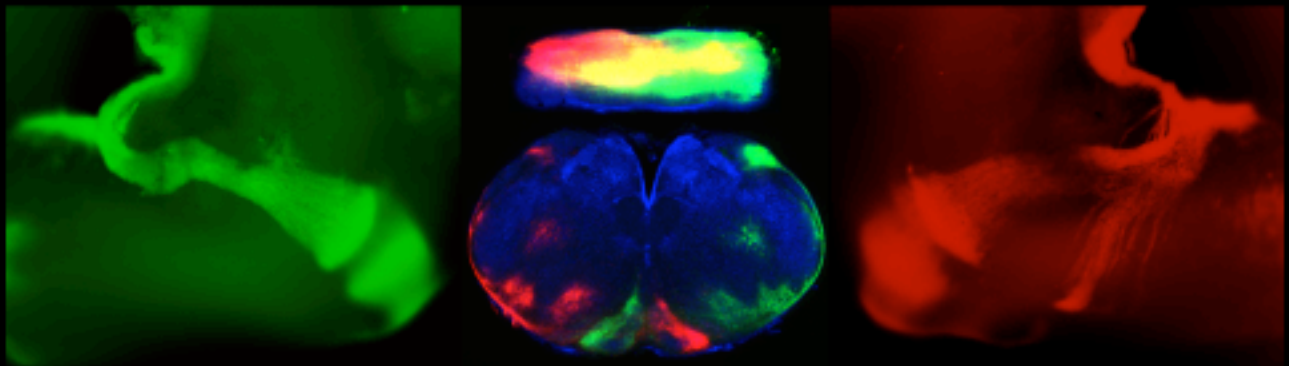
THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité:
Développement

Présentée par Thomas Di Meglio
Pour obtenir le grade de docteur de l'université Paris VI

Sujet de la thèse :

*FONCTIONS DES MOLECULES SLITS ET ROBOS DANS LE
DEVELOPPEMENT DES SYSTEMES COMMISSURAUX DU
CERVEAU DES VERTEBRES*



Soutenu le 16 Novembre 2007, devant le jury composé de :

Pr Umbhauer Muriel

Président

Dr Métin Christine

Rapporteur

Dr Bourrat Franck

Rapporteur

Dr Rougon Geneviève

Examineur

Dr Chédotel Alois

Directeur de thèse

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le Pr Muriel Umbhauer d'avoir accepté de présider mon jury. Je suis également très reconnaissant envers le Dr Christine Métin et le Dr Franck Bourrat d'accepter la lourde tâche d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi qu'au Dr Geneviève Rougon pour avoir accepté de l'évaluer.

Je remercie les Prs Jean Mariani et Danièle Tritsch pour leur accueil dans le laboratoire CNRS UMR7102.

Je remercie chaleureusement le Dr Alain Chédotal de m'avoir accueilli dans son équipe, donné ce projet complexe et accordé une grande autonomie pour le mener à bien. Merci pour la pleine confiance qu'il m'a témoignée et de m'avoir accepté comme je suis (avec mon petit bordel et mes innombrables défauts...). J'espère qu'il aura su me transmettre sa passion, son exigence pour le travail bien fait ainsi que son esprit scientifique inestimable et hautement critique. Je voudrais aussi le remercier pour le temps et la patience qu'il m'a accordés tout au long de ces années et d'avoir cru en mes capacités.

Mon immense gratitude s'adresse à Mr Constantino Sotelo pour son soutien et l'intérêt qu'il a porté à mes recherches. Je lui suis extrêmement reconnaissant de m'avoir fait bénéficier de sa grande expérience au cours de toutes ces discussions enrichissantes et des conseils stimulants que j'ai eu l'honneur de recevoir de sa part.

Je tiens également à remercier le Dr Marion Wassef d'avoir accepté d'être membre de mon comité de thèse et de m'avoir conseillé.

Merci tout particulièrement à la « Chédotal's family », en l'honneur de ces dames, Caroline, Kim, Vidji, Julie, Coralie, Céline, Géraldine, Nathalie, Isabelle, et de ces hommes, Yvrick, Fred, Baskar, Nicolas, Vieri, sans oublié Eidji (mon petit poulet), qui m'ont supporté (dans les deux sens du terme) durant tout ce temps. Merci pour votre patience, votre tolérance, votre soutien quotidien et votre humour. Recevez ici le témoignage de toute ma gratitude et de mon affection.

Merci notamment aux membres de la « Slit team » qui ont participé activement aux travaux de cette thèse.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à Rosine, Isabelle, Marie-Pierre et les membres de leur équipe. Merci pour vos gentilles attentions et votre patience à mon égard.

Mes sincères remerciements s'adressent aussi aux équipes dirigées par les Drs Jocelyne Caboche et Bernard Brugg. Merci pour votre enthousiasme, votre sympathie et vos encouragements qui m'ont été d'un grand réconfort durant ces années.

Merci à tout le personnel de l'animalerie et en particulier à Christelle, sans qui rien n'eut été possible.

Je remercie les membres de l'UMR 7102 pour ces quatre années passées ensemble.

Merci à tous ceux et surtout celles qui ont lu et relu et re-relu cette thèse...

Je souhaite remercier également l'ensemble de nos collaborateurs

Merci à tous ceux qui m'accompagnent depuis le collège, ma seconde famille, Juliette, Camille, Alexia, Justine, Marie Aimée, Manu, Romain, Sami, Kévin, Hadrien, José, Hyacinthe et tous les autres.

Je remercie du fond du coeur mes parents et ma sœur pour leur encouragement et leur soutien. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir toujours porté un intérêt à mon travail.

A la mémoire de mon frère Fabrice

PRINCIPALES ABREVIATIONS

| | |
|--|--|
| Abl : Abelson | KDa : Kilo Dalton |
| ALPS : Agrine-Laminine-Perlecan-Slit | LG : Laminine-G like |
| AR : Acide Rétinoïque | LHRH : Luteinizing Hormone Releasing Hormon |
| ARNm : Acide RiboNucléique messenger | LNS : Laminine-Neurexine-Slit |
| BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor | LPA : Lysophosphatidic Acid |
| bHLH : basic Helix Loop Helix | LR : Lèvres Rhombiques |
| BMP : Bone Morphogenetic Protein | LRR : Leucine Rich Repeats |
| BOC : Biregional Cdon-binding protein | MAO : Olive Accessoire Médiane |
| CAM : Cell Adhesion Molecule | Math1 : Mouse Atonal Homolog 1 |
| CC : Conserved Cytoplasmic domain | MIA : Migration Inducing Activity |
| Comm : Commissureless | MM : Micro-Molaire |
| DAO : Olive Accessoire Dorsale | NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule |
| DCC : Deleted in Colorectal Canc | NCE : Noyau Cuneatus Externe |
| Dil : 1,1'-dioctodecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanin | NgCAM : Neuron-glia Cell Adhesion Molecule |
| DRG : Dorsal Root Ganglion ou ganglion rachidien | NGF : Nerve Growth Factor |
| E : jour de développement embryonnaire | NP : Noyaux propres du Pont |
| EGF : Epithérial Growth Factor | NPC : Neurones Pré-Cérébelleux |
| EGL : Eminence Ganglionnaire Latérale | Npn : Neuropilines |
| EGM : Eminence Ganglionnaire Médiane | NrCAM : NgCAM related Cell Adhesion Molecule |
| Ena : Enabled | NRL : Noyau Réticulaire Latéral |
| Ext1 : Exostose1 | NT : Neurotrophine |
| FGF : Fibroblast Growth Factor | OI : Olive Inférieure |
| FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor | OP : Olive Principale |
| FN3 : Domaines fibronectines de type III | RALDH : Rétinaldehyde Déhydrogénase |
| GAP : GTPase Activating Protéine | Rb : Retinoblastoma susceptibility gene |
| GAP43 : Growth-Associated Protein 43 | RGC : Cellules Ganglionnaires Rétiniennes |
| GDF : Growth Differentiation Factor | Rig1 : Retinoid Inductible Gene 1 |
| GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein | Robo : Roudabout |
| GFP : Green Fluorescent Protein | SDF1 : Stromal-Derived Factor 1 |
| GS : Glial Sling | Shh : Sonic HedgeHog |
| GW : Glial Wedge | srGAP1 : slit-robo GAP |
| HGF/SF : Hépathocyte Growth Factor/Scatter Factor | SPR : Surface Plasmon Resonance |
| HGPPS : Horizontal Gaze Palsy with Progressive Scoliosis | SVZ : Zone Sous Ventriculaire |
| Ig : Immunoglobuline | Tag1 : Transient Axonal Glycoprotein 1 |
| IGG : Indusium Griseum | TOL : Tractus Olfactif Latéral |
| | Unc : Uncoordinated |
| | VMR : Voie de Migration Rostrale |

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 8 |
| 1 La décussation des voies nerveuses | 9 |
| 1.1 Le cerveau, deux moitiés symétriques interconnectées | 9 |
| 1.2 Description des commissures..... | 10 |
| 1.3 Les commissures, une fonction méconnue..... | 11 |
| 1.3.1 Hypothèse de l'adaptation du système nerveux à des contraintes sensorielles..... | 11 |
| 1.3.2 Démonstration expérimentale de l'importance des systèmes commissuraux chez l'homme..... | 11 |
| 1.3.2.1 Conséquences de l'absence de corps calleux..... | 12 |
| 1.3.2.2 Étude du Syndrome HGPPS..... | 13 |
| 1.4 Recherches des facteurs impliqués dans la mise en place des commissures..... | 14 |
| 2 Découverte des processus de guidage mis en jeu dans le contrôle de la décussation neuronale. | 16 |
| 2.1 Par quels mouvements les neurones peuvent-ils franchir la ligne médiane ?..... | 16 |
| 2.1.1 Problématique..... | 16 |
| 2.1.2 Migration neuronale..... | 17 |
| 2.1.3 Le processus de croissance axonale | 18 |
| 2.1.3.1 Fonction du cône de croissance axonal | 18 |
| 2.1.3.2 Structure et dynamique du cône de croissance | 19 |
| 2.2 Théorie chimiotropique, découverte de l'importance des molécules de guidage axonal | 20 |
| 2.2.1 Guidage par contact sous l'action de signaux locaux | 21 |
| 2.2.1.1 Caractérisation <i>in vitro</i> | 21 |
| 2.2.1.2 Balisage des voies de projection <i>in vivo</i> | 22 |
| 2.2.2 Guidage par des signaux diffusibles : le chimiotropisme | 22 |
| 2.2.2.1 Caractérisation <i>in vitro</i> | 22 |
| 2.2.2.2 Fonction de guidage de cibles intermédiaires <i>in vivo</i> | 23 |
| 2.2.2.3 La plaque du plancher, un exemple de cible intermédiaire..... | 24 |
| 2.3 Découverte des différentes familles de molécules de guidage | 25 |
| 2.4 Présentation de la Nétrine et de ces récepteurs..... | 28 |
| 2.4.1 Découverte de la Nétrine | 28 |
| 2.4.2 Les récepteurs à la Nétrine..... | 28 |
| 3 Fonctions du système de guidage Slit/Robo | 30 |
| 3.1 Découverte de Slit et Robo pour leur implication dans le contrôle du croisement de la ligne médiane chez la drosophile..... | 30 |
| 3.1.1 Slit, facteur de guidage répulsif exprimé par les cellules de la ligne médiane | 30 |
| 3.1.1.1 Identification et clonage de <i>slit</i> chez la drosophile | 30 |
| 3.1.1.2 Les gènes <i>slits</i> au cours de l'évolution | 31 |
| 3.1.1.3 Les protéines Slits..... | 32 |
| ➤ Structure protéique et partenaires d'interactions..... | 32 |
| ➤ Importance fonctionnelle du clivage des protéines Slits..... | 32 |
| 3.1.2 Les récepteurs membranaires Roundabouts (Robos)..... | 33 |
| 3.1.2.1 Identification et clonage de <i>robo</i> chez la drosophile..... | 33 |
| 3.1.2.2 Les gènes <i>robos</i> au cours de l'évolution | 34 |
| 3.1.2.3 Description des récepteurs Robos | 35 |
| ➤ Structure protéique et partenaires moléculaires | 35 |
| ➤ Autres caractéristiques fonctionnelles | 36 |
| 3.1.3 Mise en évidence des interactions entre Slits et Robos | 37 |
| 3.1.3.1 Découverte de Commissureless, un inhibiteur de l'activité des récepteurs Robos..... | 37 |
| 3.1.3.2 Preuves génétiques directes..... | 37 |
| 3.1.3.3 Confirmation biochimique de l'association entre Slits et Robos | 38 |
| 3.2 Guidage axonal chez la drosophile, un premier modèle d'action du système Slit/Robo..... | 39 |
| 3.2.1 Contrôle du croisement de la ligne médiane..... | 40 |
| 3.2.1.1 Fonction attractive de la Nétrine..... | 40 |
| 3.2.1.2 La dynamique d'expression des récepteurs Robos détermine le choix de croiser ou non la ligne médiane | 40 |
| 3.2.1.3 Intervention de Commissureless dans la régulation spatiale de l'expression des récepteurs Robos | 41 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| ➤ | Caractérisation de la fonction de Commissureless | 41 |
| ➤ | Commissureless empêche l'adressage des récepteurs Robos au cône de croissance..... | 42 |
| 3.2.2 | Positionnement latéral des faisceaux d'axones longitudinaux | 44 |
| 3.2.3 | En conclusion..... | 45 |
| 3.3 | Fonction de Slit et Robo dans la formation des systèmes commissuraux du cerveau des vertébrés..... | 45 |
| 3.3.1 | Guidage des projections axonales du télencéphale..... | 46 |
| 3.3.1.1 | Guidage des projections ipsilatérales : action répulsive des Slits présents à la ligne médiane | 47 |
| ➤ | Développement du tractus olfactif latéral | 47 |
| ➤ | Guidage des afférences et efférences corticales..... | 48 |
| 3.3.1.2 | Guidage des voies de projections commissurales : les Slits canalisent les axones à travers la ligne médiane | 49 |
| ➤ | Formation du corps calleux | 49 |
| ➤ | Formation du chiasma optique..... | 50 |
| 3.3.1.3 | Conclusion | 52 |
| 3.3.2 | Guidage des axones commissuraux de la moelle épinière | 53 |
| 3.3.2.1 | Guidage des axones pré-commissuraux | 53 |
| ➤ | Répulsion par le territoire dorsal sous l'action des BMPs | 53 |
| ➤ | La Nétrine1 et Sonic hedgehog attirent les axones commissuraux ventralement..... | 53 |
| ➤ | Inhibition de l'effet répulsif des Slits sous l'action de Robo3 | 54 |
| 3.3.2.2 | Processus de guidage par contact favorisant le franchissement de la ligne médiane..... | 55 |
| 3.3.2.3 | Guidage des axones post-commissuraux..... | 55 |
| ➤ | Inhibition de l'action attractive de la Nétrine1 sous l'effet des Slits..... | 55 |
| ➤ | Acquisition d'une sensibilité à l'action répulsive des Slits et des Sémaphorines..... | 56 |
| 3.3.2.4 | Positionnement latéral des axones post-commissuraux..... | 56 |
| 3.3.2.5 | Conclusion | 57 |
| 3.3.3 | Rôle du système Slit/Robo dans le guidage de la migration tangentielle..... | 58 |
| 3.3.3.1 | Migration des interneurons du bulbe olfactif | 58 |
| 3.3.3.2 | Migration des interneurons corticaux..... | 59 |
| 4 | Développement des neurones précérébelleux..... | 61 |
| 4.1 | Les neurones précérébelleux, origines des afférences cérébelleuses | 61 |
| 4.1.1 | L'olive inférieure, source des fibres grimpantes | 61 |
| 4.1.2 | Les noyaux précérébelleux à fibres moussues du tronc cérébral..... | 63 |
| 4.2 | Origine des neurones précérébelleux | 63 |
| 4.2.1 | Les lèvres rhombiques, territoire dorsal du rhombencéphale..... | 63 |
| 4.2.2 | Précisions sur la localisation des précurseurs des neurones précérébelleux au sein des lèvres rhombiques..... | 64 |
| 4.2.2.1 | Régionalisation antéro-postérieure des lèvres rhombiques..... | 64 |
| 4.2.2.2 | Les neurones précérébelleux naissent séquentiellement dans les lèvres rhombiques inférieures..... | 65 |
| 4.2.2.3 | Dérivés des lèvres rhombiques supérieures..... | 66 |
| 4.2.2.4 | Fonction des gènes homéotiques (<i>hox</i>) dans la régionalisation des lèvres rhombiques inférieures | 66 |
| 4.2.3 | Régionalisation dorso-ventrale des lèvres rhombiques inférieures..... | 66 |
| 4.2.3.1 | Cartographie moléculaire des groupes de précurseurs présents dans les lèvres rhombiques cérébelleuses | 66 |
| 4.2.3.2 | Facteurs contrôlant l'établissement de cette régionalisation dorso-ventrale..... | 68 |
| ➤ | Fonction inductrice des BMPs | 68 |
| ➤ | Fonction inductrice de l'acide rétinoïque | 68 |
| 4.3 | Migration des neurones précérébelleux | 69 |
| 4.3.1 | Aspects descriptifs | 69 |
| 4.3.1.1 | Migration sous-marginale des neurones de l'olive inférieure..... | 69 |
| 4.3.1.2 | Migration marginale des neurones précérébelleux à fibres moussues..... | 70 |
| ➤ | Voie de migration marginale postérieure | 70 |
| ➤ | Voie de migration marginale antérieure..... | 70 |
| 4.3.2 | Facteurs de transcription impliqués dans la migration des neurones précérébelleux..... | 71 |
| 4.3.2.1 | Pax6, un facteur nécessaire à la migration..... | 71 |
| 4.3.2.2 | Barhl1, un facteur de survie..... | 72 |
| 4.3.2.3 | Brn3a et Brn3b, une compensation fonctionnelle apparente | 72 |
| 4.3.3 | Guidage de la migration des neurones précérébelleux..... | 72 |

| | | |
|------------------------------|--|------------|
| 4.3.3.1 | Fonctions des molécules d'adhérence de la famille des IgCAM | 73 |
| 4.3.3.2 | Fonctions de facteurs chimiotropiques..... | 73 |
| ➤ | Fonction attractive de la Nétrine1 sécrétée par la plaque du plancher..... | 74 |
| ➤ | Mise en jeu de l'action répulsive des Slits à la ligne médiane ?..... | 75 |
| 5 | Présentation des travaux..... | 77 |
| RESULTATS | | 79 |
| Article 1 | Robo1 et Robo2 coopèrent au guidage des axones du tractus olfactif latéral..... | 80 |
| Article 2 | Robo1 et Robo2 coopèrent au guidage des voies de projections axonales du télencéphale..... | 81 |
| Article 3 | La signalisation Slit/Robo dirige la migration des neurones du pont sous le contrôle des gènes <i>Hox</i>..... | 83 |
| Article 4 | Mécanismes moléculaires contrôlant le croisement de la ligne médiane par les neurones précérébelleux en migration | 85 |
| DISCUSSION/CONCLUSION | | 87 |
| 1 | Contribution du système Slit/Robo à la mise en place des projections commissurales du télencéphale..... | 88 |
| 1.1 | La répartition des Slits détermine la capacité des axones exprimant Robo1 et Robo2 à franchir la ligne médiane..... | 88 |
| 1.2 | Coopération entre processus de guidage à courte et longue distance..... | 89 |
| 2 | L'activité des récepteurs Robos détermine la capacité des neurones précérébelleux à croiser la plaque du plancher | 91 |
| 2.1 | Choix de migration longitudinale, le système Slit/Robo indique où croiser la ligne médiane | 92 |
| 2.2 | L'action coordonnée des récepteurs Robo3 et DCC permet d'être attiré vers la plaque du plancher ... | 93 |
| 2.3 | Arrêt des corps cellulaires à la ligne médiane : les récepteurs Robos font la différence..... | 95 |
| 2.4 | Positionnement latéral post-migratoire | 96 |
| 3 | Précisions sur les interactions fonctionnelles entre Slits et Robos in vivo | 97 |
| 3.1 | Coopération de Robo1 et Robo2 en réponse aux Slits in vivo | 98 |
| 3.2 | Nouvelles preuves de la complexité d'action de Robo3 | 100 |
| 4 | Partenaires à l'action du système Slit/Robo in vivo | 102 |
| 4.1 | Inhibition de l'attraction Nétrine1/DCC | 102 |
| 4.2 | Compensation fonctionnelle par d'autres systèmes de guidage..... | 103 |
| 4.3 | Interactions avec la chimiokine SDF1 | 105 |
| 4.4 | Interactions fonctionnelles avec les héparanes sulfates | 105 |
| 4.5 | Voies de signalisation impliquées dans la réponse aux Slits..... | 107 |
| 4.5.1 | Contrôle de l'activité des RhoGTPases | 107 |
| 4.5.2 | Interaction avec la kinase Abelson et son substrat Enabled..... | 109 |
| 4.5.3 | Interaction avec la Laminine et les Cadhérines..... | 109 |
| 5 | Conclusion | 110 |
| ANNEXES | | 113 |
| Article 5 | Le système Slit/Robo guide les axones du nerf olfactif | |
| Revue | Le code de la route des axones se complique | |
| BIBLIOGRAPHIE | | 114 |

INTRODUCTION

1 La décussation des voies nerveuses

1.1 Le cerveau, deux moitiés symétriques interconnectées

Un aspect fondamental de l'architecture de notre système nerveux est son organisation en deux parties symétriques, réparties le long d'un axe appelé ligne médiane (axe de symétrie orienté selon l'axe antéro-postérieur). Il suit un plan d'organisation caractéristique des animaux à symétrie bilatérale. Ces deux moitiés sont interconnectées et fonctionnent de façon cohérente. La décussation des fibres nerveuses, c'est-à-dire leur passage à travers la ligne médiane, est connue depuis l'Antiquité. Hippocrate (460-380 avant JC) fut le premier à faire allusion à la nature croisée des projections nerveuses motrices (se reporter à Finger, 1994). Il nota qu'un traumatisme de la partie droite de la tête entraîne des convulsions du côté gauche du corps. Arataus le Cappadocien, 500 ans plus tard, poursuivit ces observations et nota que bien qu'une certaine paralysie était controlatérale à une lésion de la tête, celle-ci était ipsilatérale dans le cas d'une lésion cervicale. Il expliqua ce phénomène en proposant que les nerfs passent d'un côté à l'autre de la ligne médiane sur leur trajet, en formant un X (Finger, 1994). Il fallut attendre encore plusieurs siècles pour que Pourfour du Petit et Mistichelli, en 1710, identifient la pyramide bulbair comme le site de décussation des faisceaux moteurs (Finger, 1994 ; Armand, 1982). Puis en 1810, Gall et Spürzheim, par ailleurs fondateurs de la phrénologie, décrivent les voies motrices depuis la décussation pyramidale jusqu'au cortex moteur (Gall, 1810).

Les signaux moteurs sortants comme les signaux sensoriels entrants sont en effet « croisés ». Chaque hémisphère cérébral est la cible de stimulations sensorielles en provenance du côté opposé du corps, controlatéral, auquel il renvoie des ordres moteurs. Par exemple, le cortex visuel droit traite les informations visuelles qui se trouvent dans la moitié gauche de notre champ de vision et le cortex moteur commande les muscles de l'hémicorps opposé. Par conséquent les fibres nerveuses doivent nécessairement croiser le plan médian pour connecter le centre nerveux ou la région concernée. Cette organisation croisée du système nerveux explique pourquoi les personnes ayant subi une attaque ou une lésion cérébrale dans l'hémisphère gauche peuvent éprouver des difficultés à ressentir des stimulations sensorielles de la partie droite du corps. Cette caractéristique divise les projections axonales et leurs cibles neuronales en deux types : projection non croisée vers une cible ipsilatérale et projection croisée ou décussée vers une cible controlatérale. Ces dernières projections qui connectent les deux hémisphères sont qualifiées de commissurales, terme provenant du latin « *commissura* » qui signifie « liaison ».

1.2 Description des commissures

Des faisceaux d'axones croisent la ligne médiane tout au long de l'encéphale et de la moelle épinière, au niveau de plusieurs commissures situées à des positions précises le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral du système nerveux. Le cortex renferme trois voies nerveuses principales : des voies d'association qui relient différentes zones corticales du même hémisphère, des voies commissurales qui relient les cortex des deux hémisphères, des voies de projection qui font la liaison entre le cortex et des noyaux sous-corticaux, distribués tout le long du système nerveux central. Les projections des noyaux sous-corticaux peuvent également décussent. Les commissures du cerveau antérieur sont formées par les fibres nerveuses qui relient les parties homologues des deux cortex droit et gauche. La plus rostrale, le corps calleux, relie les deux néocortex et constitue la principale commissure inter-hémisphérique. Les aires cérébrales non reliées par les fibres du corps calleux sont dites aires primaires, par opposition aux régions reliées par ce dernier qui forment les aires associatives. La commissure antérieure connecte les bulbes et les centres olfactifs des deux hémisphères. Le fornix ou commissure hippocampique relie le cortex de l'hippocampe aux corps mammillaires. Les autres commissures du cerveau antérieur sont la commissure habénulaire, la commissure postérieure, la commissure sous-thalamique et le chiasma optique. Un grand nombre de fibres décussent également dans le cerveau postérieur ou tronc cérébral, telles que les fibres auditives issues du noyau cochléaire, les fibres du système de contrôle respiratoire, des fibres tecto-spinales ou encore des fibres efférentes ou afférentes au cervelet comme par exemple celles formant la commissure pontique et olivaire. Les fibres cortico-spinales descendantes croisent la ligne médiane au niveau de la commissure pyramidale qui se situe juste à l'entrée de la moelle épinière. En revanche, les voies motrices extrapyramidales réticulo-spinale et vestibulo-spinale (motricité involontaire) projettent ipsilatéralement. La voie sensorielle lemniscale ascendante est formée de fibres qui projettent en plusieurs relais vers le cortex sensoriel et décussent également dans le tronc cérébral. Elle diffère de la voie sensorielle extra-lemniscale qui décusse dans la moelle épinière. Enfin, de nombreux autres systèmes commissuraux établissent un lien entre les deux moitiés de la moelle épinière, notamment des interneurons des réseaux de la motricité qui croisent la ligne médiane au niveau de la commissure ventrale.

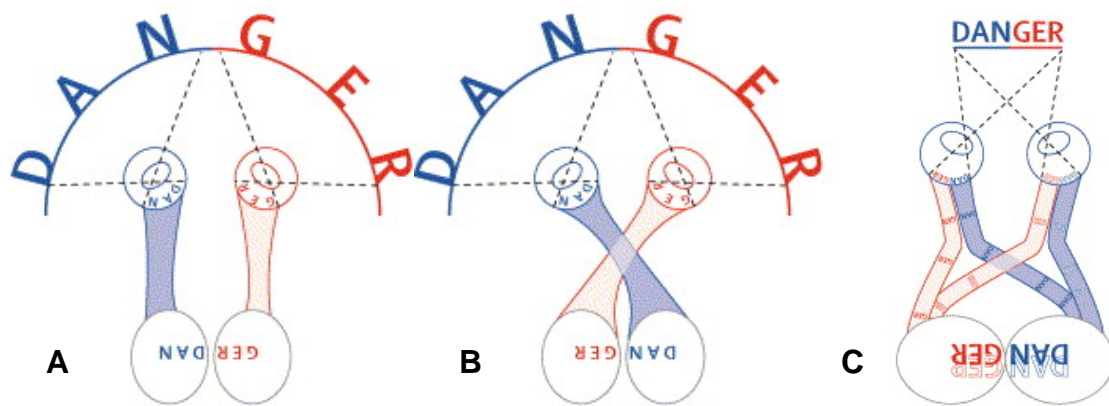


Figure 1: La formation des commissures permet une adaptation à des contraintes sensorielles

L'image formée sur la rétine est inversée. Chez un animal à vision latérale, chaque œil reçoit une information visuelle en provenance d'un seul hémichamp. Le croisement complet des projections rétiniennes permet de restaurer une continuité dans l'image du monde extérieur (représenté ici par le mot « Danger ») projetée vers les centres visuels (B comparé à A). Notez que chaque hémisphère traite alors l'information visuelle contenue dans l'hémichamp visuel opposé.

Une nouvelle contrainte apparaît chez les animaux à vision binoculaire (C). Les informations visuelles perçues par chaque œil sont partiellement chevauchantes. Cependant, la représentation des deux hémichamps est envoyée exclusivement vers le cortex controlatéral (hémichamp droit vers cortex gauche et l'inverse). L'information visuelle concernant l'hémichamp gauche reçue par l'œil droit est acheminée ipsilatéralement vers le cortex visuel droit et réciproquement.

(Adapté de Vulliamoz et coll. 2005)

1.3 Les commissures, une fonction méconnue

1.3.1 Hypothèse de l'adaptation du système nerveux à des contraintes sensorielles

“One of the most obscure issues in biology is, no doubt, to determine to what extent the organism benefits from the singular phenomenon of the decussation.” (Ramón y Cajal, 1898).

Il est important de comprendre l'intérêt évolutif de ce phénomène de décussation qui semble, à première vue, inutilement compliquer l'organisation du système nerveux. Ramón y Cajal estimait qu'il s'agissait là de l'une des plus obscures questions de la biologie. Il proposa une explication dans un article publié en 1898, qui garde encore la faveur des neurosciences contemporaines (Cajal, 1898). Sa théorie repose sur une explication adaptative. Il avança d'abord que le croisement des tractus visuels est imposé par des contraintes optiques. L'image perçue au niveau de la rétine est inversée. Par conséquent, croiser la ligne médiane au niveau du chiasma apparaît nécessaire pour restaurer l'orientation normale du champ visuel (Fig.1). Ainsi, la topographie du système nerveux central est étroitement liée au mode de fonctionnement des systèmes sensoriels. Un autre argument peut être avancé dans ce sens. Chez l'homme comme chez tous les animaux à vision binoculaire, qui ont deux yeux en position frontale, des contraintes visuelles imposent une nouvelle complexité (Fig.1). Ces deux yeux orientés vers l'avant voient inévitablement une même partie du champ visuel situé en face d'eux. Ainsi, seules les fibres issues de la partie nasale de chacune des deux rétines croisent la ligne médiane au niveau du chiasma optique. Ceci permet que les informations en provenance de chaque moitié du champ visuel soient transmises uniquement vers l'hémisphère controlatéral. Ainsi l'information sensorielle dupliquée n'est pas acheminée à deux endroits différents du cerveau pour être traitée. Les deux hémisphères s'échangent ensuite mutuellement les informations visuelles reçues afin de pouvoir générer une représentation sensorielle globale. Les informations sensorielles reçues par les deux hémisphères peuvent ensuite être échangées, afin de combiner ou de coordonner leur activité. Cette fonction dans le système visuel est jouée en grande partie par les fibres commissurales traversant le corps calleux.

1.3.2 Démonstration expérimentale de l'importance des systèmes commissuraux chez l'homme

La complexité du cerveau repose notamment sur ses connectivités. Une augmentation considérable de la substance blanche au cours de l'évolution des primates (Schoenemann et coll., 2005) a été accompagnée d'une augmentation des voies de connexions inter-

hémisphériques. La démonstration expérimentale de l'importance fonctionnelle des commissures peut passer par l'étude des conséquences de leur absence ou d'anomalies les affectant.

1.3.2.1 Conséquences de l'absence de corps calleux

Chez l'Homme, le corps calleux forme la voie de connexion inter-hémisphérique la plus proéminente, avec environ 200 millions d'axones. Ces connexions homo ou hétérotypiques apparaissent principalement excitatrices. De nombreuses études se sont intéressées aux conséquences de lésions calleuses. Ce syndrome a été étudié en particulier par R. Sperry, qui pratiquait des callosotomies chirurgicales en traitement de l'épilepsie afin d'empêcher la bilatéralisation de la décharge. Ces travaux lui ont valu le prix Nobel de Médecine (Sperry, 1974 ; Gazzaniga, 2005). Suite à ces lésions du corps calleux, le comportement général des patients ainsi que leurs capacités intellectuelles sont peu altérés, ce qui a permis à Sperry d'étudier de nombreux cas. De nombreuses pathologies peuvent également causer une agénèse calleuse chez l'homme (pour revue, Paul et coll., 2007). Leur étiologie est souvent liée à des troubles développementaux causés par des déficiences génétiques. L'étude de patients, présentant une absence partielle (dysgénèse) ou totale (agénèse) de corps calleux a contribué à découvrir la fonction de cette commissure.

Ces lésions ont pour conséquence une déconnexion cérébrale à l'origine d'une asynergie entre les deux hémisphères, connue sous le nom de syndrome de déconnexion calleuse. Les signes cliniques de ce syndrome vont largement dépendre de la localisation de la lésion sur le corps calleux. Ces patients peuvent souffrir par exemple d'une apraxie idéo-motrice gauche (incapacité à exécuter un geste symbolique tel qu'un salut militaire sur commande ou intentionnellement avec la main gauche), d'une apraxie diagonistique (mise en opposition des commandes motrices envoyées par chaque hémisphère, la main gauche tente de prendre un objet alors que la main droite le repose instantanément) ou d'une anomie visuelle et une alexie unilatérale gauche (incapacité à dénommer des objets ou des lettres projetées dans le champs visuel gauche). Cette dernière anomalie traduit un manque de transfert inter-hémisphérique d'informations visuelles. Cette déconnexion corticale visuelle, révélée par la réalisation de tâches nécessitant une comparaison entre les deux champs visuels, est retrouvée chez une majorité de ces patients (Brown et coll., 1999). Par ailleurs, l'impact de l'agénèse du corps calleux sur les capacités cognitives reste assez limité. Un tiers des patients atteints se développe normalement ou avec des retards mentaux peu importants (Shevell, 2002). Ils ne présentent que de légers problèmes comportementaux (Moutard et coll., 2003). Ces patients gardent cependant la capacité de transfert interhémisphérique d'informations familières au sein d'autres systèmes sensoriels, leur conférant une habilité pour d'autres tâches comparatives simples (Brown et coll., 1999 ; Brown et coll., 2001). Ce transfert d'information peut passer par

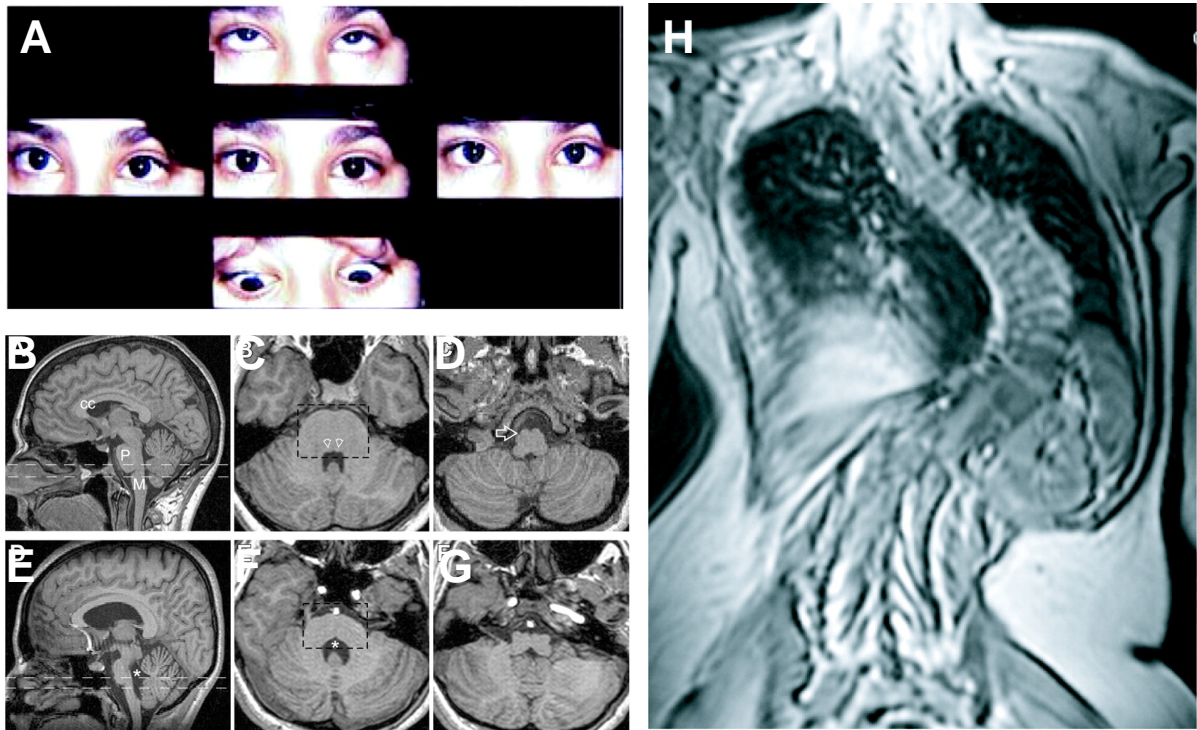


Figure 2: Le Syndrome HGPPS

Figure illustrant les symptômes liés au syndrome HGPPS «Horizontal Gaze Palsy with Progressive Scoliosis ». Photos montrant l'incapacité d'un patient à réaliser des mouvements intentionnels horizontaux des yeux (A). Images en résonance magnétique du cerveau d'un sujet normal (A, B, C) ou atteint du syndrome HGPPS (E, F, G) à des niveaux anatomiques comparables. Une vue sagittale montre que le cortex et le corps calleux se développent normalement chez ces patients (B, E). Des sections axiales au niveau du pont (C, F) ou de la medulla (D, H) montrent que le quatrième ventricule est élargi chez les patients malades. Ceci s'accompagne d'une hypoplasie du noyau du pont (pointillés en C et F) et de l'abducens (flèches en D et G), ainsi que d'une fissure médiane prononcée. L'observation en résonance magnétique de la moelle épinière d'un patient démontre également une scoliose sévère (H) (Adapté de Jen et coll. 2004).

les commissures persistantes, notamment la commissure antérieure qui peut jouer un rôle compensatoire. Cependant, la limite de ces patients apparaît avec l'augmentation de la complexité de la tâche, qui nécessite un transfert et l'intégration d'opérations cognitives plus complexes, une analyse plus rapide ou qui repose moins sur une expérience acquise (Jeeves et coll., 1979 ; Brown et coll., 1999 ; Meerwaldt, 1983 ; Sauerwein et Lassonde, 1983). D'autre part, l'agénèse du corps calleux peut être liée à certaines maladies psychiatriques. Sa structure peut être affectée chez des patients atteints de schizophrénie et l'autisme est souvent associé à une agénèse totale ou partielle de cette commissure (Baron-Cohen, 2004 ; Chinnasamy et coll., 2006).

1.3.2.2 Étude du Syndrome HGPPS

Des patients souffrant d'une maladie rare autosomale récessive, appelée «Horizontal Gaze Palsy with Progressive Scoliosis » (HGPPS), sont porteurs de mutations du gène *Robo3* localisé sur le chromosome 11, (locus 11q24 ; Jen et coll., 2002 ; Jen et coll., 2004). Les principaux symptômes sont l'apparition d'une scoliose progressive durant l'enfance qui deviendra très prononcée et l'incapacité d'effectuer des mouvements oculaires horizontaux (Fig.2 ; Jen et coll., 2004). Des observations en imagerie à résonance magnétique ont révélé chez ces patients une hypoplasie du noyau du pont et des pédoncules cérébelleux, ainsi qu'une légère diminution de la taille du noyau oculomoteur abducens (nerf crânien VI) qui contrôle des mouvements oculaires. Ils présentent également tous d'importants défauts commissuraux. Une stimulation magnétique trans-craniale évoque normalement une réponse motrice contralatérale. Chez les patients atteints de HGPPS, la réponse motrice est de latence normale mais uniquement ipsilatérale. De même, un potentiel sensoriel évoqué active anormalement le cortex somatosensoriel ipsilatéral (Jen et coll., 2004 ; Macdonald et coll., 2004). Ces données suggèrent que la décussation pyramidale des fibres motrices descendantes et la décussation lemniscale médiane des fibres sensorielles ascendantes sont absentes chez ces patients. Ces voies de projection se forment, mais ipsilatéralement. Une fente médiane profonde traverse la région du pont (« split-pons ») et de la *medulla oblongata*, ce qui est un autre signe du manque de projections commissurales dans ces régions formant le tronc cérébral (Bosley et coll., 2005 ; Jen et coll., 2004 ; Rossi et coll., 2004).

Malgré ces défauts commissuraux importants, les déficits sensoriels et moteurs affectant ces patients sont très limités. Ces patients ont une dextérité manuelle normale, signe du maintien d'une activité motrice fine. Leurs fonctions perceptives et cognitives ne sont pas affectées. Il faut préciser que la déconnexion cérébrale n'est toujours que partielle, ce qui peut permettre la mise en jeu de processus compensateurs. Certaines voies motrices, sensorielles et auditives croisent toujours la ligne médiane (Amoiridis et coll., 2006). De même, d'autres commissures

majeures comme le chiasma optique, le corps calleux ou encore la commissure antérieure ne semblent pas être affectées.

1.4 Recherches des facteurs impliqués dans la mise en place des commissures

Les pathologies à l'origine d'une agénèse du corps calleux ou du syndrome HGPPS ne sont pas la conséquence d'une dégénérescence des commissures, mais d'anomalies de développement. La formation des faisceaux commissuraux, comme toutes les voies de connexions axonales, est régulée par des interactions complexes entre les neurones en développement et leur environnement. La perturbation de ces processus entraîne des anomalies cérébrales telles qu'un développement défectueux ou l'absence totale de ces commissures. Ces malformations peuvent résulter de défauts neuronaux intrinsèques qui affectent leur capacité à répondre correctement aux signaux environnementaux ou d'un échec dans la mise en place de cette information de guidage.

Des études pionnières dans la recherche des facteurs moléculaires impliqués dans le guidage axonal ont été réalisées chez les invertébrés. A la fin des années 1960, Brenner introduisit le nématode *Caenorhabditis elegans* comme système modèle dans le but d'identifier par une approche génétique les règles de fonctionnement du système nerveux (Brenner, 1974). Il identifia par criblage de nombreux gènes dont la mutation affecte la locomotion de ces vers, notamment par l'apparition de mouvements non coordonnés (gènes *unc* pour *uncoordinated*). Plusieurs de ces gènes se sont révélés être essentiels à la mise en place des projections nerveuses et à la formation des commissures. Des cribles génétiques similaires ont également été réalisés chez la drosophile à partir des années 1980. Goodman et ses collaborateurs ont réalisé des cribles recherchant des gènes directement impliqués dans le développement des projections commissurales (Goodman et coll., 1984 ; Thomas et coll., 1984 ; Patel et coll., 1987 ; Jacobs et Goodman, 1989a ; Jacobs et Goodman, 1989b). Ces facteurs, qui sont pour l'essentiel des molécules de guidage axonal, sont fortement conservés durant l'évolution. Ainsi, les découvertes faites chez les invertébrés ont été rapidement transposées aux mammifères. Les facteurs diffusibles Slits et leurs récepteurs Roundabouts (Robos) constituent une des familles de molécules de guidage dont la fonction a été conservée au cours de l'évolution. Sa fonction chez les vertébrés est aujourd'hui confirmée en partie par l'étude de souris déficientes pour ces gènes. La mutation du gène *robo3* entraîne l'absence de plusieurs commissures (Sabatier et coll., 2004 ; Marillat et coll., 2004), défauts très similaires à ceux décrits chez les patients atteints du syndrome HGPPS. D'autre part la mutation des gènes *slits* chez la souris est également à l'origine de déficiences dans la formation du corps calleux et d'autres commissures. Mon travail de thèse s'inscrit dans cette thématique de recherche, visant à

dévoiler l'action des gènes *slits* et *robos in vivo*. Je présenterai dans cette introduction les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le contrôle du croisement de la ligne médiane par les neurones en développement, puis l'état actuel des connaissances sur la fonction du système Slit/Robo dans ces processus.

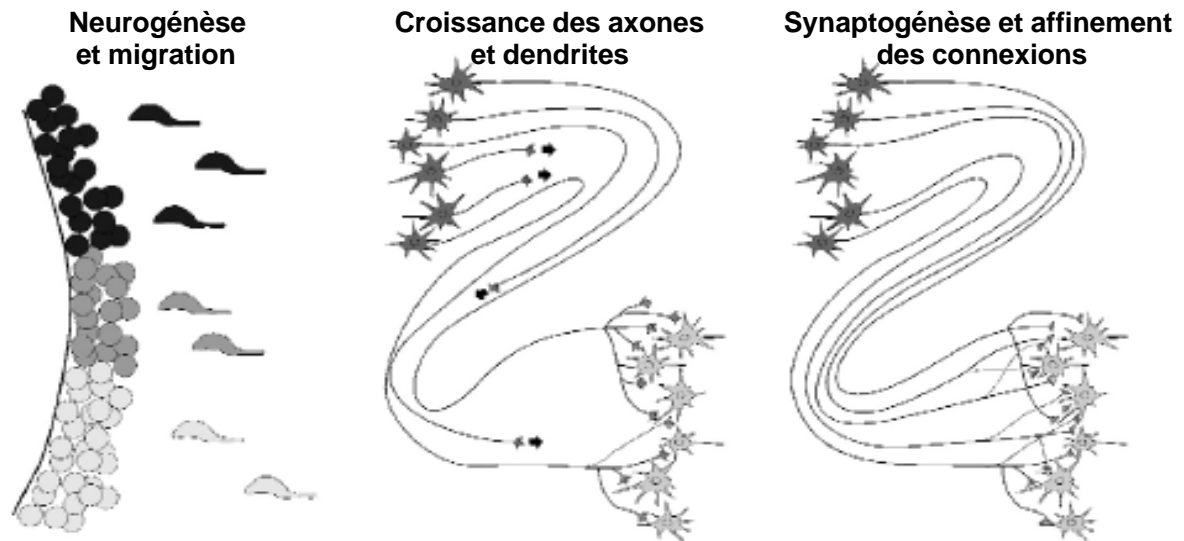


Figure 3: Principales étapes du développement du système nerveux

Représentation d'une région germinative ventriculaire constituée de trois zones neurogéniques. Les neuroblastes nouvellement générés partent en migration vers leur destination finale et sont dirigés par un prolongement guide. Chaque axone en croissance va pousser spécifiquement jusqu'à sa cible et établir des contacts synaptiques particuliers qui pourront être par la suite redéfinis. (Adapté de Barallobre et coll. 2005).

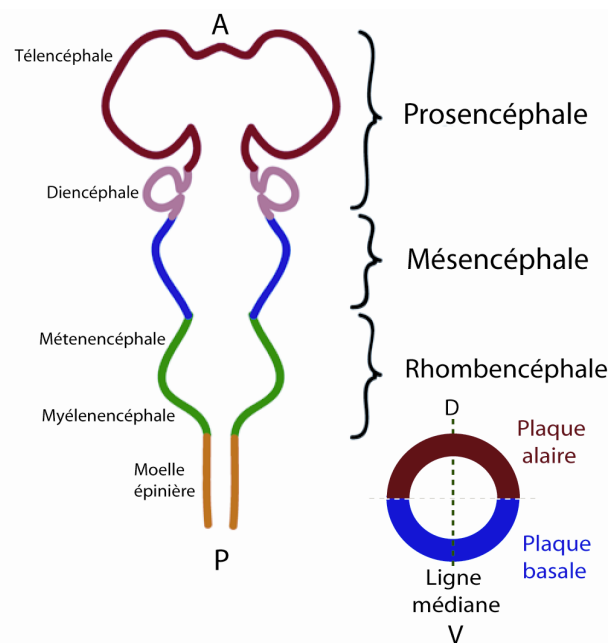


Figure 4: Régionalisation du tube neural

Représentation schématique de la segmentation du tube neural. Celui-ci est subdivisé sur son axe antéro/postérieur (A/P) en trois vésicules céphaliques primordiales prolongeant la moelle épinière: le prosencéphale (la plus antérieure, comprenant le télencéphale et diencéphale), le mésencéphale puis le rhombencéphale (la plus postérieure, comprenant le métencéphale et myélenencéphale). Le tube neural est également subdivisé en plusieurs territoires distincts selon deux plans parallèles à son axe A/P. La zone dorsale (D), ou plaque alaire, se distingue d'une zone ventrale (V), la plaque basale. La ligne médiane sépare les deux hémisphères droit et gauche

2 Découverte des processus de guidage mis en jeu dans le contrôle de la décussation neuronale

2.1 Par quels mouvements les neurones peuvent-ils franchir la ligne médiane ?

2.1.1 Problématique

Ramón y Cajal formula il y a plus d'un siècle la « théorie neuronale » décrivant le système nerveux central comme un réseau de neurones intriqués selon une organisation hautement complexe (Cajal, 1911). Le cerveau humain est en effet constitué de milliards de neurones, agencés très précisément au sein des systèmes nerveux central ou périphérique. Ces cellules spécialisées dans le transfert et l'intégration de l'information nerveuse sont interconnectées au sein de circuits neuronaux. Le développement du système nerveux se fait de façon stéréotypée et reproductible entre deux individus de la même espèce, voire même d'une espèce à l'autre. La mise en place des deux moitiés cérébrales symétriques est parfaitement synchronisée. Ainsi, depuis plus d'un siècle, certains scientifiques tentent de comprendre comment les neurones trouvent leur position et se relient si précisément.

Cette question peut être abordée par l'étude de plusieurs processus distincts mais interdépendants (Fig.3) : la spécification de l'identité neuronale, la polarisation neuronale, la migration neuronale, la croissance axonale et dendritique, la reconnaissance de la cible cellulaire et enfin la formation et la stabilisation des contacts synaptiques. Nous allons voir que l'étude de la formation des commissures est un modèle idéal pour faire avancer la compréhension que nous avons de certains de ces processus.

Tous les neurones du cerveau adulte sont issus de précurseurs indifférenciés en prolifération au sein de zones germinatives. Celles-ci sont situées principalement dans la zone ventriculaire exposée à la lumière du tube neural, structure formée et segmentée à l'issue de la neurulation (Fig.4). Le terme de « migration neuronale » s'applique à l'ensemble des mouvements mis en jeu lors du déplacement des neurones post-mitotiques vers la position finale qu'ils occupent et où ils achèvent leur maturation. Certains neurones vont migrer à travers la ligne médiane du système nerveux et s'implanter dans la moitié opposée. Par ailleurs, les neurones projettent un axone qui va croître et naviguer parfois sur de longues distances jusqu'à atteindre sa cible. Nous avons vu que celle-ci peut être située du même côté (projection ipsilatérale) ou du côté opposé (projection commissurale). Je décrirai plus en détail ces étapes du développement qui se déroulent principalement au cours de l'embryogenèse.

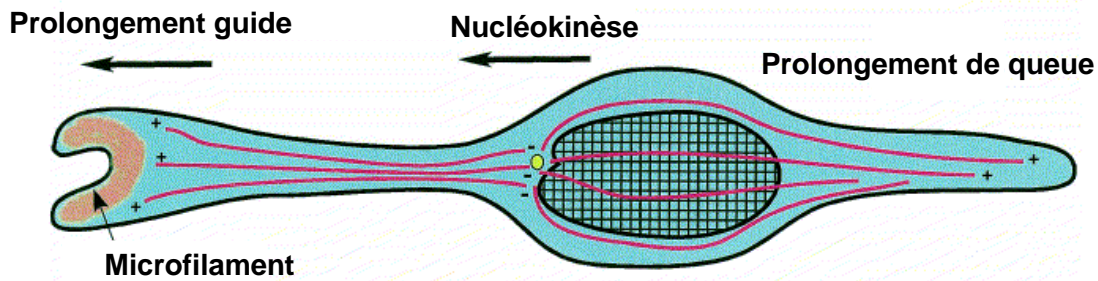


Figure 5: Organisation d'un neurone en migration

Vue schématique d'un neurone en migration. Les microtubules rayonnant depuis le centrosome, centre organisateur des microtubules (en jaune), forment une cage entourant le noyau. Le prolongement de queue peut se rétracter au fur et à mesure du mouvement. (Adapté de Lambert de Rouvroit et coll. 2001).

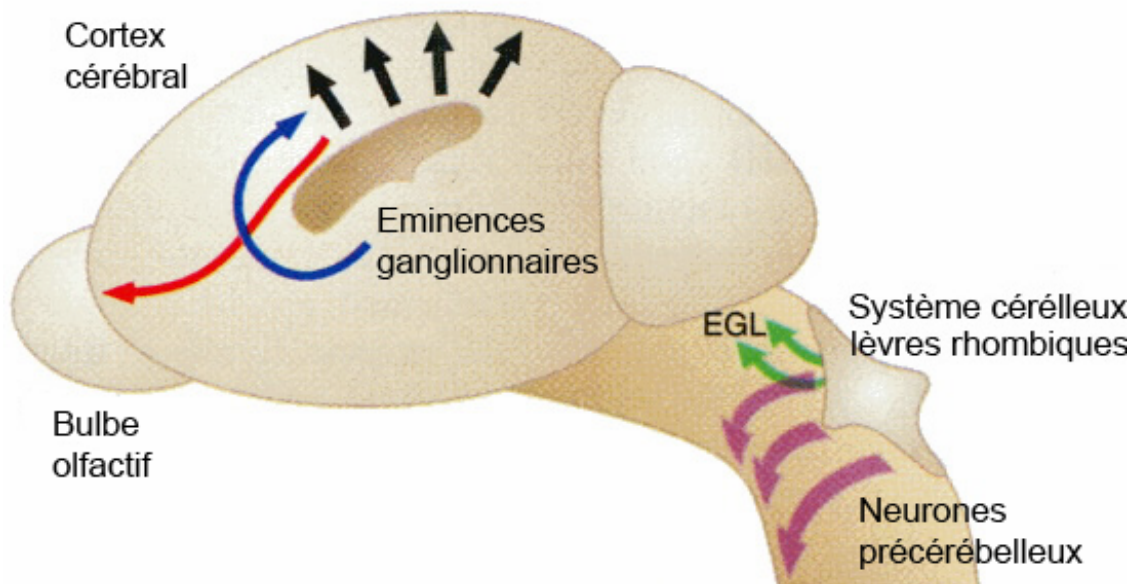


Figure 6: Voies de migrations tangentielles du système nerveux central des vertébrés

Représentation schématique de la trajectoire des principales voies de migrations tangentielles et de leurs origines (Vue latérale, antérieur vers la gauche). Les précurseurs des neurones granulaires du cervelet formant la couche granulaire externe (EGL) ainsi que plusieurs noyaux précérébelleux migrent depuis les lèbres rhombiques, zone germinative du rhombencéphale dorsal. Plusieurs courants de migration traversent le cerveau antérieur ou télencéphale. Les interneurons corticaux migrent depuis la région des éminences ganglionnaires (EG) jusqu'au cortex cérébral. Une seconde zone germinative ventriculaire produit également des interneurons migrant antérieurement vers le bulbe olfactif.

(Adapté de Hatten 2002)

2.1.2 Migration neuronale

Tout processus de migration repose initialement sur l'émission d'un prolongement guide (Fig.5). Cette protrusion possède une extrémité motile qui va s'éloigner du corps cellulaire, auquel elle reste reliée par des microtubules. Organisés en un large faisceau, ils stabilisent le neurite en croissance et permettent le transport à son extrémité des éléments nécessaires à son extension. Ces microtubules s'étendent à l'intérieur du prolongement guide depuis le centrosome ou corps basal, qui organise également des microtubules formant une cage autour du noyau (Rivas et Hatten, 1995 ; Xie et coll., 2003). Celui-ci se déplace par des mouvements saltatoires à l'intérieur de ce prolongement guide, au cours du processus de nucléokinèse. Le centrosome est essentiel pour coordonner la dynamique du cytosquelette et coupler le mouvement du noyau à celui du prolongement guide (Tanaka et coll., 2004 ; Shu et coll., 2004). Son déplacement précède celui de noyau, qu'il va ensuite tirer grâce aux microtubules (Bellion et coll., 2005 ; Schaar et McConnell, 2005; Shu et coll., 2004 ; Tanaka et coll., 2004 ; Xie et coll., 2003 ; Tsai et coll., 2007). Le prolongement guide des neurones en migration est une extrémité motile très comparable à un cône de croissance axonal en extension, dont les caractéristiques structurales et fonctionnelles seront décrites par la suite (Hatten, 1999 ; Lambert De Rouvroit et Goffinet, 2001). Un prolongement de queue reste à l'arrière de la cellule en migration.

Deux modes de migration neuronale, tangentielle ou radiaire, sont classiquement distingués. Ils diffèrent principalement par l'orientation de leur mouvement et leur support de migration (voir pour revues Rakic, 1990 ; Hatten, 1999 ; Marin et Rubenstein, 2003 ; Marin et Rubenstein, 2001). La migration radiaire est orientée selon une trajectoire perpendiculaire à la surface du système nerveux, entre la surface ventriculaire interne et la surface piaie externe (Marin et Rubenstein, 2003). Ce mode de migration est essentiellement « gliophilique », puisque ces neurones progressent au contact de la glie radiaire qui constituent également des précurseurs neuronaux (Rakic, 1971 ; Rakic, 1972 ; Kriegstein et Noctor, 2004). Les somas de ces cellules gliales sont situés au niveau de la zone ventriculaire. Elles envoient un prolongement qui s'étend vers la surface piaie, traverse l'épaisseur du tube neural pour aller s'ancrer à la membrane basale (Campbell et Gotz, 2002). Ces fibres forment ainsi un échafaudage radiaire établissant un lien entre les surfaces interne et externe du système nerveux, qui est utilisé comme support de migration. Plusieurs générations de neurones empruntent les mêmes fibres radiaires par vagues successives et forment des couches se superposant les unes aux autres. Ainsi, la migration radiaire est le mode de migration principalement utilisé pour construire des structures multi-couches comme le cortex cérébral et cérébelleux, ou d'autres structures telles que l'hippocampe, le striatum, le thalamus ou la moelle épinière. Bien que ce mode de migration neuronale soit le plus fréquent chez les vertébrés supérieurs, je ne le décrirai pas plus en détail ici car un déplacement radiaire ne permet pas de franchir la ligne médiane.

La migration tangentielle présente un certain nombre de caractéristiques qui la différencient radicalement de la migration radiaire. Elle est utilisée par une minorité de neurones du système nerveux comme les interneurones GABAergiques du néocortex (Anderson et coll., 1999 ; Zhu et coll., 1999 ; Lopez-Bendito et coll., 2006) et du bulbe olfactif (Wichterle et coll., 1997) ou encore les neurones précérébelleux du tronc cérébral que je décrirai par la suite (Fig.6 ; Hatten, 2002 ; Marin et Rubenstein, 2003 ; Marin et Rubenstein, 2001). Ces neurones se déplacent selon plusieurs orientations, toujours parallèlement à la surface du système nerveux. Pendant la migration tangentielle, les neurones peuvent soit progresser le long de l'axe antéro-postérieur (vers l'avant ou vers l'arrière) et franchir plusieurs frontières neuromériques, soit suivre une trajectoire dorso-ventrale ou ventro/dorsale et éventuellement traverser la ligne médiane (Rakic, 1990). A ce titre, ce mode de migration est générateur de brassage neuronal, car il permet de mélanger des neurones issus de neuromères distincts ou des deux moitiés droite et gauche du système nerveux.

Les neurones à migration tangentielle n'utilisent pas tous le même support. Cette migration peut se faire au contact de faisceaux d'axones en projection, elle est alors dite « axophile ». Par exemple, des neurones du LHRH (« Luteinizing Hormone Releasing Hormone ») migrent initialement le long du nerf voméronasal en direction du bulbe olfactif. Ils se déplacent ensuite le long de la surface ventrale du cerveau postérieur pour finalement se positionner au niveau de l'hypothalamus (Schwanzel-Fukuda et Pfaff, 1989 ; Yoshida et coll., 1995). Certains neurones peuvent également progresser en chaînes au contact les uns des autres, comme c'est le cas des interneurones olfactif (Rousselot et coll., 1995). On parle alors de migration neurophilique. Enfin, des neurones en déplacement tangentiel, tels que les interneurones corticaux, les grains du cervelet ou certains neurones précérébelleux changent de support et d'orientation au cours de leur trajet. Ils peuvent alors éventuellement migrer radiairement (Kawauchi et coll., 2006 ; Tanaka et coll., 2006 ; Yacubova et Komuro, 2003 ; Kriegstein et Noctor, 2004 ; Metin et coll., 2006).

2.1.3 Le processus de croissance axonale

2.1.3.1 Fonction du cône de croissance axonal

En 1890, Ramón y Cajal a décrit pour la première fois le cône de croissance à partir de l'observation des axones commissuraux sur des sections de moelle épinière embryonnaire d'embryon de poulet marquées au chromate d'argent (Cajal, 1890). Il suggéra à juste titre que cette « concentration de protoplasmes de forme conique et dotée de mouvement amiboïde » constitue l'extrémité motile des axones en croissance. Ce n'est qu'en 1907 qu'Harrison utilisa un système novateur de culture de neurones observés à intervalles de temps réguliers et prouva de façon définitive que le cône de croissance est en effet une structure mobile

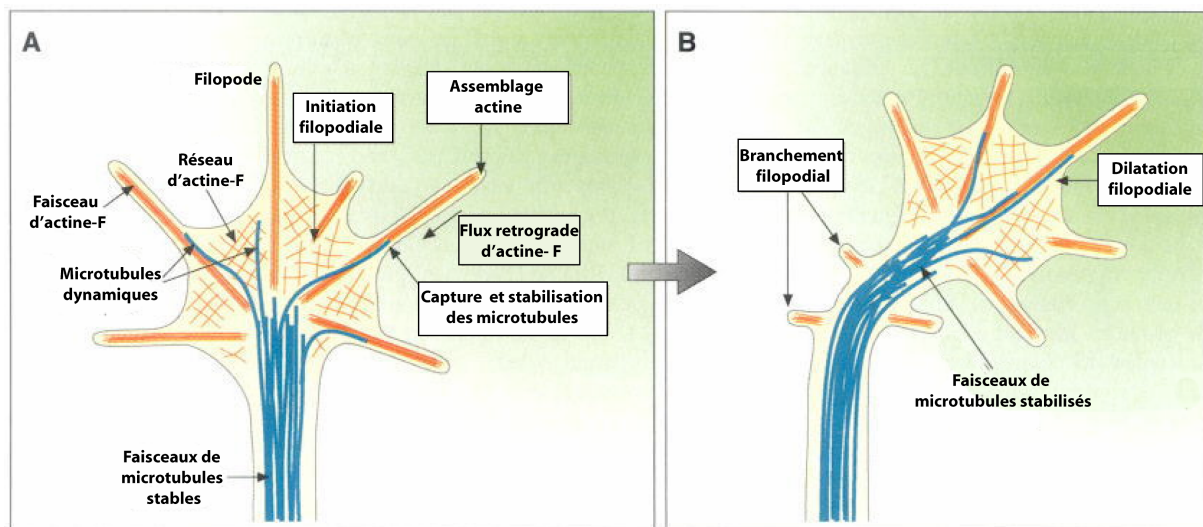


Figure 7: Structure du cône de croissance de croissance axonal

Modèle montrant l'organisation du cône de croissance et de son cytosquelette (A), ainsi que les changements (encadrés) mis en jeu lorsque celui-ci répond et tourne vers un facteur attractif réparti en gradient (vert) (B).

(Adapté de Dickson et coll. 2002).

(Harrison, 1910). *In vivo*, l'orientation prise par le cône de croissance dans son environnement déterminera la trajectoire future de l'axone. Selon les espèces et les populations neuronales considérées, les cônes de croissance peuvent présenter des caractéristiques morphologiques distinctes. Cependant, tous partagent une organisation générale et une dynamique communes.

2.1.3.2 Structure et dynamique du cône de croissance

Le cône de croissance est une structure mobile spécialisée dans l'exploration de l'environnement (Fig.7). Comme l'impose cette fonction, le cône de croissance est capable de changements morphologiques et structuraux extrêmement rapides qui impliquent des réorganisations de sa membrane et de son cytosquelette (Goldberg et Burmeister, 1986 ; Aletta et Greene, 1988). Le cône de croissance est compartimenté en plusieurs domaines sub-cellulaires (Suter et Forscher, 2000 ; Schaefer et coll., 2002b ; pour revues Mueller, 1999 ; Korey et Van Vactor, 2000 ; Barallobre et coll., 2005) :

- Un domaine central prolonge le corps de l'axone et contient des microtubules ainsi qu'une grande variété d'organites et de vésicules. Les microtubules émergent de l'axone où ils sont alignés au sein d'un faisceau dense qui supporte ce prolongement sur toute sa longueur (Fig.7 ; Dent et Gertler, 2003). Quand ils entrent dans le cône de croissance, les microtubules forment les filaments indépendants s'arrangeant en une structure évasée. Leurs extrémités sont alors animées d'une instabilité dynamique caractéristique et peuvent adopter des morphologies multiples (Tanaka et Kirschner, 1991 ; Schaefer et coll., 2002a). Des mouvements d'extension et de rétraction leur permettent d'explorer la région périphérique du cône de croissance. La polymérisation des microtubules est nécessaire à l'extension axonale (Tanaka et Kirschner, 1991 ; Tanaka et coll., 1995 ; Chalacombe et coll., 1996 ; Chalacombe et coll., 1997 ; Buck et Zheng, 2002).

- Un domaine périphérique riche en actine est formé de protrusions membranaires appelées lamellipodes et filopodes. Ces structures membranaires sont animées de mouvements de croissance et de rétraction permanents, qui déterminent le comportement dynamique du cône de croissance. La motilité de ces protrusions est basée sur la dynamique des filaments d'actine répartis en deux populations distinctes : des filaments denses et parallèles qui rayonnent dans le cône de croissance jusqu'aux filopodes (l'extrémité « plus » à croissance rapide est généralement orientée vers la membrane plasmique), ainsi qu'un réseau plus interne de filaments entrelacés (Fig.7 ; Lewis et Bridgman, 1992). Les mouvements d'extension et de rétraction des lamellipodes et des filopodes reflètent l'équilibre entre la polymérisation de ces filaments à l'extrémité plus et le flux rétrograde du filament dans son ensemble (Okabe et Hirokawa, 1991 ; Tanaka et coll., 1995 ; Lin et coll., 1996 ; Suter et Forscher, 2000 ; Mallavarapu et Mitchison, 1999). Cette dynamique est nécessaire à la croissance de l'axone

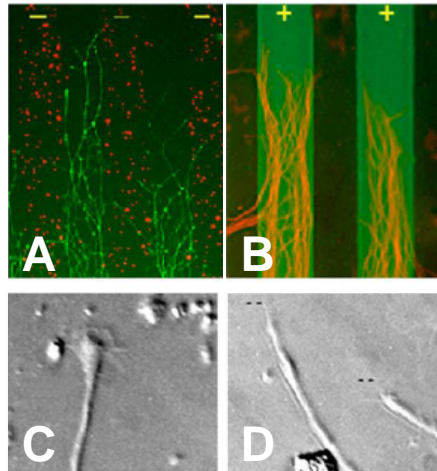


Figure 8: Tests in vitro ayant permis de révéler l'existence des facteurs de guidage agissant par contact

Test de "Stripe assay" (A, B): des axones sont confrontés à des bandes alternées de substrats différents et vont choisir le plus favorable à leur croissance.

Test de collapse: Au contact d'un facteur chimio-répulsif (ici Slit) le cône de croissance va « collapser », ce qui consiste en la rétraction de ses extensions membranaires.

(Adapté de Nguyen-Ba-Charvet et coll. 2001).

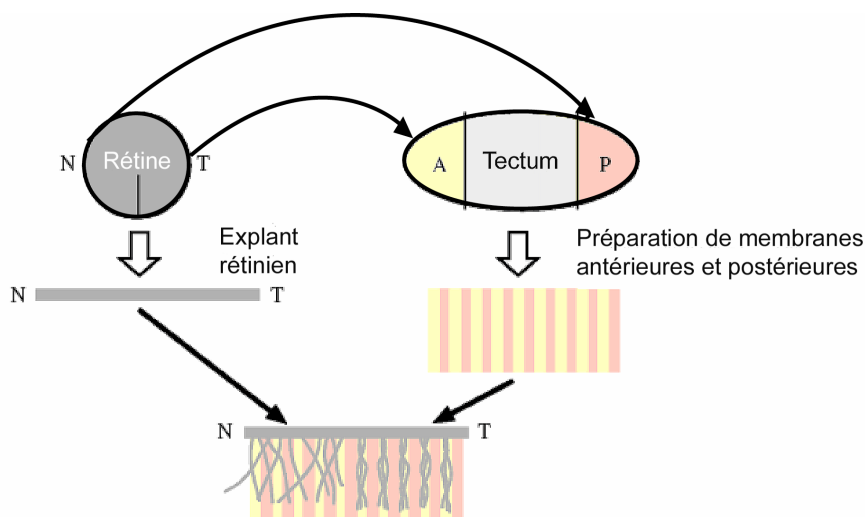


Figure 9: Expérience de « Stripe assay », guidage des axones rétiniens in vitro

Schéma descriptif de l'expérience menée par Walter et ses collaborateurs en 1987, première démonstration de l'implication de facteurs chimio-répulsifs agissant par contact dans la mise en place de la topographie des projections rétino-tectales. Les axones issus de la rétine temporale (T) ou nasale (N) projettent respectivement vers les régions antérieure (A) ou postérieure (P) du tectum ou colliculus supérieur (flèches noires). Une bande de rétine embryonnaire de poulet (temporo-nasale, T/N) est prélevée et mise en culture sur un tapis membranaire. Ces extraits membranaires, provenant de cellules de la partie antérieure (A) ou postérieure (P) du tectum, sont disposés en bandes alternées, larges d'une centaine de microns. Les axones nasaux sortant de l'explant rétinien ne présentent aucune préférence entre les deux tapis pour leur croissance. En revanche, les axones temporaux poussent préférentiellement sur des membranes de tectum postérieur. Ils ne peuvent pas franchir les frontières séparant les différentes bandes, car ils se trouvent repoussés au contact des membranes de tectum antérieur.

(Adapté de Loschinger, 2006)

(Challacombe et coll., 1996 ; Schaefer et coll., 2002a ; Zhou et Anderson, 2002 ; Dent et Gertler, 2003).

- Une zone de transition forme l'interface entre ces deux compartiments où les deux composants du cytosquelette interagissent (Tanaka et Kirschner, 1991). L'avancée du cône de croissance nécessite l'interaction des filaments de microtubules provenant du domaine central avec les filaments d'actines stabilisés dans la région périphérique (Fig.7). Ce processus peut se faire d'une façon asymétrique localisée à certains filopodes du cône de croissance. Cet événement permet ensuite une polymérisation orientée du faisceau de microtubules contenu dans le domaine central qui va alors progresser en même temps que l'axone s'allonge (Schaefer et coll., 2002a ; Song et Poo, 2001).

Nous allons voir que les axones sont dirigés par des molécules de guidage présentes dans l'environnement du cône de croissance. Celles-ci exercent des contraintes sur la dynamique de son cytosquelette et orientent sa progression.

2.2 Théorie chimiotropique, découverte de l'importance des molécules de guidage axonal

A la fin du XIX^{èm} siècle, Ramón y Cajal proposa pour la première fois qu'un cône de croissance peut être guidé par des gradients de substances diffusibles et attractives libérées par leurs régions cibles (Cajal, 1911 ; Sotelo, 2002). Faute de signaux identifiés, cette hypothèse n'a trouvé à l'époque que peu d'échos. Ce n'est qu'en 1963 que Sperry, travaillant sur la régénération axonale dans le système visuel chez les salamandres, formula la théorie dite de la « chimio-affinité » afin d'expliquer la mise en place de la projection rétino-tectale. Les neurones de la rétine temporale et nasale projettent respectivement vers les régions antérieure et postérieure du toit optique (ou tectum ; Fig.9). Sperry observa que si le nerf optique est sectionné et l'œil retourné à 180°, les axones rétiniens repoussent et se dirigent vers la région du tectum qu'ils innervent normalement. Il en tira la conclusion que des facteurs de nature chimique agissent spécifiquement sur certains cônes de croissance et leur permettent de reconnaître leur cible grâce à un phénomène d'affinité sélective (Sperry, 1963). Par la suite, le développement de systèmes de cultures de neurones ont permis de démontrer l'existence des molécules de guidage axonal chez les vertébrés, en dévoilant leur activité *in vitro* (Fig.8, 10).

2.2.1 Guidage par contact sous l'action de signaux locaux

2.2.1.1 Caractérisation *in vitro*

Des facteurs positionnels locaux, distribués dans l'environnement immédiat du cône de croissance peuvent orienter sa croissance par contacts permissifs/attractifs (ou adhésifs). Des expériences *in vitro* ont tout d'abord montré que la croissance axonale s'effectue préférentiellement sur certains substrats. Cette préférence repose sur les capacités d'adhérence du cône de croissance à ce substrat (Letourneau, 1975 ; Bonhoeffer et Huf, 1980 ; Rutishauser, 1993), qui doit présenter deux caractéristiques essentielles : il doit être suffisamment adhérent pour que les cônes de croissance puissent s'y maintenir, mais aussi assez permissif pour qu'ils puissent s'en détacher et se déplacer. Ce mode de guidage par contact semble reposer sur l'expression différentielle de molécules d'adhérence à la surface du cône de croissance et des cellules qu'ils contactent (Edelman, 1985).

Les premières études sur les mécanismes de guidage axonal étaient focalisées sur les processus qui favorisent le mouvement du cône de croissance. La notion de guidage par des contacts inhibiteurs a été avancée initialement par Abercrombie pour définir le comportement de croissance des fibroblastes cardiaques en culture sur un substrat solide (Abercrombie, 1967 ; Abercrombie, 1970). C'est seulement dans les années 1980 que certaines expériences ont suggéré que des signaux locaux non permissifs/répulsifs (ou anti-adhésifs) pouvaient également influencer le comportement des cônes de croissance axonaux en culture. Il a été tout d'abord démontré que de telles molécules inhibitrices sont présentes dans la myéline du système nerveux central (Caroni et Schwab, 1988). Par ailleurs, certains axones (par exemple sympathiques et rétiniens) ont des propriétés de fasciculation exclusives, ils se repoussent mutuellement et s'évitent durant leur croissance (Kapfhammer et coll., 1986). Le développement en parallèle de plusieurs tests *in vitro* a permis de mieux caractériser l'influence de ces facteurs inhibiteurs agissant par contact (Fig.8). Le « test de collapse » permet d'évaluer la capacité de ces signaux inhibiteurs à induire la rétraction ou le collapsus de cônes de croissance (Kapfhammer et Raper, 1987). Un second test, le « stripe assay », consiste à confronter des axones en croissance à des bandes alternées de substrats différents. Les axones choisissent alors le substrat le plus favorable à leur croissance (Walter et coll., 1987b). Ces expériences de culture sur bandes ont permis d'expliquer les observations de Sperry, en montrant que des mécanismes de guidage répulsifs interviennent dans la mise en place de la projection rétino-tectale (Fig.9) : Les axones de la rétine temporale confrontés à des d'extraits membranaires de tectum postérieur ou antérieur poussent exclusivement sur les bandes de tectum antérieur. Cette préférence est due à la présence d'un facteur répulsif à la surface des

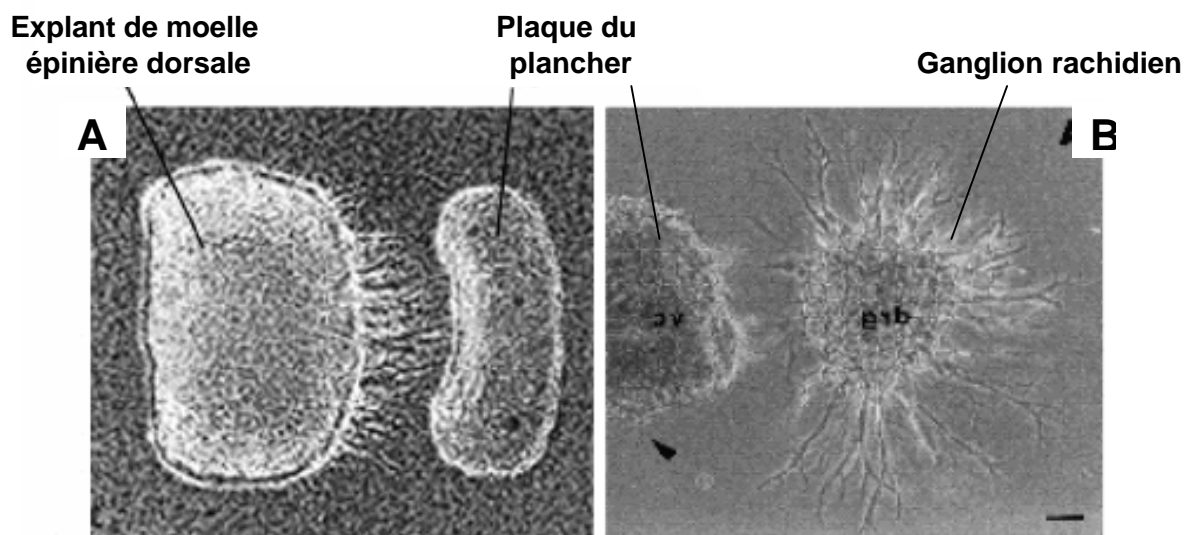


Figure 10: Effets chimiotropiques caractérisés grâce à la technique de co-culture neuronale en collagène

Des cellules présentes au niveau de la ligne médiane du système nerveux des vertébrés peuvent exercer des effets opposés sur la croissance axonale. Les axones des neurones commissuraux provenant d'un explant de moelle épinière dorsale, sont attirés par des cellules de la plaque du plancher qui sécrètent donc un facteur chimio-attractif (A). Cette même région repousse la croissance des axones des ganglions de la racine dorsale (ganglions rachidiens) (B). (Adapté de Placzek et coll. 1990; Fitzgerald et coll. 1993)

cellules de tectum postérieur. Les axones de la rétine nasale, quant à eux, ne présentent aucune préférence (Walter et coll., 1987b ; Walter et coll., 1987a ; Cox et coll., 1990).

2.2.1.2 Balisage des voies de projection *in vivo*

Le développement des connexions axonales débute par la croissance d'axones « pionniers » qui serviront de substrat à la croissance des axones suivants. Les trajectoires empruntées par les axones pionniers sont subdivisées en plusieurs segments. Chacun forme une voie de projection simple, balisée par des molécules de guidage axonal spécifiques. La croissance le long de ces segments est relativement rapide et linéaire. Cette étape met en jeu plusieurs forces de guidage agissant de façon coordonnée. Les axones vont choisir entre plusieurs voies de projection en fonction de leur capacité d'adhérence. Ce choix repose essentiellement sur des processus de guidage par contact attractif (Raper et coll., 1983a ; Raper et coll., 1983b ; Bastiani et coll., 1984) ou répulsif (pour revues, Keynes et Cook, 1990 ; Luo et Raper, 1994). La progression axonale est canalisée le long de couloirs balisés de substrats permissifs facilitant la croissance (Doherty et Walsh, 1994 ; Grenningloh et Goodman, 1992), qui peuvent être formés par des faisceaux d'axones préexistants (Van Vactor, 1998). Les cônes de croissance sont alors capables de distinguer les différents faisceaux d'axones et de sélectionner certains d'entre eux pour se laisser guider. Ces couloirs sont d'autre part délimités par des facteurs répulsifs contribuant à limiter la progression de ces axones hors de leur voie de projection normale (Keynes et Stern, 1984 ; Oakley et Tosney, 1993 ; Wizenmann et coll., 1993). Ces processus sont essentiels à la formation de commissures telles que le corps calleux et le chiasma optique. En effet, les axones commissuraux sont, comme nous le verrons, canalisés à travers la ligne médiane par la mise en jeu de signaux de guidage locaux.

2.2.2 Guidage par des signaux diffusibles : le chimiotropisme

2.2.2.1 Caractérisation *in vitro*

Près d'un siècle après que Ramón y Cajal ait proposé l'existence de facteurs chimio-attractifs, Gundersen et Barrett ont obtenu les premiers résultats semblant confirmer cette hypothèse. Lorsqu'une pipette contenant du NGF (« Nerve Growth Factor ») est placée à proximité de l'extrémité d'axones de neurones originaires des ganglions sensoriels, leur cône de croissance s'oriente vers cette source (Gundersen et Barrett, 1979). Il a été alors proposé que le NGF pourrait être capable d'attirer la croissance axonale à distance. Un système de culture d'explants au sein d'une matrice de collagène a été ensuite mis au point (Fig.10). Ce substrat est très favorable à la croissance axonale et permet l'établissement de gradients de facteurs solubles. Il a été démontré grâce à ce système que la croissance de certains axones pouvait être stimulée ou attirée par des facteurs chimio-attractifs sécrétés par certaines régions du

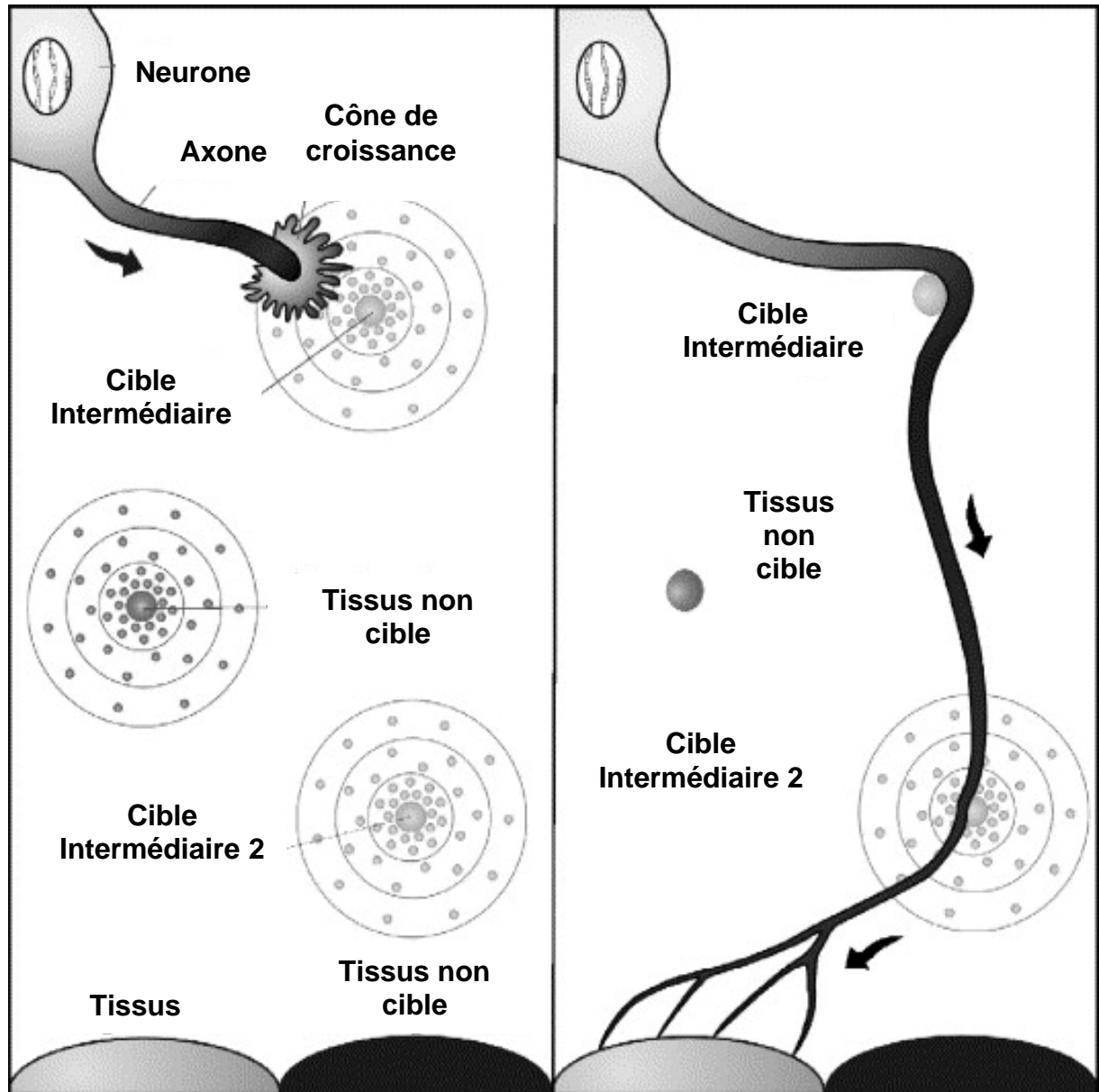


Figure 11: Guidage axonal sous l'action de cibles cellulaires intermédiaires

Représentation schématique des processus pouvant intervenir dans l'établissement des projections axonales *in vivo*. Un axone en croissance va rentrer au contact de cibles intermédiaires qui le guident jusqu'à sa cible. L'action de ces cibles intermédiaires met notamment en jeu la sécrétion de facteurs chimio-attractifs (gris). D'autres tissus repoussent cet axone à distance en sécrétant des facteurs chimio-répulsifs (noir). De plus, des facteurs de guidage par contact interviennent dans le guidage local de l'axone lui permettant de reconnaître son tissu cible. (Adapté de Barallobre et coll. 2005).

système nerveux. Lumsden et Barrett ont tout d'abord démontré que la croissance d'axones issus d'explants de ganglions trijumeaux est stimulée spécifiquement par leur tissu cible *in vitro* (Lumsden et Davies, 1983 ; Lumsden et Davies, 1986). Les cellules de la plaque du plancher de la moelle épinière ventrale sécrètent également un ou plusieurs facteurs capables d'orienter sélectivement la croissance des axones commissuraux (Fig.10 ; Placzek et coll., 1990 ; Tessier-Lavigne et coll., 1988). De même, le pont produit un facteur capable d'attirer les axones des neurones corticaux et de favoriser la formation de branches collatérales (Sato et coll., 1994 ; O'leary et coll., 1991 ; Heffner et coll., 1990). Des axones donnés sont donc attirés par des tissus formant des cibles intermédiaires ou finales à leur projection *in vivo*.

Ces expériences de co-cultures en collagène ont également permis de révéler l'existence de molécules secrétées inhibitrices ou répulsives. La notion de chimio-répulsion a alors été introduite (Pini, 1993 ; Fitzgerald et coll., 1993). Par exemple, les axones du tractus olfactif latéral sont repoussés par un facteur sécrété par le septum, territoire médian qu'ils évitent au cours de leur croissance (Pini, 1993). Par ailleurs, les axones sensoriels issus des ganglions rachidiens qui projettent dans la partie dorsale de la moelle épinière sont repoussés par un facteur répulsif présent dans partie ventrale de la moelle (Fig.10 ; Fitzgerald et coll., 1993).

2.2.2.2 Fonction de guidage de cibles intermédiaires *in vivo*

L'existence de cellules présentes le long des voies de projections et influençant la navigation des axones a été proposée pour la première fois par Bate. Il avait observé chez la larve de sauterelle, que les axones sensoriels contactent toujours des cellules qui balisent leur trajectoire (Bate, 1976) et la divisent en plusieurs segments successifs. Chez les invertébrés comme chez les vertébrés, ces cibles intermédiaires sont formées de groupes de cellules (parfois une seule). Leur ablation perturbe le comportement des axones qui les contactent normalement et qui se mettent alors à commettre des erreurs de guidage (Bate, 1976 ; Ho et coll., 1983 ; Keshishian et Bentley, 1983 ; Klose et Bentley, 1989). Ces cibles intermédiaires font office de bornes de guidage (« guidepost ») en donnant une information directionnelle aux cônes de croissance en développement (Fig.11 ; pour revue Palka et coll., 1992 ; Stoeckli et Landmesser, 1998 ; Tessier-Lavigne et Goodman, 1996). Leur action met en jeu la sécrétion de facteurs de guidage diffusibles. Grâce à des facteurs chimio-attractifs, elles vont d'abord attirer spécifiquement certains axones en projection. Pour progresser, le cône de croissance doit ensuite perdre toute sensibilité à l'action attractive exercée par la cible atteinte. Il est alors éventuellement guidé vers sa prochaine cible sous l'effet de facteurs chimio-répulsifs sécrétés par la première. L'influence répulsive d'une cible peut également agir en permanence sur certains axones qui doivent l'éviter au cours de leur projection. Cette action contribue alors à les guider à distance vers leur destination finale.

Un cône de croissance s'approchant d'une cible intermédiaire va ralentir sa croissance qui devient plus erratique (Stirling et Dunlop, 1995) et augmente son activité transcriptionnelle (Condrón, 2002). Sa morphologie se complexifie, ce qui se traduit notamment par l'augmentation du nombre de filopodes qui lui permettent de mieux sonder l'environnement (Stirling et Dunlop, 1995). Ces cibles constituent également un point de décision au niveau duquel les axones vont choisir quel segment emprunter par la suite. Différents cônes de croissance peuvent alors effectuer des choix de guidage différents. Cette décision peut faire intervenir des facteurs moléculaires locaux, présents à la surface des cibles intermédiaires contactées. Chez les vertébrés, le chiasma optique constitue par exemple une zone où les axones rétiniens doivent décider s'ils poursuivent leur trajectoire de façon ipsi ou controlatérale. *In vitro*, les cellules chiasmiques présentes au niveau de la ligne médiane repoussent par contact les axones rétiniens à croissance ipsilatérale d'embryons de souris (Wizenmann et coll., 1993). Je reviendrai par la suite sur l'identité de ces facteurs de guidage.

Enfin, une cible intermédiaire peut être la source de facteurs trophiques nécessaires à la survie des axones avant de la contacter (Flanagan, 1999 ; Wang et Tessier-Lavigne, 1999). Ce processus va permettre l'élimination d'axones qui, ayant commis des erreurs de guidage, n'atteignent pas cette cible.

2.2.2.3 La plaque du plancher, un exemple de cible intermédiaire

Chez les vertébrés, les structures cellulaires médianes agissant lors du guidage des projections commissurales sont variées (Silver, 1993 ; Colamarino et Tessier-Lavigne, 1995b). Dans la région du système nerveux la plus postérieure allant du diencephale à l'extrémité caudale de la moelle épinière, la plaque du plancher et la plaque du toit forment respectivement les lignes médianes ventrale et dorsale. La plaque du plancher est constituée par un groupe de cellules épithéliales très allongées (Kingsbury, 1930 ; Bovolenta et Dodd, 1990 ; Colamarino et Tessier-Lavigne, 1995b) formant une barrière que les axones commissuraux doivent franchir. Celle-ci agit comme une cible intermédiaire pour de nombreuses populations axonales, qui la traversent à tous les niveaux se son axe antéro-postérieur. La fonction de cette structure médiane dans le contrôle du guidage axonal avait déjà été proposé par Ramón y Cajal en 1909, puis par plusieurs études ultérieures (Cajal, 1909 ; Kingsbury, 1930 ; Jessell et coll., 1989). Des expériences de co-cultures ont montré que la plaque du plancher secrète des facteurs chimio-attractifs diffusibles agissant spécifiquement sur les axones commissuraux de la moelle épinière (Fig.10 ; Tessier-Lavigne et coll., 1988 ; Placzek et coll., 1990). Cette fonction a été confirmée par plusieurs approches. En culture organotypique, si on pratique un retournement dorso-ventral d'une partie de la moelle épinière, les axones commissuraux orientent leur croissance dorsalement vers la plaque du plancher ectopique (Yaginuma et Oppenheim, 1991). Par

ailleurs, chez des animaux dépourvus de plaque du plancher comme les poissons zèbres *cyclops* (porteur d'une mutation zygotique létale *cyc-1(b16)*), la trajectoire adoptée par ces axones commissuraux est fortement perturbée (Hatta et coll., 1991 ; Bernhardt et coll., 1992). De plus, chez les souris mutantes « Danforth's short tail » qui ont la particularité de ne posséder une plaque du plancher que dans la partie antérieure de la moelle épinière, les axones commissuraux des régions plus postérieures ont alors tendance à s'orienter antérieurement (Bovolenta et Dodd, 1991). Il a été ensuite démontré que l'action attractive de la plaque du plancher s'exerce sur de nombreuses populations d'axones commissuraux du métencéphale et du mésencéphale (Shirasaki et coll., 1995 ; Tamada et coll., 1995).

La plaque du plancher a également une fonction essentielle dans le guidage des axones qui ne doivent pas la franchir. En son absence, chez les animaux *cyclops* plusieurs populations d'axones à projection ipsilatérale de la moelle épinière (Bernhardt et coll., 1992) et du tronc cérébral (Hatta, 1992) croisent anormalement la ligne médiane. L'hypothèse de l'intervention de facteurs chimio-répulsifs sécrétés par la ligne médiane est proposée après la découverte de leur implication dans d'autres systèmes neuronaux (Pini, 1993). Celle-ci a été rapidement confirmée. En effet, les axones sensoriels issus des ganglions rachidiens qui projettent dans la partie dorsale de la moelle épinière sont repoussés par un facteur répulsif présent dans la partie ventrale de la plaque du plancher (Fig.10 ; Fitzgerald et coll., 1993). De plus dans le tronc cérébral, la plaque du plancher repousse activement les axones de plusieurs populations neuronales à projections ipsilatérales, comme les axones issus du noyau trochléaire (IV) et ceux formant la commissure postérieure. Ces axones projettent ainsi dorsalement et décussent au niveau de la plaque du toit (Colamarino et Tessier-Lavigne, 1995a ; Shirasaki et coll., 1996).

2.3 Découverte des différentes familles de molécules de guidage

Depuis plusieurs années de nombreuses familles de molécules de guidage axonal ont été découvertes. En ce qui concerne leurs caractéristiques physiques et leurs propriétés biologiques, ces molécules sont d'une grande diversité. Elles agissent principalement en interaction avec des récepteurs membranaires présents à sa surface du cône de croissance. Cette association module les propriétés de ces récepteurs et leurs capacités à activer des voies de signalisations intracellulaires. Ceci induit des changements dans la dynamique et l'organisation du cytosquelette, ce qui a une influence directe sur l'orientation de la croissance axonale (Fig.7). Les molécules de guidage ont également une influence sur les capacités d'adhérence du cône de croissance. Des interactions adhésives locales, liant le substrat cellulaire au cytosquelette, confèrent les forces de traction nécessaires à son mouvement (pour revue Gordon-Weeks et Fischer, 2000 ; Gordon-Weeks, 2004).

La réponse axonale à l'action des facteurs de guidage peut être variée (revue Maskery et Shinbrot, 2005). En effet, ils peuvent agir directement sur le cône de croissance par un effet directionnel et/ou agir sur sa capacité et sa vitesse de croissance. Ils influencent alors principalement ses capacités d'adhérence et sa dynamique membranaire, en entraînant une extension ou au contraire une rétraction des filopodes et des lamellipodes (Oakley et Tosney, 1993 ; O'connor et coll., 1990 ; Steketee et Tosney, 1999 ; Polinsky et coll., 2000). Une molécule de guidage disposée en gradient va pouvoir exercer son action de façon asymétrique sur les différents domaines du cône de croissance et ainsi modifier son orientation (Fig.7). La réponse à un facteur répulsif peut aussi varier d'un simple effet inhibiteur de croissance, à un effet dit de collapse qui correspond à l'effondrement et la rétraction de cette extrémité guide. D'autre part, ces molécules agissent sur les propriétés de fasciculation (Hentschel et Van Ooyen, 1999) ou de branchement axonal (Yates et coll., 2001 ; Halloran et Kalil, 1994). Ce dernier processus consiste en l'émergence depuis le territoire axonal d'un nouveau prolongement secondaire s'allongeant indépendamment. La rétraction de la branche axonale principale peut alors permettre de complètement modifier la trajectoire de projection (Yates et coll., 2001 ; Kalil et coll., 2000).

Les effets des molécules de guidage axonal ont été initialement classés en quatre grands groupes. Chacune d'elle était supposée avoir une action unique attractive ou répulsive et pouvoir agir à distance ou par contact en fonction de sa nature sécrétée ou membranaire (pour revue, Tessier-Lavigne et Goodman, 1996 ; Maskery et Shinbrot, 2005). Cependant, cette classification paraît aujourd'hui trop simpliste. D'une part, nous savons qu'un même facteur peut déclencher des réponses différentes, voire opposées, sur des populations neuronales distinctes ou encore sur les mêmes neurones à différentes étapes de leur développement. D'autre part, des protéines sécrétées peuvent interagir avec certains facteurs qui les séquestrent à la membrane et ainsi agir par contact. A l'inverse, certains ligands membranaires peuvent être clivés, ce qui génère une molécule diffusible.

Chez les vertébrés, l'identification de facteurs impliqués dans les effets de guidage caractérisés *in vitro* a été rendue possible grâce à l'amélioration de techniques de purification biochimique et de biologie moléculaire. D'autres facteurs ont également été identifiés sur la base d'homologies de séquence avec les facteurs de guidage précédemment découverts chez les invertébrés. En effet, la plupart de ces molécules de guidage ont été conservées au cours de l'évolution. Enfin, plusieurs familles de molécules déjà connues pour exercer des fonctions variées au cours du développement ont également la capacité de diriger la migration neuronale et/ou la croissance axonale. Tel est le cas :

- De facteurs de croissance de type HGF/SF (Hépatocyte growth factor/Scatter factor) ou le FGF (Fibroblaste growth factor ; Stoker et coll., 1987 ; Ebens et coll., 1996 ; Caton et

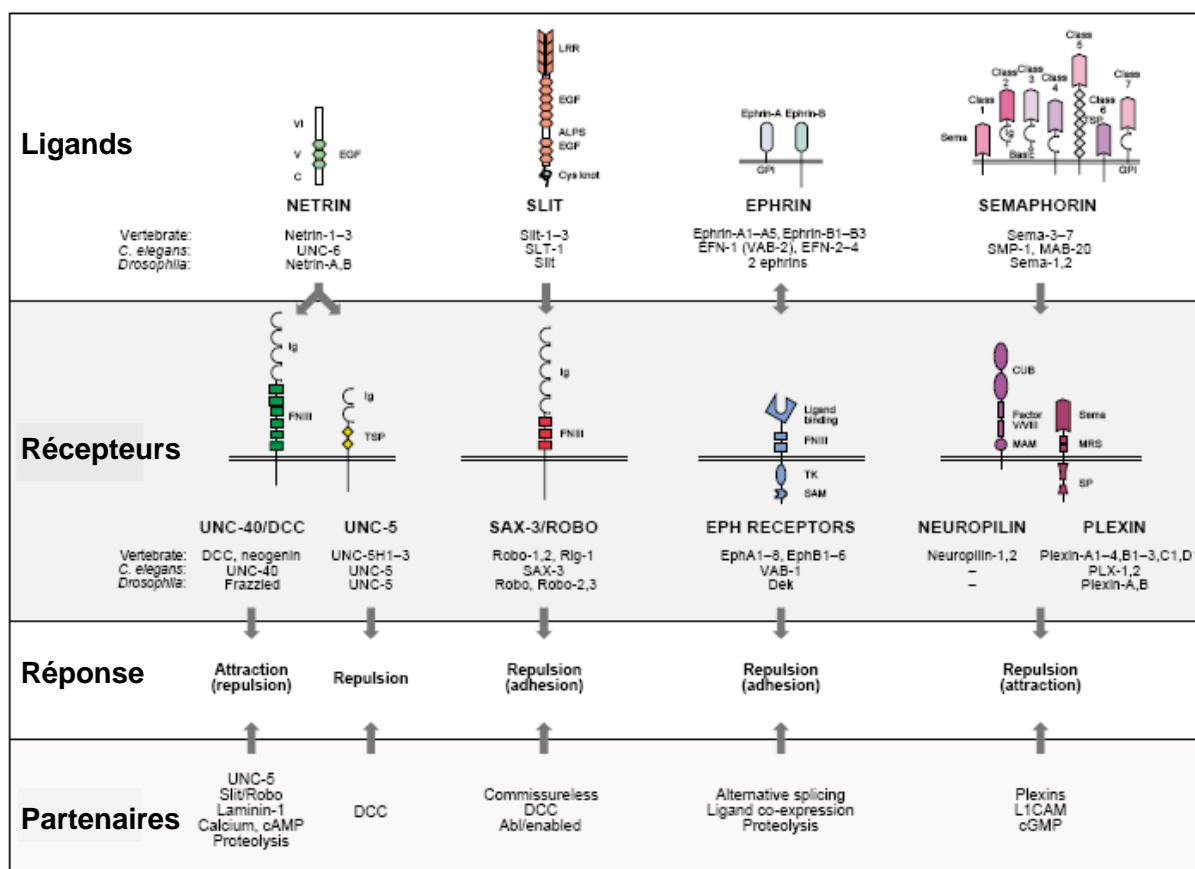


Figure 12: Les quatre principales familles de molécules de guidage et de leurs récepteurs.

Ce tableau indique (de haut en bas): le nom de ces différentes familles, les dénominations spécifiques à chaque espèce, les réponses neuronales typiques et alternatives (entre parenthèse) et les facteurs modifiant leur signalisation.

ALPS, domaine agrine-laminine-perlecan-Slit; C, netrine C terminus; CUB, domaine C1/Uegf/BMP1; DCC, deleted in colorectal cancer; EGF, epidermal growth factor; FNIII, domaine fibronectine type III; GPI, ancrage glycosylphosphatidyl-inositol; Ig, domaine immunoglobuline; LRR, répétition riche en leucine; MAM, meprin/A5 antigen motif; MRS, Met tyrosine kinase-related sequence; RK, domaine basic arginine/lysine-rich; SAM, sterile alpha motif; SP, 'sex and plexins' domain; TK, domaine tyrosine kinase; TSP, domaine thrombospondin; VI and V, homologues aux domaines VI and V des laminine.

(Adapté de Yu et coll. 2001).

coll., 2000 ; Mcfarlane et coll., 1995). De neurotrophines telles que le BDNF (Brain derived neurotrophic factor), le NGF (Nerve growth factor) ou NT3 et NT4 (Neurotrophine 3 et 4 ; Gundersen et Barrett, 1979 ; Aloe et Levi-Montalcini, 1979 ; Borghesani et coll., 2002 ; Schwartz et coll., 1998 ; O'connor et Tessier-Lavigne, 1999 ; Behar et coll., 1997).

- De molécules d'adhérence telles que les IgCAMs (Immunoglobulin-domain cell adhesion molecule ; Fields et Itoh, 1996 ; Walsh et Doherty, 1997 ; Rutishauser, 2000 ; pour revue Maness et Schachner, 2007)
- De morphogènes (pour revue Bovolenta et Marti, 2005) tels que Shh (Sonic hedgehog ; Charron et Tessier-Lavigne, 2005 ; Bourikas et coll., 2005), les BMPs (Bone morphogenetic Protein ; Augsburger et coll., 1999 ; Trousse et coll., 2001) et les Wnts (Lyuksyutova et coll., 2003 ; Yoshikawa et coll., 2003).
- De facteurs non protéiques tels que le LPA (Lysophosphatidic acid ; Jalink et coll., 1993 ; Yuan et coll., 2003a) ou des neurotransmetteurs comme l'Acétylcholine (Zheng et coll., 1994), le Gaba (acide gamma-amino butyrique ; Bouzigues et coll., 2007) ou les Endocannabinoïdes (Berghuis et coll., 2007).
- De facteurs de transcription tels que l'homéoprotéine Engrailed2 (Brunet et coll., 2005, pour revue Brunet et coll., 2007).

Nous verrons que plusieurs de ces systèmes de guidage non conventionnels peuvent intervenir dans la mise en place des projections axonales commissurales. D'autre part, quatre autres familles de guidage ont été identifiées pour leurs fonctions de guidage axonal (Fig.12) :

- Les Slits et leurs récepteurs Robos (Seeger et coll., 1993 ; Kidd et coll., 1998a ; Kidd et coll., 1999 ; Brose et coll., 1999 ; Li et coll., 1999 ; pour revue Brose et Tessier-Lavigne, 2000).
- Les Nétrines et leurs récepteurs DCC et UNC5 (Hedgecock et coll., 1990 ; Serafini et coll., 1994 ; Keino-Masu et coll., 1996 ; pour revue Barallobre et coll., 2005).
- Les Ephrines et leurs récepteurs Ephs (Cheng et coll., 1995 ; Drescher et coll., 1995, pour revue Klein, 2004).
- Les Sémaphorines et leurs récepteurs Neuropilines et Plexines (Luo et coll., 1993 ; Chen et coll., 1997 ; He et Tessier-Lavigne, 1997 ; Kolodkin et Ginty, 1997 ; Winberg et coll., 1998 ; Takahashi et coll., 1999 ; Tamagnone et coll., 1999 ; pour revue Fujisawa, 2004).

Les Slits et la Nétrine ont été initialement caractérisés pour leur implication dans la mise en place des projections commissurales. Je détaillerai plus loin l'historique de la découverte du système Slit/Robo étudié durant ma thèse. Je préciserai uniquement ici que les Slits exprimés dans la plaque du plancher et le septum sont en partie responsables de l'action chimio-répulsive exercée par ces régions médianes du système nerveux (Fig.10). J'aimerais pour

l'instant introduire brièvement la Nétrine, autre facteur chimiotropique essentiel à l'attraction neuronale ou axonale vers la ligne médiane.

2.4 Présentation de la Nétrine et de ces récepteurs

2.4.1 Découverte de la Nétrine

Des expériences visant à purifier biochimiquement le facteur stimulant la croissance des axones commissuraux de la moelle épinière ont mené à l'identification de la Nétrine1 et la Nétrine2 chez l'embryon de poulet (Kennedy et coll., 1994 ; Serafini et coll., 1994). Ces facteurs sont exprimés dans la plaque du plancher. Il a été proposé que ces deux protéines participent à l'attraction des axones commissuraux, fonction qui est suggérée par l'étymologie du nom Nétrine qui vient du mot sanskrit « netr » qui signifie « celui qui guide ». Plusieurs homologues de la Nétrine sont présents chez les mammifères, mais aucun homologue de la Nétrine2 n'a été identifié. Il est apparu qu'au cours de 600 millions d'années d'évolution, la Nétrine avait gardé la même fonction de guidage. En effet, des similarités de séquence avec le gène *unc6* de Nématode ont suggéré l'existence d'une famille de molécules hautement conservées (Kennedy et coll., 1994). Le gène *unc6* avait été précédemment identifié lors de cribles par mutagenèse recherchant des gènes dont la mutation affecte la locomotion du nématode (Brenner, 1974). *Unc6* est apparu par la suite intervenir dans le contrôle de la croissance axonale circumférentielle et le franchissement de la ligne médiane chez cette espèce (Hedgecock et coll., 1990 ; Ishii et coll., 1992).

La Nétrine a été également impliquée dans la migration de nombreuses populations neuronales chez les vertébrés (Alcantara et coll., 2000 ; Bloch-Gallego et coll., 1999 ; Deiner et Sretavan, 1999 ; Schwarting et coll., 2001 ; Murase et Horwitz, 2002 ; Serafini et coll., 1996). Son effet sur les neurones à migration tangentielle dépend de la population neuronale considérée. La Nétrine1 attire les neurones précérébelleux qui migrent dorso-ventralement et croisent la ligne médiane (Yee et coll., 1999 ; Serafini et coll., 1996 ; Bloch-Gallego et coll., 1999). A l'inverse, elle repousse les neurones à migration dorsale formant la couche des grains externes (Serafini et coll., 1996 ; Alcantara et coll., 2000).

2.4.2 Les récepteurs à la Nétrine

Avant même le clonage de la Nétrine1 chez les vertébrés, les gènes *unc5* et *unc40* étaient impliqués dans le guidage d'axones qui projettent vers et à l'opposé des sources de *Unc6* (Brenner, 1974 ; Hedgecock et coll., 1990). *Unc40* et son homologue *frazzled* chez la drosophile ont été clonés et identifiés comme codant des protéines transmembranaires. Leur action est nécessaire aux axones qui croissent vers les sources de Nétrine (Chan et coll., 1996 ; Kolodziej et coll., 1996) suggérant que les produits de ces gènes agissent

comme récepteurs attractifs à la Nétrine. Un homologue de *unc40* a été ensuite identifié chez la souris. La délétion de ce gène *DCC* (*Deleted in colorectal cancer*) est associée à certains cancers colorectaux (Keino-Masu et coll., 1996), *DCC* semblait également impliqué dans le guidage des axones commissuraux de la moelle épinière. L'étude des souris *DCC*^{-/-} a révélé des anomalies de guidage commissural similaires à celles observées chez les souris *nétrine1*^{-/-} (Fazeli et coll., 1997), sur lesquelles je reviendrai par la suite. Le récepteur A2b à l'adénosine a été proposé comme co-récepteur à la Nétrine1 en association avec *DCC* (Corset et coll., 2000).

Une seconde famille de récepteurs à la Nétrine est définie sur les bases d'homologies de séquences avec *unc5* du nématode *Caenorhabditis elegans* (Leung-Hagesteijn et coll., 1992). Jusqu'à présent, quatre gènes ont ainsi été identifiés chez les rongeurs : *unc5h1* et *unc5h2* (Leonardo et coll., 1997), *rcm/unc5h3* (Ackerman et coll., 1997) et *unc5h4* (Engelkamp, 2002), ainsi qu'un gène chez la drosophile (*unc5* ; Keleman et Dickson, 2001). Chez le Nématode, *unc5* est impliqué avec *unc40* dans le guidage des axones qui s'orientent vers les régions dorsales, à l'opposé des sources de *Unc6* (Hedgecock et coll., 1990 ; Hamelin et coll., 1993 ; Colavita et Culotti, 1998). De même, l'expression de *Unc5h2* dans des axones de la moelle épinière de xénope qui expriment *DCC*, convertit l'attraction par un gradient de Nétrine1 en une répulsion (Hong et coll., 1999). Il a été proposé que l'interaction entre les domaines cytoplasmiques de *DCC* et *Unc5h2*, en réponse à une stimulation par la Nétrine1, permette de déclencher une signalisation répulsive. Cette vision est nuancée par la démonstration, chez la drosophile, que *Unc5* fonctionne indépendamment de *Frazzled* dans des processus répulsifs à courtes distances survenant à la ligne médiane (Keleman et Dickson, 2001).

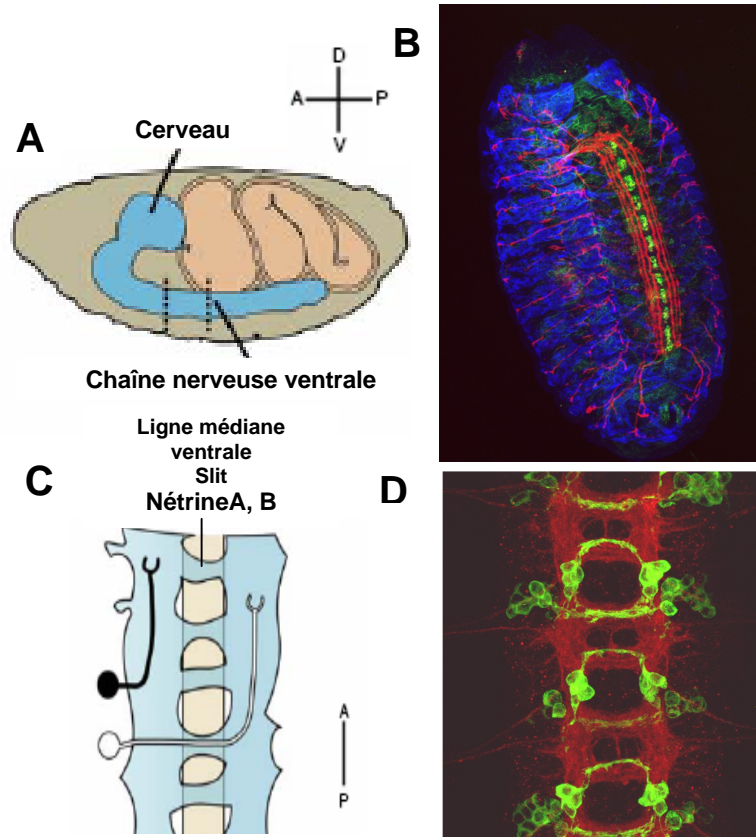


Figure 13: Organisation des projections axonales dans la chaîne neurale ventrale du système nerveux embryonnaire de drosophile

Schéma (A) et reconstruction en trois dimensions (B) d'un embryon de drosophile (stade 16): les cellules de la ligne médiane (ARNm fluorescent reconnaissant le message de Nétrine, en vert), un sous groupe d'interneurones et tous les neurones moteurs (anticorps dirigé contre la Fascicline II, en rouge), ainsi que les muscles (anticorps reconnaissant la Myosine, en bleu) sont visualisés simultanément à la surface ventrale d'un embryon. Représentation schématique de la chaîne neurale ventrale de l'embryon de drosophile (C). Les gènes *slits* et *nétrines* sont exprimés par les cellules de la ligne médiane. Les axones des neurones à projection ipsilatérale (en noir) ne franchissent pas la ligne médiane contrairement aux neurones commissuraux dont les axones ne croisent celle-ci qu'une seule fois pour contacter une cible située controlatéralement. Image confocale de la même région du système nerveux (D) permettant d'observer l'organisation bilatérale de celui-ci. Les axones projettent au sein de deux faisceaux longitudinaux localisés de part et d'autre de la ligne médiane et reliés par plusieurs commissures (en rouge). Les axones d'un sous-groupe d'interneurones (en vert) décussent de façon ordonnée au sein de chaque commissure en croisant leurs homologues controlatéraux.

A : antérieur, P: postérieur ; D: dorsal, V: ventral
(Adapté de Dickson et coll. 2006).

3 Fonctions du système de guidage Slit/Robo

3.1 Découverte de Slit et Robo pour leur implication dans le contrôle du croisement de la ligne médiane chez la drosophile

Des cribles par mutagenèse chez la drosophile ont permis d'identifier un grand nombre de gènes dont la fonction est essentielle durant le développement du système nerveux. La chaîne neurale d'embryon de drosophile est organisée autour de cellules gliales formant la ligne médiane. Les neurones projettent leurs axones au sein de deux larges faisceaux longitudinaux situés de part et d'autre celle-ci et reliés par des commissures. Les axones à croissance ipsilatérale suivent un faisceau latéral sans jamais croiser la ligne médiane alors que les axones à croissance controlatérale choisissent une commissure et croisent la ligne médiane une seule et unique fois (Fig.13). Dans les années 1980, les travaux dirigés par Goodman ont décrit précisément ces différentes populations neuronales et leurs projections, grâce au développement d'anticorps permettant de les marquer et visualiser spécifiquement (Patel et coll., 1987 ; Zinn et coll., 1988 ; Jacobs et Goodman, 1989a ; Jacobs et Goodman, 1989b ; Snow et coll., 1989). Ce système neuronal a donc pu être exploité dans la recherche de gènes dont la mutation affecte l'état des projections commissurales. Ces travaux ont mené à la découverte des molécules Slit et Robo et de leurs fonctions respectives.

3.1.1 Slit, facteur de guidage répulsif exprimé par les cellules de la ligne médiane

3.1.1.1 Identification et clonage de *slit* chez la drosophile

Le mutant *slit* a été identifié initialement chez la drosophile en 1984, lors d'un crible génétique recherchant des gènes impliqués dans l'organisation de la cuticule larvaire (Nusslein-Volhard et coll., 1984). L'ADNc de ce gène a ensuite été isolé lors d'un crible moléculaire visant à caractériser des gènes contenant des domaines EGF (Epithelial growth factor) répétés, ce qui a permis le clonage de *slit* (Rothberg et coll., 1988 ; Rothberg et coll., 1990). Slit est fortement exprimé par les cellules gliales de la ligne médiane (Fig.13). Chez le mutant déficient en *slit*, tous les axones y pénètrent anormalement, fasciculent parfois avec leurs homologues controlatéraux et croissent antérieurement. Ils ne peuvent pas ressortir de la ligne médiane (Fig.14 ; Rothberg et coll., 1990 ; Sonnenfeld et Jacobs, 1994 ; Kidd et coll., 1999). Ce phénotype est compensé si l'expression du gène *slit* est rétablie dans la ligne médiane (Battye et coll., 1999). Par ailleurs, la surexpression de *slit* dans tout le SNC mène à une diminution et une désorganisation des commissures. Les axones commissuraux anormalement defasciculés forment alors des projections latérales ectopiques (Battye et coll., 1999). L'ensemble de ces

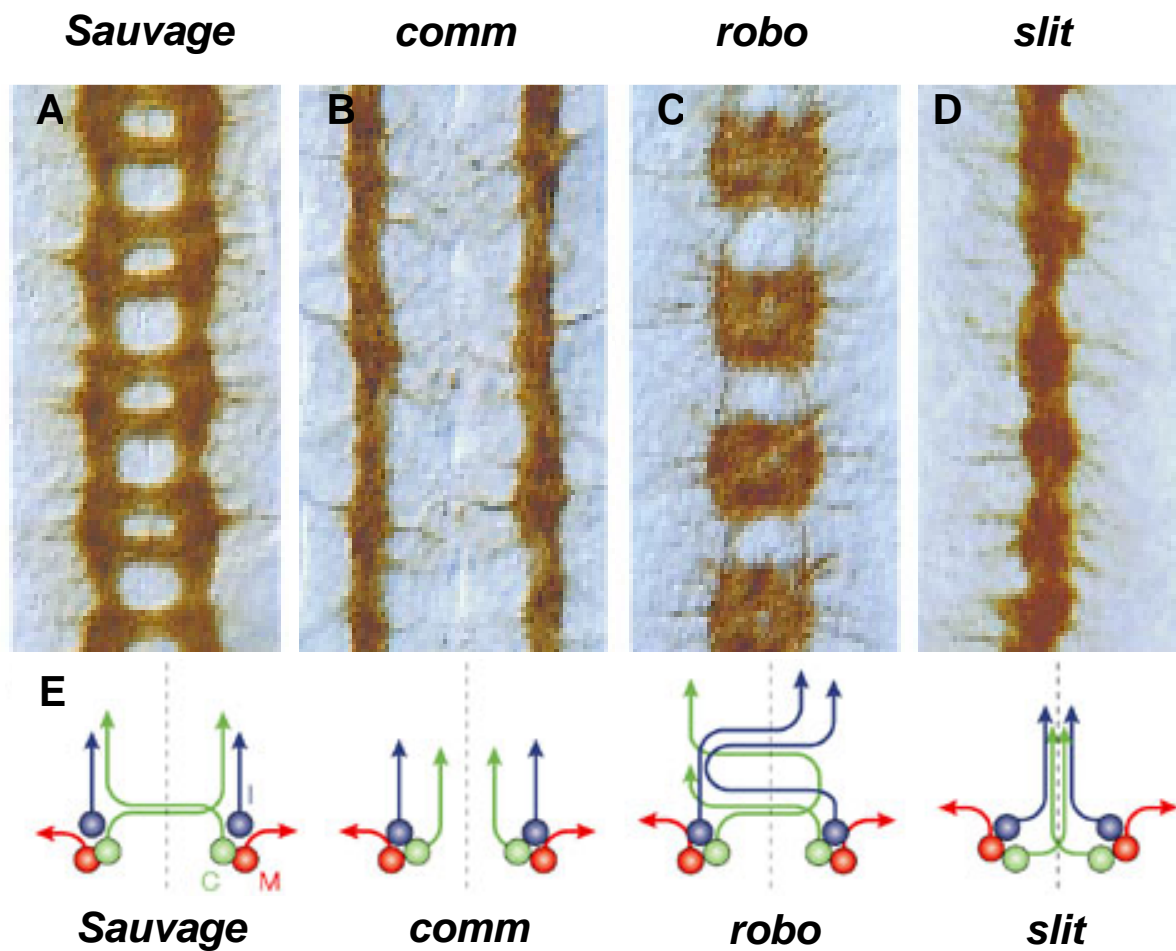


Figure 14: Défauts de guidage axonal à travers la ligne médiane observés chez les mutants *slit*, *robo* et *commisureless*

Images des projections axonales de la chaîne neurale (anticorps mAb BP102, antérieur vers le haut) d'embryons au stade 16 sauvages (A) et mutants pour les gènes *commisureless* (*comm*) (B), *robo* (C), *slit* (D). Schéma représentant les trajectoires des axones à projection ipsilatérale (bleu), commissuraux (vert) et moteurs (rouge) chez les embryons sauvages ou mutants (E). La projection des neurones moteurs qui s'étend vers la périphérie n'est jamais affectée. En ce qui concerne les axones des neurones commissuraux et de ceux à projection ipsilatérale: chez le mutant *slit*, ces axones rentrent tous dans la ligne médiane sans pouvoir la quitter ; chez le mutant *robo*, ils croisent la ligne médiane plusieurs fois en formant des boucles ; chez le mutant *comm*, aucun de ces axones ne traverse la ligne médiane. (Adapté de Kidd et coll. 1999; Araujo et coll. 2003)

données suggèrent que les Slits exprimés dans la ligne médiane contribuent fortement au guidage des projections axonales controlatérales et ipsilatérales par une action répulsive.

3.1.1.2 Les gènes *slits* au cours de l'évolution

Après sa découverte chez la drosophile (Nusslein-Volhard et coll., 1984 ; Rothberg et coll., 1990), un homologue du gène *slit* a été identifié chez *C.elegans* (Hao et coll., 2001). Ce gène n'est présent qu'en une seule copie dans ce phylum et son inactivation entraîne des défauts de croissance axonale sur l'axe dorso-ventral ou lors du croisement de la ligne médiane (Hao et coll., 2001).

Le gène *slit* possède également de nombreux homologues chez les vertébrés : les amphibiens (Li et coll., 1999), le poisson zèbre (Yeo et coll., 2001), les oiseaux (Holmes et Niswander, 2001 ; Vargesson et coll., 2001 ; Gilthorpe et coll., 2002) et les mammifères (Holmes et coll., 1998 ; Itoh et coll., 1998 ; Yuan et coll., 1999b ; Brose et coll., 1999 ; Li et coll., 1999). Chez ces derniers, au moins trois versions du gène *slit* sont présentes (*slit1*, *slit2* et *slit3*) et partagent environ 60% d'homologies. L'alignement des séquences génomiques des gènes *slits* de mammifères confirme la conservation des séquences consensus caractéristiques de domaines Leucine Rich Repeats (LRRs). Chez le poisson zèbre, deux isoformes de *slit1* (a et b) sont présentes et issues d'une duplication du même gène (Hutson et coll., 2003). Des transcrits alternatifs ont été caractérisés pour le gène *slit* de drosophile et les gènes humains *slit1* (Tanno et coll., 2004 ; Little et coll., 2002), *slit2* et *slit3* (Itoh et coll., 1998).

Dès leur identification chez les vertébrés, plusieurs indices ont suggéré que l'action des Slits était conservée :

- Tout au long du système nerveux en développement, l'expression des gènes *slits* est concentrée au niveau de cellules présentes sur la ligne médiane, comme chez la drosophile.
- En 1999, trois laboratoires dont le nôtre ont montré indépendamment que les protéines codées par les gènes *slits* de vertébrés ou de drosophile sont sécrétées et exercent une activité chimio-répulsive sur la croissance axonale (Li et coll., 1999 ; Brose et coll., 1999 ; Nguyen Ba-Charvet et coll., 1999).
- L'importance des gènes *slits* a ensuite été vérifiée par l'analyse des conséquences de leur inactivation chez la souris (Long et coll., 2004 ; Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2002 ; Plump et coll., 2002 ; Bagri et coll., 2002). Ainsi, les souris déficientes pour un, deux ou tous les gènes *slits* présentent des défauts plus ou moins prononcés au sein de plusieurs systèmes commissuraux du télencéphale et de la moelle épinière. En l'absence des trois gènes *slits*, des axones commissuraux se retrouvent bloqués dans la ligne médiane de la moelle épinière (Long et coll., 2004). Ce phénotype est comparable à celui décrit chez la

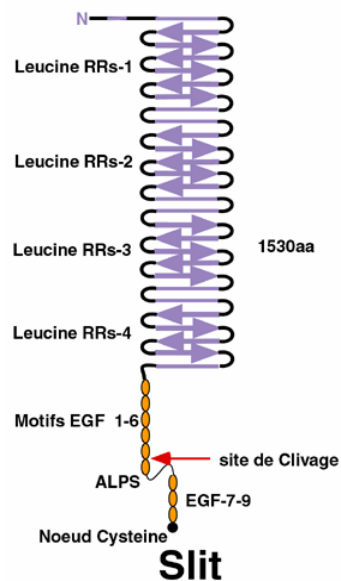


Figure 15: Structure des molécules Slits

Le gène *slit* code une protéine sécrétée dans la matrice extracellulaire. Sa structure (A) est constituée de quatre domaines riches en leucines (LRRs), suivis de sept à neuf domaines EGF (Epidermal Growth Factor) interrompus par un site de clivage et un domaine globulaire ALPS (agrine-laminine-perlecan-slit) / LNS (laminine-neurexine-slit) / LG (laminine-G like). Le domaine C-terminal est constitué d'un domaine riche en cystéines.

drosophile, ce qui confirme que la fonction des Slits a été conservée au cours de l'évolution.

3.1.1.3 Les protéines Slits

➤ Structure protéique et partenaires d'interactions

Le gène *slit* code une glycoprotéine d'environ 190kD (1500 acides aminés) retrouvée dans la matrice extracellulaire (Rothberg et coll., 1990 ; Rothberg et coll., 1988). L'absence de séquence hydrophobe et la présence d'un peptide signal indiquent que Slit est une protéine sécrétée. En culture de cellules transfectées, des protéines Slits sont bien retrouvées dans le milieu extracellulaire et sont particulièrement enrichies à la membrane cellulaire (Brose et coll., 1999). La structure des Slits est hautement conservée au cours de l'évolution ((Fig.15 ; Rothberg et Artavanis-Tsakonas, 1992 ; Itoh et coll., 1998 ; Hu, 1999 ; Li et coll., 1999). Cette protéine présente différents domaines qui se succèdent depuis la partie N-terminale vers la partie C-terminale :

- Quatre domaines répétés riches en leucines (LRRs), reliés par les liaisons courtes contenant des ponts disulfures qui confèrent un arrangement compact à cette région (Howitt et coll., 2004).
- Sept à neuf motifs EGF (« Epidemial Growth Factor ») en fonction de l'espèce considérée. Slit ne contient que sept motifs EGF chez la drosophile et le nématode mais en possède neuf chez les vertébrés (Brose et coll., 1999). Entre ces motifs EGFs se trouvent un site de clivage ainsi qu'un domaine globulaire ALPS (« agrine-laminine-perlecan-slit »)/ LNS (laminine- neurexine -slit)/ LG (laminine-G like) qui serait impliqué dans des interactions entre protéines (Rothberg et Artavanis-Tsakonas, 1992).
- Un domaine C-terminal riche en cystéines de fonction inconnue.

Les Slits peuvent lier d'autres protéines que les récepteurs Robos, telles que la Laminine et la Nétrine (Brose et coll., 1999). Elles vont également interagir avec le Glypican1, un membre de la famille des protéoglycanes membranaires à héparanes sulfates, caractérisé par la présence d'un ancrage lipidique (Ronca et coll., 2001 ; Liang et coll., 1999). Cette association augmente l'affinité de Slit pour son récepteur et favorise ainsi son activité répulsive (cf. discussion ; Hu, 2001).

➤ Importance fonctionnelle du clivage des protéines Slits

In vitro, la plupart des protéines Slits d'invertébrés et de vertébrés peuvent être clivées en deux fragments : un premier de 140 kD (fragment N-terminal) et un second de 55-60 kD (fragment C-terminal). Un site de clivage unique localisé à la suite du cinquième domaine EGF est conservé chez toutes les espèces (Brose et coll., 1999 ; Wang et coll., 1999). Ce clivage survient *in vivo*,

puisque deux isoformes de Slit2 ont été purifiés à partir d'extraits de cerveaux de mammifères : la protéine entière et son fragment N-terminal (Niclou et coll., 2000 ; Wang et coll., 1999). Néanmoins, la protéase responsable de ce clivage et sa fonction physiologique demeurent mal caractérisées (Brose et coll., 1999 ; Wang et coll., 1999). Des expériences d'interactions génétiques chez la drosophile ont suggéré que la métalloprotéase Kuzbanian (aussi appelée ADAM-10) pourrait interagir avec Slit et jouer un rôle dans son clivage (Schimmelpfeng et coll., 2001). Cependant, ceci n'a jamais été confirmé par des analyses biochimiques.

In vitro, les fragments protéolytiques des Slits ont des propriétés de diffusion et d'interaction distinctes, ce qui suggère des différences d'action *in vivo*. La petite région C-terminale (Slit-C) est plus diffusible alors que la région N-terminale (Slit-N) ou la protéine entière (Slit-E) restent associées et concentrées à la membrane (Brose et coll., 1999 ; Nguyen Ba-Charvet et coll., 1999 ; Nguyen Ba-Charvet et coll., 2001). Slit2-N stimule le branchement et l'expansion de collatérales d'axones des ganglions de la base. Cet effet est inhibé par la protéine Slit2 entière (Wang et coll., 1999 ; Nguyen Ba-Charvet et coll., 2001 ; Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2001). Le même fragment Slit2-N tout comme Slit2-E collapsent les cônes de croissance de neurones du bulbe olfactif (Nguyen Ba-Charvet et coll., 2001) et repoussent les précurseurs olfactifs en migration (Hu, 1999). Slit1-E et Slit1-N induisent le branchement des neurones corticaux, alors que seule la protéine entière les repousse (Whitford et coll., 2002). Ainsi, le fragment N-terminal retient seulement certaines activités biologiques de la protéine entière, tout en ayant parfois une action opposée. En revanche, le rôle du fragment C-terminal est moins évident. Des preuves indirectes suggèrent que la présence de ce fragment C-terminal régule en partie la diffusion des Slits (Hu, 1999). Il faut préciser que Slit-C présente une plus grande affinité de liaison avec le Glypican1, qui est susceptible d'influencer sa distribution extracellulaire (Liang et coll., 1999 ; Ronca et coll., 2001).

3.1.2 Les récepteurs membranaires Roundabouts (Robos)

3.1.2.1 Identification et clonage de *robo* chez la drosophile

Le gène *robo* (abréviation de « Roundabout » qui signifie rond-point) a été découvert chez la drosophile, au cours de cribles génétiques visant à identifier des mutations affectant les projections commissurales de la chaîne nerveuse ventrale (Seeger et coll., 1993). Ce nom fait référence aux défauts caractéristiques survenant en l'absence de ce gène : les axones commissuraux, qui ne décussent normalement qu'une seule fois, se mettent à louvoyer autour de la ligne médiane en adoptant une trajectoire circulaire et la croisent à nouveau (Fig.14 ; Kidd et coll., 1998a ; Seeger et coll., 1993). La projection des axones à croissance ipsilatérale est également altérée. En effet, ils croisent la ligne médiane et progressent parfois controlatéralement (Kidd et coll., 1998a ; Kidd et coll., 1998b ; Seeger et coll., 1993).

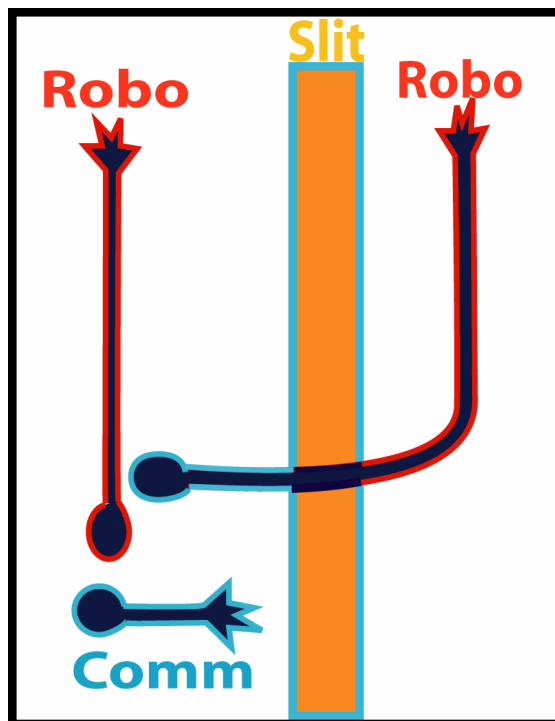


Figure 16: Dynamiques d'expressions opposées du récepteur Robo et du facteur Commissureless

Schéma représentant la localisation de Robo et Commissureless (Comm) à la surface des axones en croissance de la chaîne neurale de drosophile en développement. Le gène *slit* (orange) est exprimé par les cellules de la ligne médiane. Le récepteur Robo (en rouge) est en permanence exprimé à la surface des axones qui ne traversent pas la ligne médiane et des axones commissuraux qui viennent de croiser celle-ci. Robo est alors réparti tout au long du segment axonal post-commissural. La protéine Comm (bleu turquoise) a une distribution opposée, elle n'est exprimée qu'à la surface des neurones pré-commissuraux. Comm est également détectée à la surface des cellules de la ligne médiane.

Finalement, les commissures comptent un nombre anormalement élevé d'axones chez le mutant *robo*.

Le gène *robo* de drosophile a été cloné quelques années après sa découverte (Kidd et coll., 1998a). Il code un récepteur transmembranaire et semble agir principalement de façon cellulaire autonome. Robo est en permanence présent à la surface des axones à croissance ipsilatérale. En revanche, les axones commissuraux accumulent au niveau de leur cône de croissance un fort taux de Robos seulement après avoir franchi la ligne médiane. Cette protéine est ensuite répartie tout au long du segment axonal controlatéral (Fig.16 ; Kidd et coll., 1998a ; Kidd et coll., 1998b ; Rajagopalan et coll., 2000a ; Murray et Whittington, 1999).

La nature du ligand des récepteurs Robos n'était alors pas connue. Le phénotype du mutant *robo* et la localisation de ces récepteurs ne permettaient pas de déterminer si son ligand était un facteur attractif exprimé au niveau latéral ou un facteur répulsif exprimé au niveau de la ligne médiane.

Depuis, deux autres gènes *robo2* et *robo3* ont été identifiés chez la drosophile. Ils sont exprimés de façon plus restreinte que *robo* dans des populations neuronales distinctes mais chevauchantes. Les protéines Robo2 et Robo3 sont particulièrement enrichies à la surface des faisceaux d'axones longitudinaux et absentes des axones pré-commissuraux (Rajagopalan et coll., 2000b ; Simpson et coll., 2000a). Ces nouveaux gènes n'apparaissent pas essentiels au croisement de la ligne médiane, puisque les commissures apparaissent se former normalement chez les simples mutants *robo2* et *robo3* (Kidd et coll., 1998a ; Simpson et coll., 2000a ; Rajagopalan et coll., 2000b). Ceci a été remis en cause par une étude récemment publiée révélant la présence de légères anomalies de projections commissurales chez certains mutants *robo3* (Bhat et coll., 2007).

3.1.2.2 Les gènes *robos* au cours de l'évolution

Le gène *sax3* chez *C. elegans* fut d'abord désigné comme codant une protéine hautement similaire aux récepteurs Robos ayant une fonction durant le guidage axonal (Zallen et coll., 1998). Il est le seul orthologue du gène *robo* chez cette espèce.

Ces gènes sont également conservés chez les vertébrés, trois sont présents chez le poisson zèbre (Fricke et coll., 2001 ; Lee et coll., 2001) et le poulet (Vargesson et coll., 2001). Chez les mammifères, quatre gènes *robo1/dutt1*, *robo2*, *robo3/rig1* (Retinoid inductible gene 1) et *robo4/magic roundabout* ont été identifiés (Huminiacki et coll., 2002 ; Kidd et coll., 1998a ; Yuan et coll., 1999a). Malgré leurs noms similaires, *robo2* et *robo3* de drosophile ne sont pas les orthologues de *robo2* et *robo3* de vertébrés. Ces gènes dérivent de duplications indépendantes. *Robo3* a été identifié indépendamment lors d'un crible recherchant des gènes surexprimés chez

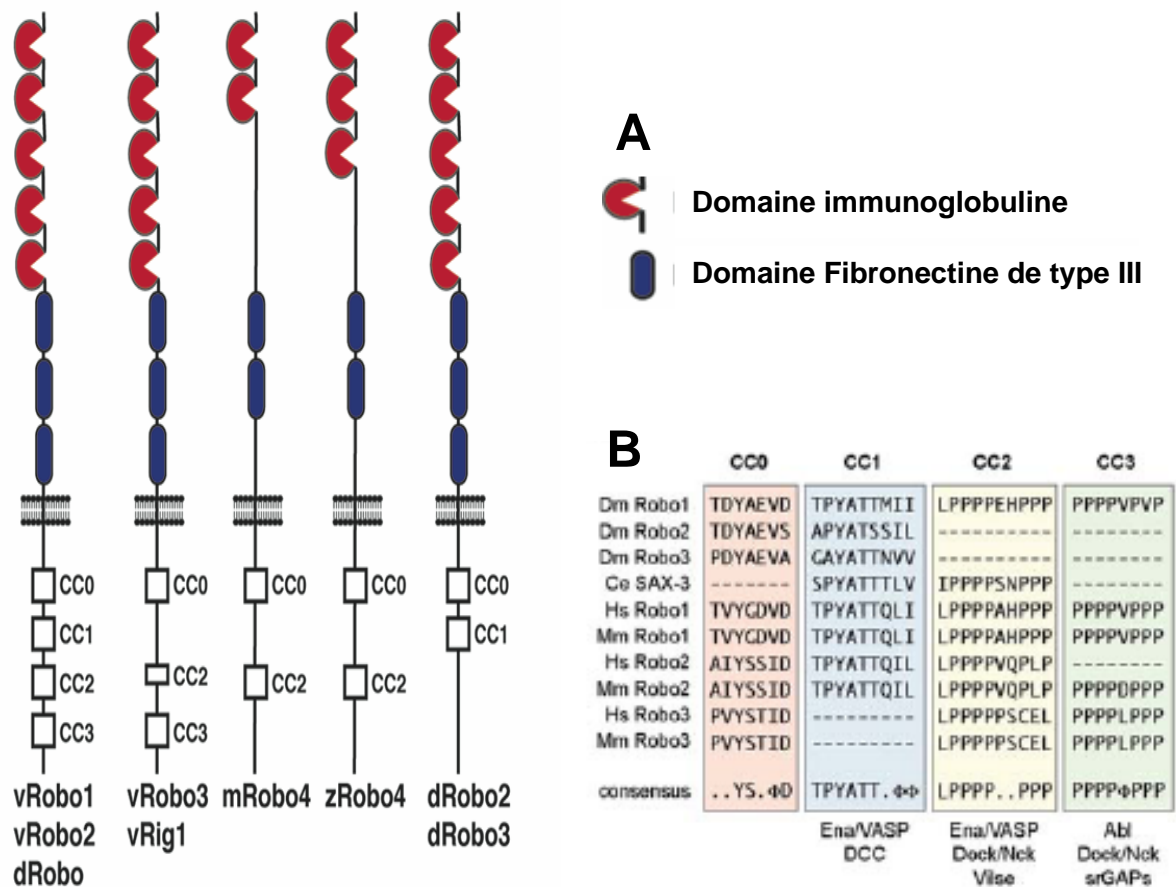


Figure 17: Structures des récepteurs Robos conservée au cours de l'évolution

Le gène *robo* code une protéine transmembranaire de la superfamille des Immunoglobulines (Ig). Sa structure de base (A, à gauche) est composée d'une région extracellulaire constituée de cinq domaines Ig et de trois domaines de type fibronectine de type 3 (FNIII), d'un unique domaine transmembranaire et d'un domaine intra-cellulaire contenant quatre domaines cytoplasmiques (CC). Ces domaines structuraux sont conservés bien qu'ils ne soient pas tous présents dans les homologues des protéines Robos identifiés chez les différentes espèces animales (A ; d: *Drosophila melanogaster*; v: vertébrés ; m: *Mus musculus* ; z: zebra fish).

L'alignement des séquences protéiques des motifs CCs retrouvés dans les protéines Robos connues (B) révèle l'existence de séquences consensus fortement conservées (Ag: *Anopheles gambiae*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Dr: *Danio rerio*; Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*). Ces motifs ont leurs propres capacités d'interaction avec plusieurs partenaires identifiés (B). CC0 n'a pas de partenaires connus. CC1 et CC2 interagissent avec les protéines Ena/Vasp (Bashaw et coll. 2000). La tyrosine kinase Abl lie CC3 et phosphoryle CC1 (Bashaw et coll. 2000). L'adaptateur Dock/Nck à domaines SR2/SR3 (domaines 2 et 3 d'homologie à src) lie CC2 et CC3 (Fan et coll. 2003). Les protéines Vilse/GAP (GAPs de la famille de Rho) et srGAPs lient respectivement CC2 et CC3 (Hu et coll. 2005, Lundstrom et al. 2004, Wong et coll. 2001). Le domaine CC3 peut interagir avec le motif P3 du récepteur DCC (Stein et coll. 2001)

(Adapté de Dickson et coll. 2006)

des souris déficientes pour le facteur *Rb* (Retinoblastoma susceptibility gene). La protéine Robo3 présente 40% d'homologie avec les récepteurs Robo1 et Robo2 (Yuan et coll., 1999a). Tous les gènes *robos*, à l'exception de *robo4*, sont largement exprimés dans le système nerveux central des mammifères en développement. Ils sont exprimés dans les neurones à projections axonale ipsi et controlatérale. Grâce à l'analyse des souris déficientes pour ces gènes, leur implication dans le guidage des axones commissuraux de la moelle épinière a été établie (Long et coll., 2004).

3.1.2.3 Description des récepteurs Robos

➤ Structure protéique et partenaires moléculaires

Les protéines Robos sont des récepteurs membranaires d'environ 1400 acides aminés qui appartiennent à la superfamille des Immunoglobulines. Elles ont un fort taux d'homologie avec les autres membres de cette famille dont la NCAM, L1 et DCC (Sundaresan et coll., 1998). Ces récepteurs ont une structure de base conservée (Fig.17) :

- Le domaine extracellulaire des protéines Robos est constitué d'une séquence peptidique signal, suivie de l'association caractéristique de cinq domaines immunoglobulines répétés (Ig) et de trois domaines fibronectines de type III (FN3). La protéine Robo4 de mammifère fait exception car elle ne possède que trois domaines FN3 et les deux premiers domaines Ig.
- Les récepteurs Robos possèdent un seul domaine transmembranaire.
- Leur domaine cytoplasmique n'a pas d'activité catalytique, il est très peu conservé mis à part des motifs nommés CC0, CC1, CC2 et CC3 (conserved cytoplasmic domain ; Kidd et coll., 1998a). Chez les mammifères, le récepteur Robo3 est dépourvu de CC2, alors que Robo4 ne possède que les motifs CC0 et CC3 (Fig.17). Toutefois, ce dernier récepteur a été assimilé à cette famille de molécules du fait de sa forte homologie de séquence avec Robo1 (Huminiacki et coll., 2002 ; Bedell et coll., 2005). Dans les deux premiers motifs CC0 et CC1, la présence d'une tyrosine suggère l'existence d'un site de phosphorylation. Les deux autres motifs sont constitués d'une succession de prolines séparées par un ou deux acides aminés.

La délétion de ce domaine intracellulaire inhibe la fonction des récepteurs Robos (Brose et coll., 1999). Par ailleurs, d'ingénieuses expériences réalisées chez la drosophile, consistant à intervertir les domaines intra-cytoplasmiques de Frazzled (récepteur responsable de l'activité attractive à la Nétrine) et Robo, démontrent qu'ils spécifient l'action répulsive ou attractive de ces récepteurs (Bashaw et Goodman, 1999 ; Seeger et Beattie, 1999). Chez des mutants possédant un récepteur chimérique Robo/Frazzled (domaine extracellulaire de Robo associé au domaine intracellulaire de Frazzled), les Slits de la ligne médiane deviennent attractifs et tous

les axones projettent vers celle-ci. A l'inverse, en présence d'un récepteur frazzled/Robo, la Nétrine devient répulsive ce qui entraîne une diminution de la taille des commissures (Bashaw et Goodman, 1999). Ceci s'explique par le fait que les motifs CC constituent des sites d'interaction avec des protéines cytoplasmiques ou membranaires, qui jouent un rôle dans la transduction du signal déclenché par ces récepteurs (Fig.17 ; Bashaw et coll., 2000 ; Kidd et coll., 1998a). Les différences existantes entre les domaines cytoplasmiques de ces récepteurs leur confèrent donc la capacité de recruter spécifiquement certains partenaires. Ils peuvent ainsi déclencher des réponses cellulaires distinctes.

➤ Autres caractéristiques fonctionnelles

L'analyse des propriétés d'adhérence des récepteurs Robos de mammifères a dévoilé leurs propriétés d'interactions homophiliques. Chez Robo1, cette propriété est perturbée si l'un des quatre domaines Ig ou tous les domaines FNIII sont délétés. Par des interactions hétérophiliques, cette protéine peut également interagir avec Robo2, Robo3 ou DCC. Robo1 et Robo3 peuvent aussi interagir avec la NCAM (Hivert et coll., 2002 ; Liu et coll., 2004 ; Camurri et coll., 2005). Dans des cultures de cellules de mammifères, Slit peut déclencher l'interaction des récepteurs Robos (de drosophile et mammifères) avec la molécule d'adhérence cellulaire N-Cadhérine, ce qui inhibe les propriétés d'adhérence de cette protéine (Rhee et coll., 2002 ; Rhee et coll., 2007).

Les gènes *robos* codent plusieurs isoformes, qui diffèrent par leurs profils d'expressions et/ou leurs propriétés d'interactions. Chez la souris comme chez l'homme, le locus du gène *robo1* possède un promoteur alternatif, ce qui permet la production de deux transcrits, Robo1 et Dutt1. Ils sont tous deux exprimés dans des populations cellulaires distinctes de la moelle épinière (Nural et coll., 2007). Deux isoformes de Robo2 (Robo2_tv1 ; Robo2_tv2) sont exprimées chez le poisson zèbre et le rat. Elles sont générées par épissage alternatif d'un exon CAE présent uniquement dans l'isoforme Robo2_tv2, la seule exprimée dans les tissus nerveux. Cet exon est présent dans les gènes *robo1*, *robo2* et *robo4* de tous les vertébrés (Dalkic et coll., 2006). Un autre processus d'épissage peut mener à deux autres isoformes, Robo2A et Robo2B, retrouvées dans le système nerveux en développement chez l'homme et la souris (Yue et coll., 2006). D'autre part, deux isoformes neuronales Robo3A et Robo3B diffèrent par la présence d'une séquence de 26 acides aminés dans la partie N-terminale de la protéine. Ce motif déterminerait leur capacité à lier les Slits (Camurri et coll., 2005). Il existe aussi des formes secrétées de récepteurs Robos issues d'un épissage alternatif comme c'est le cas pour le gène *robo3* chez la souris (Yuan et coll., 1999a) ou d'un clivage de ces récepteurs. Celui-ci permet de libérer le domaine extracellulaire qui est apte à diffuser et à lier son ligand (Chen et coll., 2001b).

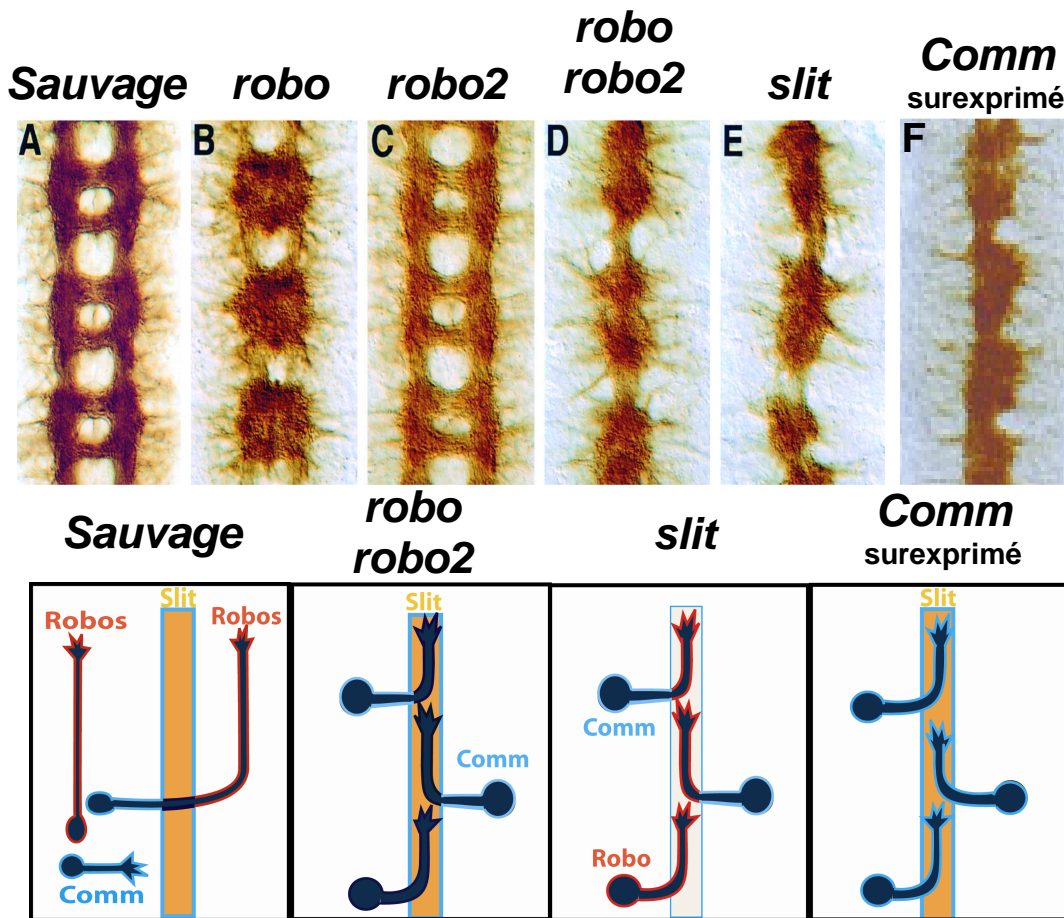


Figure 18: Interactions fonctionnelles entre les gènes *slit* et *robos* chez la drosophile

Projections axonales de la chaîne neurale (anticorps mAb BP102, partie antérieure vers le haut) d'embryons au stade 16 sauvages (A) et mutants dépourvus des gènes *robo* (B), *robo2* (C), *robo/robo2* (D), ou *slit* (E) ou surexprimant le gène *comm*. (F).

Lors de la surexpression de *comm* (F), l'expression du récepteur Robo est inactivée et tous les axones insensibles à l'effet répulsif de la ligne médiane, pénètrent dans celle-ci et y restent confinés. Ce phénotype est identique à celui des mutants *slits* (E). Le mutant *robo2* ne présente pas d'altération (C), les commissures se forment correctement. Le phénotype du mutant *robo* (B) est moins altéré que celui observé en absence de *slit*, car les axones ressortent de la ligne médiane. En revanche, le double mutant *robo/robo2* (D) présente un phénotype aussi prononcé que le mutant *slit*. Ces observations prouvent que les récepteurs Robo et Robo2 coopèrent dans la réponse répulsive des axones commissuraux à Slit *in vivo*.

(Adapté de Simpson et coll. 2000)

3.1.3 Mise en évidence des interactions entre Slits et Robos

3.1.3.1 Découverte de Commissureless, un inhibiteur de l'activité des récepteurs Robos

Le gène *commissureless* (*comm*) a été identifié lors du même crible génétique que *robo* chez la drosophile (Seeger et coll., 1993). Le mutant *comm* présente un phénotype complètement opposé à celui du mutant *robo* : aucun axone ne croise la ligne médiane. Les neurones commissuraux sont bien présents, mais leurs axones projettent ipsilatéralement (Fig.14, 18 ; Seeger et coll., 1993).

In vivo, Comm est fortement exprimée dans des cellules de la ligne médiane, ainsi qu'à la surface et dans des vésicules intracellulaires de certains neurones commissuraux dont les axones viennent au contact de la ligne médiane (Tear et coll., 1996). Comm ne peut pas diffuser librement le long des axones commissuraux ayant traversé, certains mécanismes l'empêchant d'atteindre le segment axonal controlatéral. De plus, Comm n'est jamais détectée dans les neurones à projection ipsilatérale (Fig.16).

Ainsi, la distribution de Comm apparaît opposée à celle du récepteur Robo, tout comme le phénotype des mutants correspondants. Par ailleurs, la surexpression du gène *comm* entraîne une forte diminution de l'expression de la protéine Robo à la surface de tous les axones en croissance. A cet égard, Il a été suggéré que la protéine Comm pouvait réguler négativement le niveau d'expression de la protéine Robo (Kidd et coll., 1998b ; Kidd et coll., 1999 ; Tear et coll., 1996 ; Georgiou et Tear, 2002 ; Keleman et coll., 2002).

De façon surprenante, la surexpression de *comm* mène à un phénotype semblable à celui observé chez le mutant *slit* précédemment décrit : tous les axones sont bloqués dans la ligne médiane (Fig.18), ce territoire ayant perdu toute activité répulsive. Cette observation cruciale a permis, pour la première fois, d'envisager Slit comme bon candidat pour être un ligand répulsif des récepteurs Robos (Kidd et coll., 1999).

3.1.3.2 Preuves génétiques directes

L'interaction entre les gènes *slit* et *robos* a ensuite été confirmée sur la base d'interactions génétiques fonctionnelles chez la drosophile (Kidd et coll., 1999 ; Batty et coll., 1999). L'analyse des doubles mutants *slit/robo* a démontré l'existence d'une relation épistatique entre ces gènes : le produit du gène *slit* agit en amont de celui du gène *robo* (Kidd et coll., 1999). D'une part, quelques défauts de guidage et de croisement de la ligne médiane apparaissent chez les animaux mutants doubles hétérozygotes. D'autre part, invalider une copie du gène *slit* aggrave le phénotype mutant *robo*, alors que le contraire n'est pas vrai. Enfin, les double mutants *slit/robo* présentent le même phénotype que le simple mutant *slit*, tous les axones pénètrent dans la ligne médiane et longent celle-ci.

Un problème restait à résoudre : le fait que le phénotype du mutant *slit* soit plus sévère que celui du mutant *robo*, suggérait que d'autres récepteurs interviennent dans la réponse axonale à l'effet répulsif des Slits. Il est alors apparu que Robo2 coopère en effet avec Robo pour empêcher les axones commissuraux de rester au niveau de la ligne médiane (Rajagopalan et coll., 2000a ; Simpson et coll., 2000b). Les doubles mutants *robo/robo2* ont à ce niveau un phénotype aussi sévère que le mutant *slit*, cette phénocopie confirmant l'interaction fonctionnelle entre ces gènes *in vivo* (Fig.18).

3.1.3.3 Confirmation biochimique de l'association entre Slits et Robos

La liaison entre Slits et Robos a été démontrée par des méthodes biochimiques. Des expériences *in vitro* de « *binding* » sur cellules et de co-immunoprécipitations ont confirmé que Slit est bien un ligand des récepteurs Robos (Brose et coll., 1999 ; Li et coll., 1999 ; Yuan et coll., 1999b). Les domaines nécessaires à l'interaction entre ces partenaires et à leur fonction de guidage *in vivo* sont aujourd'hui connus. Chez la drosophile, la protéine Slit interagit avec les trois récepteurs Robos, qui pourraient entrer en compétition pour interagir avec les Slits (Patel et coll., 2001). De même chez les vertébrés, Slit1, Slit2 et Slit3 lient les récepteurs Robo1 et Robo2 avec des constantes d'affinités comparables d'approximativement 10nM (Brose et coll., 1999 ; Li et coll., 1999). L'interaction de Robo3 avec les Slits est plus discutable. Celle-ci a été initialement détectée (Sabatier et coll., 2004), mais rapidement remise en cause (Mambetisaeva et coll., 2005). Une étude plus récente montre que l'isoforme Robo3B peut interagir avec Slit2 *in vitro*, contrairement à Robo3A (Camurri et coll., 2005). Par ailleurs, il n'a jamais été clairement démontré que Robo4 interagit avec les Slits (Suchting et coll., 2005 ; Park et coll., 2003).

Les domaines d'interaction entre Slits et Robos ont été conservés au cours de l'évolution. En effet, la protéine Slit de drosophile peut lier les récepteurs Robos de mammifères et réciproquement (Brose et coll., 1999). Chez la drosophile, les domaines LRRs de Slit sont requis pour sa fonction *in vivo*, contrairement à ses domaines EGF (Brose et coll., 1999). Par ailleurs, ce domaine est nécessaire et suffisant pour son activité répulsive (Chen et coll., 2001b ; Nguyen Ba-Charvet et coll., 2001 ; Battye et coll., 2001). Chez les mammifères, le LRR2 de Slit a une affinité comparable pour Robo1 et Robo2 (Li et coll., 1999 ; Brose et coll., 1999 ; Sabatier et coll., 2004). La région C-terminale de Slit (Slit-C) dépourvue de LRRs ne peut en revanche interagir avec ces récepteurs. Sa perte n'affecte pas la liaison des Slits aux récepteurs Robos ni la plupart de leurs fonctions (Battye et coll., 2001 ; Chen et coll., 2001b ; Nguyen Ba-Charvet et coll., 2001).

Une étude structure/fonction détaillée a permis de localiser le site primaire de liaison aux trois récepteurs Robos de drosophile, au niveau d'un domaine hautement conservé formant la face concave du second LRR (LRR2) des Slits (Howitt et coll., 2004). Les domaines FNIII ne sont

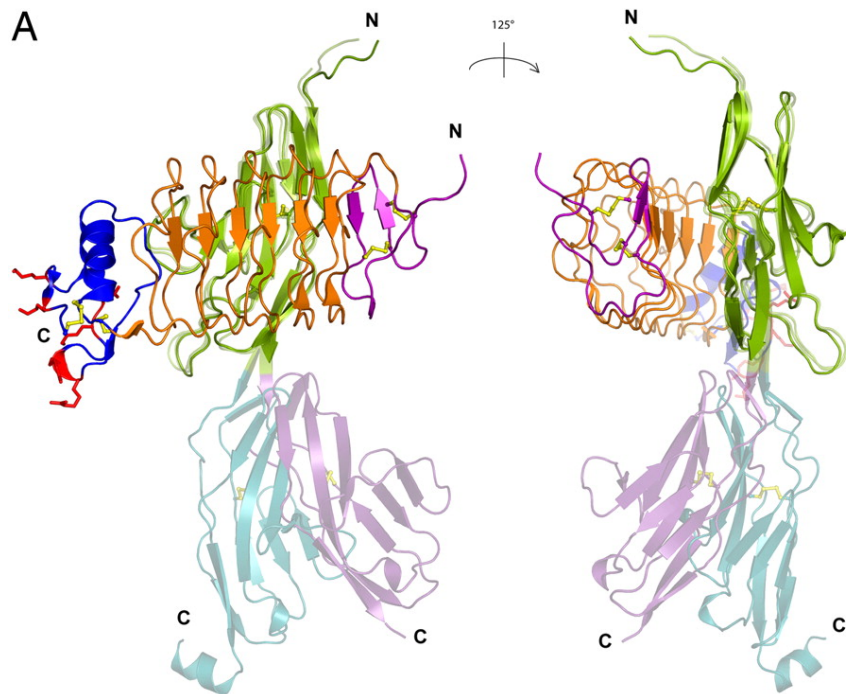


Figure 19: Reconstruction en trois dimensions de la structure des domaines d'interactions entre Slit et Robo

Modèle représentant la structure cristallographique des deux domaines Ig1 (vert) et Ig2 (cyan et violet) de la protéine Robo1, superposés au domaine LRR2 de Slit2 (lié à Ig1), dans deux orientations différentes.

(Adapté de Morlot et coll. 2007)

pas requis pour cette interaction. Le domaine LRR4 n'est pas sollicité pour cette interaction *in vitro*. Néanmoins, l'affinité entre Slits et Robos est plus forte si les quatre LRRs sont présents. Le LRR4 pourrait fonctionner en tant que domaine de dimérisation, mais aucune donnée ne démontre que ce processus soit indispensable aux fonctions des Slits *in vivo* (Howitt et coll., 2004). Chez la drosophile, il a été proposé que la liaison de Slit au récepteur Robo2 puisse permettre de présenter ce ligand à un autre récepteur Robo activé en *trans* (Kraut et Zinn, 2004). Cette action pourrait en effet nécessiter une dimérisation des Slits, étant donné que seule une face de ce ligand est capable d'interagir avec son récepteur.

Par ailleurs, plusieurs données suggéraient l'importance des domaines Ig1 et Ig2 dans la fonction des récepteurs Robos. Ils forment la région la plus conservée entre ces récepteurs. La mutation du premier domaine Ig perturbe la fonction de ces récepteurs chez la drosophile (Kidd et coll., 1998a). Chez les mammifères, la délétion de l'Ig1 et l'Ig2 de Robo1 ou l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces domaines abolit sa capacité de liaison aux Slits *in vitro*, ainsi que sa fonction *in vivo* (Xian et coll., 2001 ; Xian et coll., 2004 ; Hivert et coll., 2002 ; Wang et coll., 2003 ; Liu et coll., 2004). L'importance fonctionnelle des deux premiers domaines Ig est due au fait qu'ils constituent les sites de fixation des LRRs des Slits (Liu et coll., 2004). Les données structurales obtenues par cristallographie aux rayons X ont confirmé que la face concave du second domaine LRR des Slits est assez large pour occuper un domaine Ig (Fig.19 ; Howitt et coll., 2004). L'interaction directe entre le second LRR de Slit (drosophile) et la paire des domaines Ig1 et Ig2 des récepteurs Robos a été récemment caractérisée et mesurée par résonance plasmonique SPR (« surface plasmon resonance »). Cette liaison repose sur des forces électrostatiques et des contacts hydrophobes entre résidus conservés (Morlot et coll., 2007 ; Howitt et coll., 2004).

3.2 Guidage axonal chez la drosophile, un premier modèle d'action du système Slit/Robo

L'ensemble des résultats obtenus à l'étude du développement de la chaîne nerveuse ventrale de drosophile depuis les dix dernières années illustre l'importance et le fonctionnement du système Slit/Robo *in vivo*. Je présenterai en détail l'action de ces molécules dans la mise en place de ce système de projections axonales, car ce modèle permet de répondre à des questions essentielles :

- Comment l'action du système Slit/Robos détermine-t-elle la compétence des axones à croiser ou non la ligne médiane?
- Comment l'activité répulsive des récepteurs Robo est-elle régulée dans les axones commissuraux au cours du croisement de la ligne médiane?

- Comment ce même système restreint la projection des fibres axonales ipsilatérales, en les empêchant de croiser la ligne médiane et en les positionnant latéralement?

Il paraît difficile d'expliquer les mécanismes contrôlant le croisement de la ligne médiane sans prendre en compte l'activité de la Nétrine, facteur chimio-attractif également sécrété par cette région. Je vais donc en premier lieu revenir sur la fonction de ce partenaire fonctionnel du système Slit/Robo chez la drosophile.

3.2.1 Contrôle du croisement de la ligne médiane

3.2.1.1 Fonction attractive de la Nétrine

Deux versions du gène codant la Nétrine, *nétrineA* et *nétrineB*, sont co-exprimées avec *slit* dans les cellules gliales de la ligne médiane (Fig.13 ; Harris et coll., 1996). La délétion de ces gènes entraîne des défauts majeurs dans la formation des commissures. Celles-ci sont partiellement manquantes et plus fines (Harris et coll., 1996 ; Mitchell et coll., 1996 ; Hummel et coll., 1999). Ce phénotype est aboli si l'expression de la Nétrine est rétablie dans les cellules de la ligne médiane (Harris et coll., 1996 ; Mitchell et coll., 1996). Auparavant, la Nétrine avait été identifiée chez les mammifères comme étant le facteur attractif sécrété par la plaque du plancher de moelle épinière attirant les axones commissuraux (Serafini et coll., 1994). Il a donc été logiquement proposé qu'elle possède la même fonction chez la drosophile.

Chez la drosophile, le mutant *frazzled* a un phénotype très similaire à celui du mutant *nétrineA/nétrineB* (Kolodziej et coll., 1996). Il a été récemment démontré que la Nétrine agit en interaction avec Frazzled à courte distance pour faciliter le franchissement de la ligne médiane par les axones commissuraux. Son effet à longue distance n'apparaît en revanche pas déterminant au croisement de la ligne médiane. En effet, l'expression d'une forme non diffusible de la Nétrine dans les cellules de la ligne médiane suffit à compenser les défauts observés chez le mutant *nétrineA/nétrineB* (Brankatschk et Dickson, 2006). De plus, les interactions Nétrines/Frazzled ne sont pas non plus essentielles au guidage de tous les axones commissuraux. Chez les mutants correspondants, les projections commissurales ne sont que partiellement perturbées : certains axones parviennent encore à croiser la ligne médiane puis à se répartir au sein des faisceaux longitudinaux. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence de facteurs attractifs supplémentaires exprimés dans la ligne médiane, qui n'ont pour l'instant pas été identifiés chez la drosophile (Bhat et coll., 2007).

3.2.1.2 La dynamique d'expression des récepteurs Robos détermine le choix de croiser ou non la ligne médiane

La nature des défauts observés chez les mutants *slit* et *robo/robo2* suggère que leur activité répulsive agit à plusieurs niveaux. Ce système permettrait aux axones commissuraux de quitter

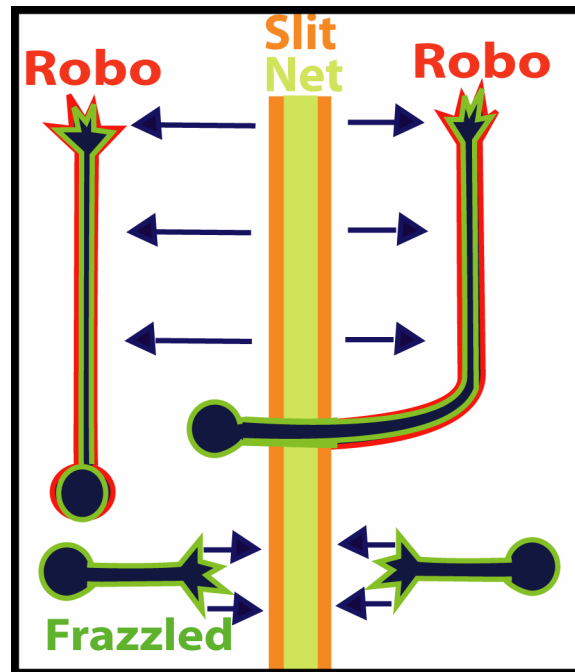


Figure 20: Modèle d'action du système Slit/Robo durant le guidage des axones de la chaîne neurale de drosophile

Les axones longitudinaux expriment fortement Robo à leur surface. Ils sont donc en permanence repoussés par les Slits sécrétés par la ligne médiane, qui masque en même temps l'effet attractif de la Nétrine (Net). L'accumulation de Robo à la surface des axones commissuraux est réprimée avant le croisement de la ligne médiane. Ces axones alors insensibles à Slit expriment par ailleurs le récepteur Frazzled et sont attirés par la Nétrine vers la ligne médiane. Après la traversée de celle-ci, Robo est accumulé à la membrane et l'axone répond à l'action répulsive des Slits. Les axones commissuraux progressent alors du côté controlatéral sans recroiser la ligne médiane. Ils ne sont plus sensibles à son effet attractif, bien que l'expression de Frazzled soit maintenue.

la ligne médiane une fois qu'ils l'ont franchie, mais agirait également sur les axones longitudinaux afin qu'ils ne puissent pénétrer dans ce territoire médian. Etant donnée la dynamique d'expression des protéines Slit et Robo le modèle suivant a été proposé (Fig.20) : Les protéines Slits sont fortement exprimées dans les cellules de la ligne médiane. Il existe une forte corrélation entre la quantité de protéines Robos présentes initialement à la surface du cône de croissance et la capacité des axones à traverser la ligne médiane. Les axones qui projettent ipsilatéralement expriment très fortement les Robos. Ils sont donc repoussés par les Slits qui les empêchent d'approcher de la ligne médiane. En revanche, une faible quantité de protéines Robos est détectée sur les axones pré-commissuraux, qui ne sont donc pas repoussés sous l'effet des Slits. Ces axones sont par ailleurs attirés vers la ligne médiane sous l'effet de la Nétrine, ce qui explique qu'ils y pénètrent. A ce stade, les récepteurs Robos sont activement accumulés à la surface des axones commissuraux, qui deviennent sensibles à l'activité répulsive des Slits. Ils se retrouvent forcés à quitter la ligne médiane et à rester définitivement dans l'hémisphère controlatéral.

La régulation de la quantité de protéines Robos présentes à la surface des cônes de croissance pourrait ainsi contrôler la décussation de ces axones. En accord avec ce modèle, des expériences de gain de fonction démontrent qu'augmenter le niveau d'expression de n'importe quels récepteurs Robos est suffisant pour empêcher le croisement de la ligne médiane (Kidd et coll., 1999 ; Rajagopalan et coll., 2000b ; Simpson et coll., 2000a). Par ailleurs, chez les mutants *slits*, le récepteur Robo est accumulé à la surface des axones bloqués à la ligne médiane (Fig.18). Cette régulation ne met manifestement pas en jeu le contrôle transcriptionnel de l'expression du récepteur Robo. En effet, la transcription des ARNm codant cette protéine est relativement ubiquitaire dans les neurones de la chaîne nerveuse ventrale. Comme nous allons le voir, l'expression des récepteurs Robos est soumise à une régulation d'ordre post-transcriptionnelle, leur adressage membranaire est contrôlé par Commissureless.

3.2.1.3 Intervention de Commissureless dans la régulation spatiale de l'expression des récepteurs Robos

➤ Caractérisation de la fonction de Commissureless

Commissureless (Comm) a une distribution inverse et complémentaire à celle des récepteurs Robos et possède la capacité de réguler négativement l'expression de ces derniers. Après le franchissement de la ligne médiane, l'expression de Comm est inhibée simultanément à l'activation de l'expression des récepteurs Robos. De plus, l'action de Comm est de toute évidence essentielle à la décussation axonale (Kidd et coll., 1998b ; Tear et coll., 1996 ; Georgiou et Tear, 2002 ; Keleman et coll., 2002). Chez le double mutant *robo/comm*, les commissures sont rétablies et le phénotype obtenu est identique à celui du simple mutant *robo*

(Seeger et coll., 1993). De même, le phénotype du mutant *slit/comm* ressemble au mutant *slit* (Dickson et Gilestro, 2006). Ces expériences permettent de conclure que l'absence de commissure chez le mutant *comm* est une conséquence directe de l'activité incontrôlée du système répulsif Slit/Robo (relation épistasique).

La protéine Comm est également exprimée dans les cellules de la ligne médiane. Initialement, il avait été proposé que la présence de Comm dans cette région était essentielle. Cette protéine serait transférée aux axones commissuraux lors de leur contact avec les cellules médianes et déclencherait l'internalisation des récepteurs Robos afin que ces axones puissent la traverser (Kidd et coll., 1998b ; Tear et coll., 1996 ; Georgiou et Tear, 2002). Cependant ce modèle est aujourd'hui infirmé car il a été montré que l'activité de Comm n'est requise que dans les axones commissuraux. En effet, chez le mutant *comm*, le fait de rétablir l'expression de ce gène dans quelques neurones commissuraux leur redonne la capacité à franchir la ligne médiane. A l'inverse, réintroduire Comm dans les cellules de la ligne médiane n'a pas d'effet compensatoire (Keleman et coll., 2002 ; Keleman et coll., 2005). D'autres preuves de l'action cellulaire autonome de Comm ont été obtenues à la suite d'expériences de transplantations cellulaires ou de recombinaisons génétiques (Keleman et coll., 2002 ; Mcgovern et Seeger, 2003). De récentes données ont permis de comprendre les mécanismes par lesquels Comm régule la localisation spatiale du récepteur Robo à la surface des axones commissuraux.

➤ Commissureless empêche l'adressage des récepteurs Robos au cône de croissance

Le gène *comm* code une protéine de 370 acides aminés possédant un domaine transmembranaire. Deux homologues de ce gène, *comm2* et *comm3*, ont été identifiés chez la drosophile (Keleman et coll., 2002 ; Rajagopalan et coll., 2000a). Ils codent des protéines qui ne présentent que 15 à 20% d'identité à Comm, mais ont des tailles et des structures assez comparables. Les protéines Comm ne possèdent pas de domaine catalytique. Elles contiennent dans leur partie cytoplasmique une séquence de 22 acides aminés fortement conservée entre Comm et Comm2. Ce domaine constitue un motif de tri impliqué dans la localisation endosomale de ces protéines, qui ne possèdent pas d'autre séquence peptidique signal (Keleman et coll., 2002 ; Tear et coll., 1996). Des expériences de co-immunoprécipitations ont montré que Comm peut se lier aux récepteurs Robos (Keleman et coll., 2002). Dans des cellules COS en culture, Comm est localisé dans l'appareil de Golgi et les endosomes tardifs alors que Robo est adressé à la surface cellulaire. Si ces deux facteurs sont co-exprimés, Robo n'est plus présent à la membrane mais se trouve recruté par Comm au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes (Keleman et coll., 2002 ; Myat et coll., 2002).

Il a été proposé que Comm agisse en déclenchant l'internalisation des récepteurs Robos exposés à la membrane et en les séquestrant dans ces vésicules intracellulaires, action qui

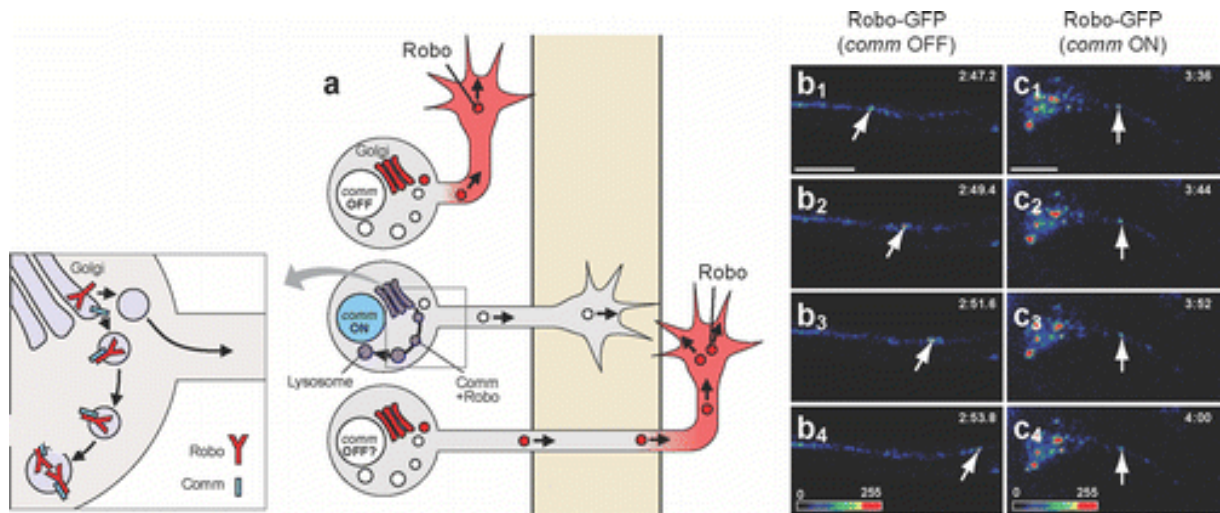


Figure 21: Commissureless régule le trafic intra-cellulaire des récepteurs Robos chez la drosophile

Modèle de tri des récepteurs Robos sous l'action de Commissureless (Comm ; a). La fenêtre élargie montre que les Robos sont pris en charge à la sortie de l'appareil de Golgi par une interaction avec Comm qui les adresse *via* le trafic vésiculaire vers les endosomes tardifs. Ce phénomène ne survient qu'en présence de Comm dans les neurones commissuraux dont l'axone n'a pas encore franchi la ligne médiane. Dans les axones à croissance ipsilatérale ou post-commissuraux, les récepteurs Robo peuvent être adressés au cône de croissance et au segment axonal adjacent. Trafic d'une protéine chimérique Robo-GFP dans des axones sensoriels *in vivo* en absence (b) ou en présence (c) de Comm. Visualisation d'un même plan (1,2,3,4) pris en vidéo-microscopie à plusieurs intervalles de temps (temps en minutes/secondes indiqué en haut à droite). Les couleurs reconstituées indiquent la concentration du signal fluorescent lié à la présence de la Robo-GFP. Les flèches pointent les vésicules chargées en protéines Robos, qui sont transportées de façon antérograde vers l'extrémité de l'axone (à droite) en absence de Comm mais pas en sa présence. (Adapté de Dickson et coll. 2006; Keleman et coll. 2005)

empêcherait la réponse aux Slits. Ce modèle a cependant été récemment remis en cause. Le trafic intracellulaire d'une protéine Robo couplée à la GFP a été suivi en vidéo-microscopie dans les axones sensoriels d'embryons de drosophile vivants. Cette expérience démontre sans ambiguïté que Comm bloque le transport axonal du récepteur Robo et par conséquent son adressage au cône de croissance (Fig.21 ; Keleman et coll., 2005). Comm prend en charge les récepteurs Robos néosynthétisés à leur sortie de l'appareil de Golgi et les adresse directement vers le système de dégradation endosomal. Les régions extracellulaires et transmembranaires de Robo sont nécessaires à son transport (Keleman et coll., 2002).

Des études de mise en relation entre la structure de Comm et sa fonction ont révélé que ses domaines cytoplasmique et transmembranaire sont essentiels à sa localisation intracellulaire et à sa capacité à réguler le taux membranaire de protéines Robos. L'absence de ces domaines résulte en une restriction de Comm au niveau du soma (Georgiou et Tear, 2003). D'autre part, des mutations ponctuelles du motif intracellulaire LPSY de tri endosomal abolissent complètement la fonction de Comm *in vivo*. L'ubiquitine ligase Nedd4 a été identifiée en test de double hybride comme un ligand potentiel de ce motif. Son action favorise l'adressage des protéines Comm et Robo vers le système de dégradation lysosomal de l'axone. Son recrutement résulte en l'ubiquitination de Comm qui n'est cependant pas nécessaire à sa fonction *in vivo* et *in vitro*. Nedd4 n'est pas requise au contrôle de la traversée de la ligne médiane *in vivo* (Georgiou et Tear, 2002 ; Keleman et coll., 2002) ; Keleman et coll., 2005 ; Myat et coll., 2002). Dernièrement, Nedd4 a été impliquée dans d'autres fonctions de Comm durant la synaptogénèse liée à l'innervation des cellules musculaires (Ing et coll., 2007).

La dynamique d'expression de Comm est contrôlée par des mécanismes qui restent mal déterminés. Le seul facteur impliqué à ce jour dans ce processus est la protéine ELAV. En absence de ce facteur de liaison à l'ARN, l'expression de Comm est fortement diminuée, ce qui perturbe l'établissement des projections commissurales (Simionato et coll., 2007). Quoiqu'il en soit, Comm n'étant plus exprimée après la ligne médiane, les récepteurs Robos apparaissent à la surface des cônes de croissance des axones commissuraux qui peuvent alors répondre à l'effet répulsif des Slits (Fig.21). Comm exerce une action de tri similaire sur Robo2 et Robo3 (Choi et coll., 2003 ; Dickson et Gilestro, 2006). Cependant, aucun défaut chez le mutant *comm* n'a été attribué à l'activité inappropriée de Robo2 et Robo3 (Rajagopalan et coll., 2000b). Le phénotype des doubles mutants *comm/robo2* ou *comm/robo3* est similaire à celui du mutant *comm* (Rajagopalan et coll., 2000b ; Dickson et Gilestro, 2006). Comm2 et Comm3 ont par ailleurs une faible capacité à séquestrer Robo2 ou Robo3 (Choi et coll., 2003).

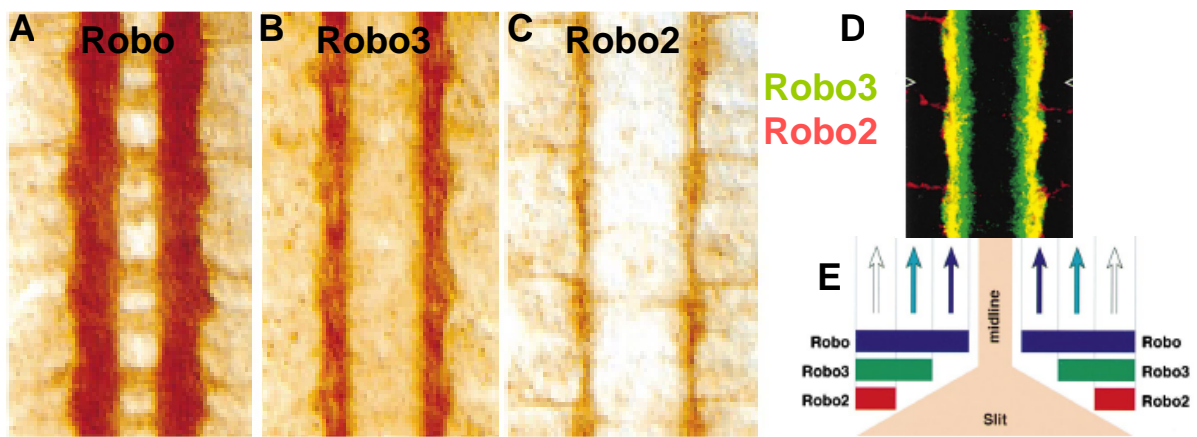


Figure 22: Dynamique d'expression des récepteurs Robos à la surface des faisceaux axonaux longitudinaux

Projections axonales de la chaîne neurale d'embryons de drosophile sauvage au stade 16, marquées par un anticorps anti-Robo (A), anti-Robo3 (B) ou anti-Robo2 (C). Image confocale de la même région (D) doublement marquée par deux anticorps anti-Robo2 (rouge) ou anti-Robo3 (vert). Le patron d'expression des récepteurs Robos à la surface des faisceaux longitudinaux permet donc de les diviser en trois zones (Schéma en E): médiane/Robo positive (flèche bleu foncé) ; intermédiaire/Robo+Robo3 positive (flèche bleu foncé) ; latérale/Robo+Robo3+Robo2 positive (flèche blanche). Les Slits émis en gradient depuis la ligne médiane peuvent guider à distance le positionnement des faisceaux longitudinaux.

(Adapté de Rajagopalan et coll. 2000)

3.2.2 Positionnement latéral des faisceaux d'axones longitudinaux

Chez la drosophile, l'observation en microscopie électronique de la chaîne nerveuse ventrale a révélé que les axones longitudinaux fasciculent en vingt faisceaux individualisés. Ceux-ci sont regroupés en trois faisceaux majeurs pouvant être également composés d'axones commissuraux venant de franchir la ligne médiane. Chaque faisceau est recouvert d'une combinaison unique de marqueurs de surface. Il a été proposé qu'un axone donné progresse de façon sélective le long d'un de ces faisceaux en interprétant ce code moléculaire (Raper et coll., 1983a ; Raper et coll., 1984 ; Bastiani et coll., 1984).

Des études récentes ont mis en évidence que les trois récepteurs Robos (Robo, Robo2 et Robo3) s'expriment à la surface de faisceaux longitudinaux distincts mais chevauchants (Fig.22). Leur répartition est fonction de la position des fibres par rapport à la ligne médiane. Elle permet de diviser ces faisceaux en trois zones majeures (Rajagopalan et coll., 2000a ; Rajagopalan et coll., 2000b ; Simpson et coll., 2000b ; Simpson et coll., 2000a) : Les axones médians expriment Robo, ceux projetant en position intermédiaire expriment Robo et Robo3, les plus latéraux expriment les trois récepteurs Robos à la fois. L'analyse de mutants avec gain ou perte de fonction de *robo2* et *robo3* suggère que l'expression combinatoire de ces gènes constitue un « code Robo » qui contrôle le positionnement latéral de ces faisceaux (Rajagopalan et coll., 2000b ; Simpson et coll., 2000a). Ces deux études s'accordent sur l'analyse des mutants *robo2* et *robo3* : en l'absence de Robo2, les faisceaux latéraux convergent vers les zones intermédiaire et médiane alors qu'en l'absence de Robo3, les axones intermédiaires se retrouvent dans la zone plus médiane (Rajagopalan et coll., 2000b ; Simpson et coll., 2000a). En revanche, les analyses diffèrent au niveau des effets du gain de fonction de Robo2, ce qui a mené à la proposition de deux modèles différents : modèle combinatoire (le positionnement latéral est fonction de la combinaison des récepteurs exprimés ; Simpson et coll., 2000a), ou quantitatif (le positionnement latéral est fonction de quantité de récepteurs exprimés ; Rajagopalan et coll., 2000b) entre lesquels il est difficile de trancher. Ces deux modèles s'accordent cependant sur le fait que l'expression différentielle de ces récepteurs pourrait guider le positionnement de ces faisceaux en réponse aux Slits. Toutefois, des processus d'interactions homophiliques et hétérophiliques entre les différents récepteurs Robos pourraient également contribuer à la ségrégation et la fasciculation de ces axones. Une étude récente démontre que le système Nétrine/Frazzled agit également dans le positionnement de certains faisceaux longitudinaux. Son action paraît contrebalancer la fonction des Slits puisque son inactivation entraîne un déplacement latéral de ces projections (Bhat, 2005).

3.2.3 En conclusion

Ce modèle nous permet donc de comprendre par quels mécanismes l'activité du système Slit/Robo peut contrôler le croisement de la ligne médiane par des axones en croissance. L'expression de Comm détermine initialement leur capacité à franchir cette barrière répulsive. Il faut souligner que des données obtenues chez la drosophile démontrent que les fonctions de Slit et Robo régulent également la croissance et la décussation dendritique (Godenschwege et coll., 2002 ; Furrer et coll., 2003) selon un schéma d'interaction similaire à celui présenté pour les axones : les récepteurs Robos placés sous le contrôle de Comm agissent de façon concertée avec le récepteur Frazzled (Furrer et coll., 2003). Enfin, Comm ne possède pas de protéines apparentées en dehors des diptères (Tear et coll., 1996 ; Dickson et Gilestro, 2006). Elle n'est pas présente chez les vertébrés, chez lesquels l'activité des récepteurs Robos dans les axones commissuraux est régulée par des mécanismes différents.

3.3 *Fonction de Slit et Robo dans la formation des systèmes commissuraux du cerveau des vertébrés*

L'étude du patron d'expression des gènes *slits* et *robos* a montré qu'ils sont exprimés dans le système nerveux central et périphérique, de l'embryon à l'adulte. Leurs profils d'expression, caractérisés principalement par des techniques d'hybridation *in situ*, sont apparus très complémentaires (pour références : chez le xénope (Chen et coll., 2000b), le poisson zèbre (Yeo et coll., 2001 ; Challa et coll., 2001), le poulet (Holmes et Niswander, 2001 ; Vargesson et coll., 2001), les rongeurs (Yuan et coll., 1999a ; Li et coll., 1999 ; Marillat et coll., 2002 ; Camurri et coll., 2004)).

Durant le développement, une grande majorité des neurones commissuraux ou non commissuraux exprime les gènes *robos*. *Robo1* et *robo2* sont exprimés selon des patrons chevauchants, ce qui suggère qu'ils puissent agir de manière redondante. L'expression de *robo3* est plus restreinte et surtout retrouvée dans les systèmes commissuraux du cerveau postérieur. Les gènes *slits* sont exprimés au niveau de structures médianes du système nerveux, comme c'est le cas chez la drosophile. Dans la région antérieure du système nerveux, l'expression de *slit3* est quasiment absente. Les gènes *slit1* et *slit2* sont quant à eux exprimés en position ventro-médiane dans plusieurs structures comme le septum, l'aire pré-optique ou l'hypothalamus. Ils sont également exprimés par des cellules qui encadrent la projection de faisceaux commissuraux. Dans les régions plus caudales, les trois gènes *slits* sont co-exprimés tout au long de la plaque du plancher. Par ailleurs, les gènes *slits* sont aussi fréquemment

exprimés dans plusieurs populations neuronales au cours de leur croissance axonale ou de leur migration (Marillat et coll., 2002).

De nombreux effets des Slits ont été caractérisés *in vitro*. Ces facteurs exercent une action chimio-répulsive sur de nombreux axones qui croisent ou non la ligne médiane, dont les axones du bulbe olfactif (Li et coll., 1999 ; Nguyen Ba-Charvet et coll., 1999 ; Hivert et coll., 2002), des motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral (Brose et coll., 1999 ; Hammond et coll., 2005), du gyrus denté de l'hippocampe (Nguyen Ba-Charvet et coll., 1999), de la rétine (Erskine et coll., 2000 ; Niclou et coll., 2000 ; Ringstedt et coll., 2000), de l'organe voméronasale (Knoll et coll., 2003), du cortex (Shu et Richards, 2001 ; Whitford et coll., 2002) ou des neurones dopaminergiques striataux (Lin et Isacson, 2006). Toutefois, ils peuvent également agir positivement en stimulant par exemple le branchement des axones issus des ganglions rachidiens (Wang et coll., 1999) ou la croissance dendritique de neurones corticaux (Whitford et coll., 2002).

Chez les rongeurs, le rôle essentiel des Slits et Robos dans le développement du système nerveux a été récemment confirmé grâce à l'étude de plusieurs lignées de souris modifiées génétiquement et déficientes pour une ou plusieurs de ces molécules. Les souris dépourvues de *slit2*, *robo2* ou *robo3* meurent à la naissance (Plump et coll., 2002 ; Sabatier et coll., 2004 ; Grieshammer et coll., 2004). Les mutations des gènes *slit1*, *slit3*, et *robo1* sont viables, certains animaux pouvant atteindre l'âge adulte (Plump et coll., 2002 ; Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2004 ; Yuan et coll., 2003a ; Long et coll., 2004). Toutefois, les souris *slit3*^{-/-} sont atteintes d'un taux de mortalité élevé qui semble être causé par une hernie diaphragmatique congénitale accompagnée, entre autres défauts, de malformations cardiaques (Yuan et coll., 2003a). Les mêmes malformations sont retrouvées chez une autre lignée de souris déficientes en *Slit3*, créée et analysée indépendamment (Liu et Herlyn, 2003). D'autre part, chez la lignée de souris *Dutt1*, la délétion de l'exon 2 du gène *robo1* (codant le domaine Ig1 de ce récepteur) à l'état homozygote entraîne la mort prématurée de 63% des nouveau-nés, atteints de défauts respiratoires causés par un développement pulmonaire anormal (Xian et coll., 2001 ; Xian et coll., 2004 ; Clark et coll., 2002).

3.3.1 Guidage des projections axonales du télencéphale

Lorsque ce travail a été initié, la formation des grandes voies de projections axonales au sein du télencéphale avait été analysée seulement chez les souris déficientes en *slit1* et/ou *slit2*. Ces souris présentent deux types de défauts dans les systèmes olfactif, cortical et visuel : la trajectoire des faisceaux commissuraux est fortement perturbée et des commissures ectopiques sont formées par d'autres faisceaux qui normalement ne franchissent pas la ligne médiane.

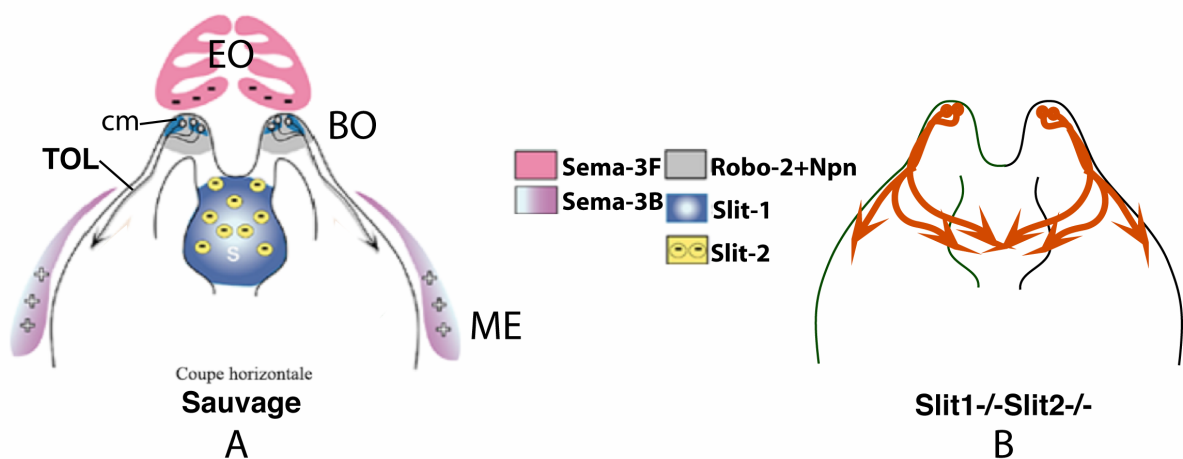


Figure 23: Signaux de guidage impliqués dans la formation du tractus olfactif latéral

Représentation schématique de la trajectoire (coupe horizontale antérieure vers le haut) du tractus olfactif latéral (TOL) chez des souris sauvages (A) ou déficiente en *slit1* et *slit2* (B). Le TOL est normalement composé (A) par les axones des cellules mitrales (cm) du bulbe olfactif (BO) qui projettent latéralement vers le cortex olfactif en évitant le septum (S). Ces axones olfactifs expriment les récepteurs Robo2 et Neuropilines (Npn1 et Npn2). L'effet répulsif exercé par Slit1 et Slit2 secrétés par le septum éloignent ces axones de la ligne médiane. La Sema3F, exprimée dans l'épithélium olfactif (EO), exerce une activité répulsive sur les axones olfactifs. Elle pourrait former une barrière répulsive et contraindre les axones du TOL à se diriger caudalement dans le télencéphale. D'autre part, la Sema3B est exprimée le long du TOL dans le mésenchyme extra-cérébral (ME). En culture, la Sema3B est capable de stimuler la croissance des axones olfactifs et pourrait donc les aider à projeter latéralement. En absence de Slit1 et Slit2 (B), les axones olfactifs ne sont plus repoussés par le septum. Le TOL apparaît alors défasciculé et certains axones progressent anormalement vers la ligne médiane. (Adapté de Nguyen-Ba-Charvet et coll. 2002)

3.3.1.1 Guidage des projections ipsilatérales : action répulsive des Slits présents à la ligne médiane

➤ Développement du tractus olfactif latéral

Chez les rongeurs, le tractus olfactif latéral (TOL) est composé par les axones des cellules mitrales du bulbe olfactif. Ils progressent caudalement à la surface du télencéphale vers le cortex olfactif (Fig.23 ; Hinds et Hinds, 1972 ; Schwob et Price, 1984 ; Brunjes et Frazier, 1986 ; Sugisaki et coll., 1996). Ils évitent la région médiane du septum qui sécrète un facteur diffusible capable de repousser leur croissance *in vitro* (Pini, 1993). La nature de ce facteur septal était alors inconnue, mais les Slits sont vite apparus comme des candidats potentiels. Durant le développement du TOL, *slit1* et *slit2* sont exprimés dans le septum alors que l'expression de *robo2* est détectée dans les cellules mitrales (Fig.23). Plusieurs expériences *in vitro* ont démontré que les Slits ont un effet chimio-répulsif sur la croissance des axones du TOL, qui mime l'effet du septum (Li et coll., 1999 ; Nguyen Ba-Charvet et coll., 1999 ; Hivert et coll., 2002). L'analyse des souris déficientes pour *slit1* et *slit2* a par la suite apporté la preuve que ces molécules interviennent dans le guidage du TOL (Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2002). En effet, des explants de septum issus d'embryons *slit1*^{-/-} ; *slit2*^{-/-} ne repoussent plus ces axones en culture. Par ailleurs, chez ces doubles mutants, la trajectoire du TOL est totalement perturbée. Ces axones sont défasciculés et se déploient vers le télencéphale ventral. Ils pénètrent alors dans le septum et atteignent la ligne médiane (Fig.23).

D'autres molécules de guidage diffusibles sont susceptibles de coopérer avec les Slits lors du guidage des axones du TOL. Ils sont sensibles à l'effet chimio-attractif de l'Anosmine1 exprimée dans le cortex piriforme (Soussi-Yanicostas et coll., 2002). Des molécules de la famille des Sémaphorines (Séma) sont aussi exprimées le long de la trajectoire du TOL et susceptibles d'être impliquées dans la mise en place de ces projections axonales (cf. légende Fig.23 ; De Castro et coll., 1999 ; Saha et coll., 2007). Leurs récepteurs Neuropiline1 et Neuropiline2 sont présents à la surface des axones du bulbe olfactif en croissance (Kawakami et coll., 1996 ; Chen et coll., 1997). Cependant, le TOL se développe normalement lorsqu'un de ces deux récepteurs se retrouve manquant (Kitsukawa et coll., 1997 ; Chen et coll., 2000a). Le rôle fonctionnel des Sémaphorines reste donc à confirmer *in vivo*.

Par ailleurs, les axones olfactifs poussent au contact de cellules guides (appelées cellules du TOL) qui délimitent leur voie de projection latérale depuis la sortie du bulbe olfactif jusqu'au cortex piriforme (Sugisaki et coll., 1996 ; Sato et coll., 1998). L'ablation de ces cellules en culture organotypique inhibe la croissance des axones du TOL (Sato et coll., 1998). Leur fonction de guidage est également supportée par plusieurs données *in vivo* (Kawasaki et coll., 2006 ; Saha et coll., 2007). Les cellules du TOL exprimant DCC sont attirées par la Nétrine1 exprimée à la surface du néocortex et la délétion de ce récepteur perturbe leur distribution. Les

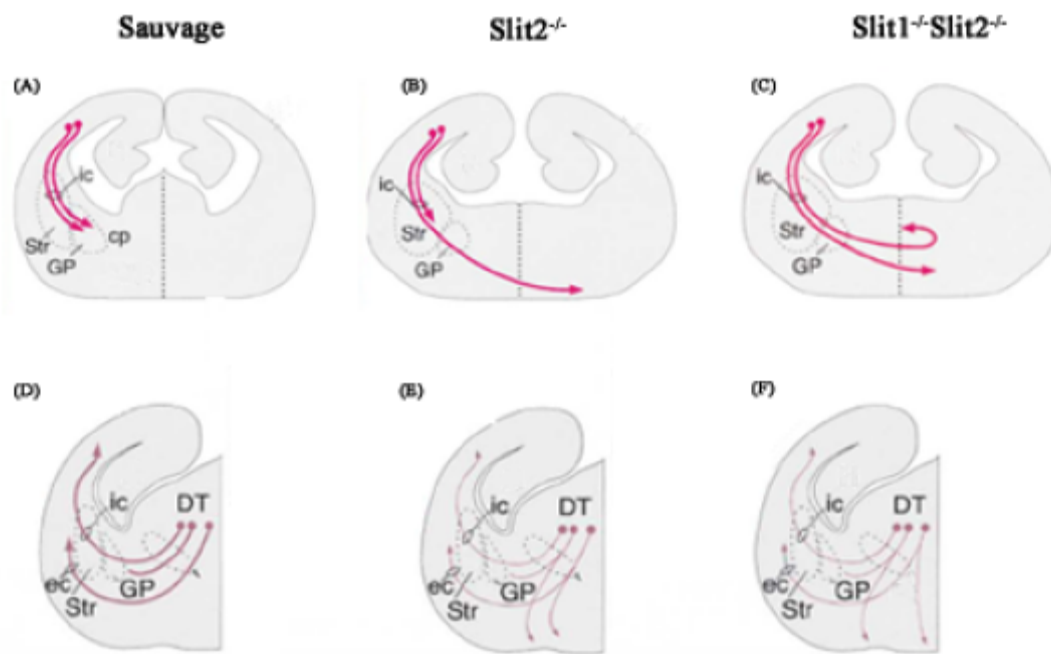


Figure 24: Défauts de guidage des fibres corticofuges et cortico-thalamiques survenant chez les souris déficientes en *slit2* et *slit1/slit2*

Schémas représentant la trajectoire des efférences et afférences corticales (coupes coronales) chez des souris sauvages (A, D) et déficientes en *slit2* (B,E) et *slit1/slit2* (C,F).

Chez les souris sauvages, les axones corticofuges (A) et cortico-thalamiques (D) transitent tous par la capsule interne (ic) et ne franchissent pas la ligne médiane du télencéphale. En absence de *slit2*, les axones corticofuges se mettent à traverser la ligne médiane au niveau de la surface ventrale du télencéphale (B). De plus, une partie des axones issus du thalamus dorsal (DT) s'étend trop ventralement vers l'hypothalamus (E). En l'absence conjointe de *slit1* et *slit2*, les axones corticofuges traversent massivement la ligne médiane (C). Ils progressent alors dans l'hypothalamus controlatéral ou tournent autour de la région médiane. Les axones thalamo-corticaux sont également fortement déviés vers la région ventro-médiane du télencéphale (F).

GP: Globus pallidus ; Str: Striatum ; ce: capsule externe

(Adapté de Bagri et coll. 2002)

anomalies du TOL observées chez ces animaux seraient une conséquence secondaire de cette distribution anormale (Kawasaki et coll., 2006). Ces cellules semblent donc participer localement au guidage du TOL en coopération avec l'action longue distance des Slits.

➤ Guidage des afférences et efférences corticales

Les fibres corticofuges se répartissent au sein des voies de projection cortico-thalamique et cortico-spinale. Les neurones du thalamus dorsal projettent réciproquement vers le cortex en formant la projection thalamo-corticale. Aucun de ces faisceaux ne croise la ligne médiane dans cette région du cerveau. Ils évitent la région du télencéphale la plus ventrale et transitent tous par la capsule interne (Fig.24 ; Metin et coll., 1997 ; Richards et coll., 1997). Les ARNm codant les récepteurs Robo1 et Robo2 sont détectés dans les neurones corticaux à projections corticofuges et dans les neurones du thalamus dorsal (Whitford et coll., 2002 ; Bagri et coll., 2002). La croissance de leurs axones est par ailleurs repoussée par les Slits *in vitro* (Whitford et coll., 2002). La fonction *in vivo* des Slits dans ce système a tout d'abord été suggérée par l'analyse des souris déficientes en *Nkx21*, un facteur de transcription. L'absence de ce gène cause un défaut de spécification du télencéphale basal et de l'hypothalamus, qui se traduit notamment par une forte diminution de l'expression de Slit1 et Slit2. Les fibres thalamo-corticales pénètrent alors anormalement dans ces régions médianes. De cette observation découle l'hypothèse selon laquelle la perturbation de l'action répulsive des Slits pourrait être à l'origine de ces défauts de guidage (Marin et coll., 2002).

La même année, l'étude des souris déficientes en *slit1* et/ou *slit2* a confirmé cette fonction (Bagri et coll., 2002). Les souris *slit1*^{-/-} n'ont pas de phénotype particulier. En revanche, plusieurs défauts de guidage apparaissent en l'absence de Slit2. La capsule interne est déplacée ventralement et élargie. Les fibres thalamo-corticales se retrouvent déviées partiellement vers le télencéphale ventro-médian. De plus, certaines fibres corticofugales pénètrent anormalement dans l'hypothalamus ou se mettent à traverser la ligne médiane pour fasciculer au sein de la capsule interne controlatérale (Fig.24). Chez les souris doublement déficientes en *slit1/slit2*, ces défauts sont accentués. Les projections corticales progressent massivement au niveau ventral ou à travers la ligne médiane. Elles forment une large commissure ectopique qui occupe une position caudale par rapport à la commissure antérieure. Ces axones peuvent alors dessiner des boucles et recroiser la ligne médiane une nouvelle fois (Fig.24). Cette étude démontre que les molécules Slits ont deux fonctions majeures durant le guidage des afférences et efférences corticales : l'action de Slit2 et de Slit1 dans une moindre mesure, contrôle le positionnement latéral de ces faisceaux d'axones en les repoussant de la région ventrale. Slit1 et Slit2 coopèrent également pour les maintenir dans le télencéphale ipsilatéral et les empêcher de croiser la ligne médiane. Il a été proposé que l'absence des Slits

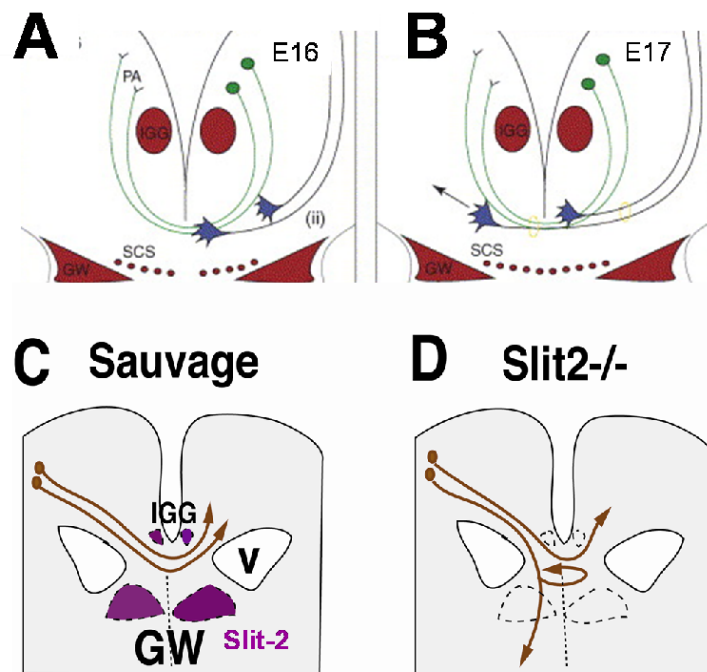


Figure 25: Formation du corps calleux, guidage des axones corticaux à travers la ligne médiane

Représentation schématique de la formation du corps calleux (coupes coronales antérieur vers le haut) à E16 et E17 chez des souris sauvages (A, B, C) et déficientes en *slit2* (C).

Le glial wedge (GW) et l'*indusium griseum* (IGG) sont deux structures gliales symétriques localisées respectivement au niveau ventro-latéral ou dorso-médian du corps calleux (A, B). Ces cellules gliales expriment Slit2 (C). L'anneau subcallosal est formé de cellules se répartissant tout au long de la frontière ventrale du corps calleux. Ces structures entourent les axones du corps calleux en projection à travers la ligne médiane. Les axones du cortex cingulaire (vert) jouent le rôle d'axones pionniers qui accompagnent les axones du neocortex (bleu) traversant la ligne médiane par la suite. L'activité répulsive de Slit2 sécrété par les cellules du GW et de l'IGG contribue à guider ces axones à travers le corps calleux. Leur trajectoire est en effet très perturbée en l'absence de Slit2, certains franchissent la frontière ventrale formée par le GW et pénètrent dans le septum plus ventral.

(Adapté de Lindwall et coll. 2007)

dévoile l'effet d'un facteur attractif exprimé dans le télencéphale médian qui pourrait être la Nétrine1. En effet, celle-ci intervient à plusieurs étapes de la mise en place des projections corticales. Exprimée par des cellules présentes au niveau de la capsule interne, la Nétrine1 attire à distance les axones thalamiques ou corticaux qui doivent y transiter (Richards et coll., 1997 ; Metin et coll., 1997 ; Braisted et coll., 2000). Les fibres quittant le cortex sont également attirées par l'éminence ganglionnaire latérale qui sécrète également la Nétrine1 (Metin et coll., 1997).

3.3.1.2 Guidage des voies de projections commissurales : les Slits canalisent les axones à travers la ligne médiane

➤ Formation du corps calleux

Le corps calleux reliant les deux hémisphères corticaux se forme à une position dorsale du cerveau antérieur (Fig.25). Les axones pionniers proviennent du cortex cingulaire et traversent la ligne médiane à E15 chez la souris (Rash et Richards, 2001 ; Lindwall et coll., 2007). Ils servent par la suite à la fasciculation et au guidage des axones du néocortex (Ghosh et coll., 1990 ; Ghosh et Shatz, 1993). Plusieurs structures cellulaires encadrent les axones corticaux durant leur projection à travers la ligne médiane. Le « glial wedge » (GW) et l'*indusium griseum* (IGG) sont deux structures gliales (exprimant GFAP) bilatérales et symétriques, localisées respectivement au niveau ventro-latéral ou dorso-médian du corps calleux (Shu et Richards, 2001 ; Shu et coll., 2003a). L'anneau subcallosal ou « glial sling » (GS) est de nature neuronale et borde ventralement le corps calleux (Silver et coll., 1982 ; Silver et Ogawa, 1983 ; Silver, 1993 ; Shu et coll., 2003b). Le GW et le GS délimitent la frontière séparant le corps calleux du Septum plus ventral (Fig.25). Ces structures apparaissent nécessaires à la formation du corps calleux. Lors de l'inactivation de la signalisation FGF1/FGFR1 (Smith et coll., 2006) ou chez les souris déficientes en *Nfia* et *Nfib* (« Nuclear factor » ; Shu et coll., 2003a), la formation de l'IGG, du GW et du GS est perturbée. Leur absence partielle ou totale empêche alors la formation du corps calleux. Des expériences d'ablation et de greffes ectopiques démontrent que le GW doit être en effet présent et bien orienté pour guider les axones à travers le corps calleux (Shu et Richards, 2001). Cette structure gliale exerce un effet inhibiteur répulsif sur la croissance des axones corticaux. L'intervention du système Slit/Robo dans ce processus de guidage a rapidement été suggérée. En effet, Le GW comme l'IGG expriment fortement Slit2, alors que Robo1 et Robo2 sont présents à la surface des axones corticaux. En culture, Slit2 mime l'effet chimio-répulsif du GW sur les axones calleux, action qui est par ailleurs supprimée par l'ajout d'anticorps inhibant l'activité des récepteurs Robos (Shu et Richards, 2001 ; Shu et coll., 2003c). De plus, l'inactivation de Slit2 par une technique d'injection *in utero* d'oligonucléotides anti-sens perturbe fortement la projection de ces axones calleux, qu'ils aient ou non croisé la

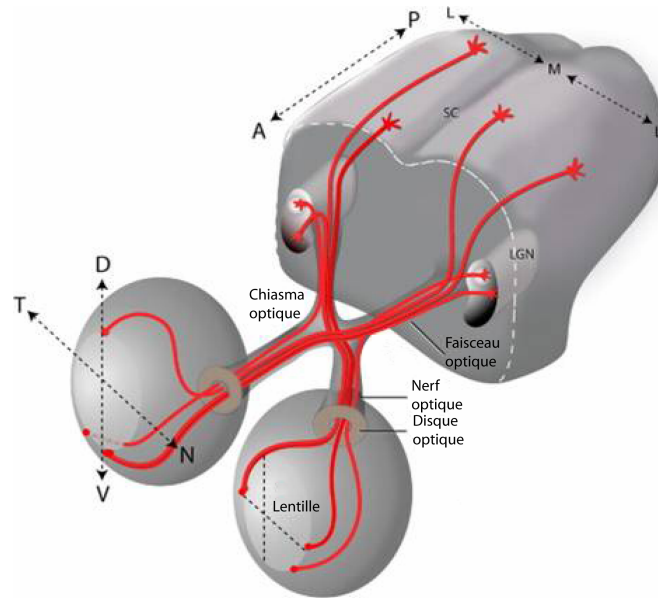


Figure 26: Trajectoire des axones rétiniens et formation du chiasma optique

Représentation schématique de l'organisation de la projection des axones rétiniens. Les axones des cellules ganglionnaires provenant de toute la rétine rejoignent le disque optique, point de sortie de l'œil. Ces axones progressent le long du nerf optique jusqu'au chiasma optique, puis controlatéralement ou ipsilatéralement vers les cibles visuelles principales: le corps genouillé latéral du thalamus (LGN) ou le colliculus supérieur (SC) chez les mammifères).

D: dorsal ; L: latéral ; M: médian, N: nasal ; T: temporal, V: ventral.
(Adapté de Erskine et coll. 2007)

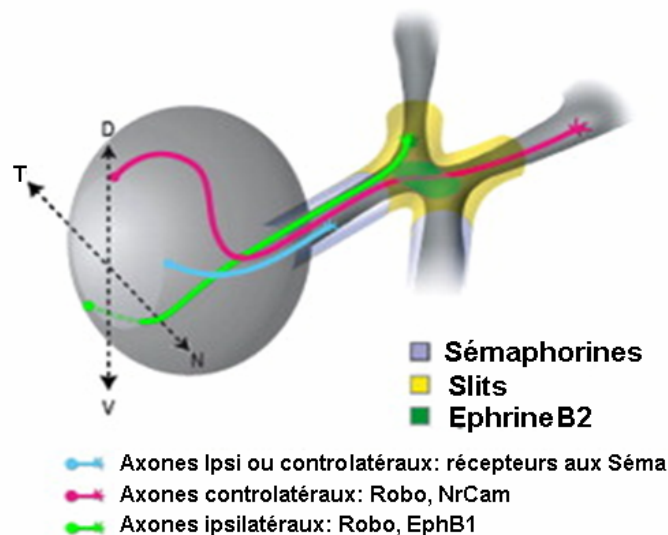


Figure 27: Tri des axones rétiniens au niveau du chiasma optique

Représentation schématique des facteurs de guidage intervenant la mise en place du chiasma optique. La croissance des axones rétiniens sortant de la rétine est restreinte au nerf optique par une signalisation répulsive liée à l'action de la Sema5A puis à celle des Slits. Seuls les axones des cellules ganglionnaires de la rétine ventro-temporale expriment le récepteur EphB1. Ils sont repoussés sous l'action de l'ephrineB2 présente au niveau du chiasma optique et progressent donc ipsilatéralement.

D: dorsal ; N: nasal ; T: temporal, V: ventral
(Adapté de Erskine et coll. 2007)

ligne médiane (Shu et coll., 2003c). La fonction répulsive de Slit2 exprimé par le GW apparaît donc essentielle à deux niveaux. Elle empêche tout d'abord les axones corticaux de pénétrer dans le septum ventral. Puis, une fois qu'ils ont croisé la ligne médiane, le GW repousse ces axones afin qu'ils s'en éloignent et qu'ils pénètrent dans l'hémisphère controlatéral (Shu et Richards, 2001 ; Shu et coll., 2003c). Cette fonction a pu être confirmée par l'analyse des souris *slit2*^{-/-}, chez lesquelles le corps calleux est fortement réduit. Les axones corticaux forment de larges faisceaux caractéristiques, appelés faisceaux de Probst, qui traversent la frontière occupée par le GW et progressent de façon ectopique dans le septum ventral (Bagri et coll., 2002).

Plusieurs autres systèmes de guidage contribuent également à la formation du corps calleux. *Wnt5a* est exprimé comme *slit2* dans le GW et l'IGG. Ce facteur exerce un effet chimio-répulsif en interaction avec le récepteur Ryk présent à surface des axones corticaux. En absence de Ryk, les axones calleux se retrouvent défasciculés et sont incapables de quitter la ligne médiane. Ce système est essentiel seulement après le croisement de la ligne médiane pour repousser les axones vers le territoire cortical controlatéral (Keeble et coll., 2006). De plus, en l'absence du récepteur aux Wnts, Frizzled3, le corps calleux est dramatiquement réduit (Wang et coll., 2006). Par ailleurs, de multiples récepteurs Ephs (B1, B2, B3, A4 et A5) et ligands Ephrines (B1, B2, B3, A5) sont exprimés selon une dynamique précise durant la formation du corps calleux. Ils sont présents à la surface des axones corticaux ou des cellules qui les encadrent. Ces facteurs sont connus pour leurs actions de guidage s'exerçant par contact. Plusieurs combinaisons de simples et doubles inactivations de ces gènes mènent à des défauts du corps calleux qui vont d'une légère dysgénèse à une agénèse totale avec formation de faisceaux de Probst (Orioli et coll., 1996 ; Hu et coll., 2003 ; Mendes et coll., 2006). Enfin, les souris *nétrine1*^{-/-} et *DCC*^{-/-} sont également dépourvues de corps calleux (Serafini et coll., 1996 ; Fazeli et coll., 1997). La fonction de ce système reste inexplicée, car bien que les fibres corticales commissurales expriment fortement le récepteur DCC (Shu et coll., 2000), la Nétrine1 ne semble pas exprimée dans la région du corps calleux (Kennedy et coll., 1994).

➤ Formation du chiasma optique

Chez les mammifères, les cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC) projettent leurs axones vers le colliculus supérieur et le thalamus (Fig.26). A la sortie de la rétine, les axones des RGC se regroupent et fasciculent dans le nerf optique qui s'étend vers la ligne médiane ventrale du diencephale. Les deux nerfs issus des yeux droit et gauche se croisent au niveau de l'hypothalamus en formant le chiasma optique. Chez les espèces animales qui ont les yeux positionnés latéralement tous les axones rétiniens croisent la ligne médiane. En revanche, chez les animaux à vision binoculaire (mammifères), les axones provenant de la rétine ventro-

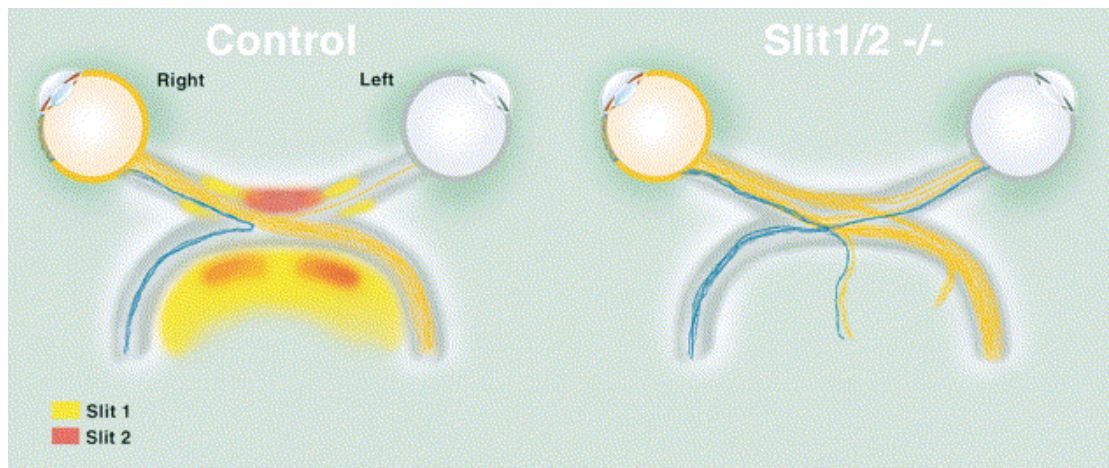


Figure 28: Défauts de formation du chiasma optique chez les souris doublement déficientes en Slit1 et Slit2

Représentation schématique de l'organisation de la projection des axones rétiniens chez des souris sauvages (gauche) ou dépourvues de Slit1 et Slit2 (droite). Les axones rétiniens apparaissent en bleu ou en jaune en fonction de leur trajectoire ipsi ou controlatérale. Chez des souris sauvages, Slit1 et Slit2 sont exprimés dans des zones chevauchantes qui encadrent les axones rétiniens tout au long de leur trajet. Chez les souris *slit1*^{-/-} ; *slit2*^{-/-}, des axones rétiniens sortent de cette voie de projection avant ou après la traversée de la ligne médiane. Certains peuvent pénétrer dans la zone pré-optique et former une seconde commissure ectopique. D'autres sont déviés au franchissement de la ligne médiane ou progressent dans le segment pré-optique controlatéral. (Adapté de Plump et coll. 2002)

temporale ne croisent pas la ligne médiane et projettent ipsilatéralement vers leurs cibles (Fig.26 ; pour revues Erskine et Herrera, 2007 ; Williams et coll., 2004). Un facteur répulsif présent au niveau du chiasma optique inhibe spécifiquement leur croissance en culture. Ceci expliquerait que seuls ces axones ne peuvent pas traverser ce territoire *in vivo* (Wang et coll., 1995). L'EphrineB2 semble responsable de cette action. En effet, celle-ci est exprimée par des cellules de la glie radiaire situées au niveau du chiasma optique, en travers de la trajectoire des axones rétiniens commissuraux (Nakagawa et coll., 2000). En interaction avec le récepteur EphB1 exprimé spécifiquement par les RGC de la rétine ventro-temporale, l'EphrineB2 va repousser les axones à projection ipsilatérale et les empêche ainsi de franchir le chiasma optique (Fig.27). Cette fonction a été confirmée par l'analyse des souris *EphB1^{-/-}*, chez lesquelles ces axones croisent anormalement la ligne médiane (Williams et coll., 2003). A l'inverse, la NrCam est exprimée spécifiquement à la surface des axones rétiniens à projection controlatérale et exerce une action permissive qui leur permet de franchir le chiasma optique (Williams et coll., 2006).

Les RGC expriment Robo1 et Robo2 de façon relativement homogène. Ces récepteurs sont présents à la surface des axones rétiniens tout au long de leur projection. Slit2 est un inhibiteur de la croissance des axones des RGC *in vitro* (Erskine et coll., 2000 ; Niclou et coll., 2000 ; Ringstedt et coll., 2000 ; Plump et coll., 2002). Nous allons voir que le système Slit/Robo participe à la formation du chiasma optique ainsi qu'à différentes étapes de la mise en place de la projection rétinienne. A l'intérieur de la rétine, les axones des RGC différenciées progressent radialement vers un point de sortie constitué par le disque optique. Les gènes *slit1* et *slit2* sont exprimés localement par les RGC et des cellules des couches plus internes (Erskine et coll., 2000 ; Niclou et coll., 2000 ; Ringstedt et coll., 2000). Ils agissent précocement afin d'orienter l'émission des prolongements axonaux des RGC et de les guider vers le disque optique (Thompson et coll., 2006b ; Jin et coll., 2003).

La Sema5A est présente dans un anneau entourant le nerf optique à sa sortie de la rétine. Grâce à son effet inhibiteur, elle restreint la croissance des axones rétiniens au nerf optique et les oriente jusqu'au diencephale (Fig.27 ; Oster et coll., 2003). Le nerf optique se retrouve alors encadré par des cellules qui expriment Slit1 et Slit2. Ces cellules délimitent un corridor répulsif qui canaliserait les axones rétiniens à travers la ligne médiane et imposerait le positionnement rostro-caudal du chiasma optique (Fig.27, 28 ; Erskine et coll., 2000 ; Niclou et coll., 2000 ; Ringstedt et coll., 2000). Cette fonction a été confirmée grâce à l'analyse des souris déficientes en *slit1* et *slit2* (Plump et coll., 2002) et du mutant *astray* pour le gène *robo2* chez le poisson zèbre (Hutson et Chien, 2002 ; Fricke et coll., 2001), qui présentent des phénotypes similaires. Plusieurs erreurs de guidage surviennent lorsque les interactions Slit/Robo sont perturbées, ce qui entraîne une forte désorganisation du chiasma optique (Fig.28). Certains axones rétiniens

croisent la ligne médiane mais poussent anormalement dans le nerf optique controlatéral. D'autres se perdent dans le diencephale ventral et pénètrent dans le territoire pré-optique pour former une seconde commissure ectopique (Plump et coll., 2002). Ce phénotype est néanmoins partiel, certains axones croisant normalement la ligne médiane continuent à progresser caudalement. Par ailleurs, les défauts observés concernent à la fois les axones rétiniens à projections ipsi et controlatérales, qui sont repoussés par Slit2 en culture. Ceci suggère donc que le système Slit/Robo ne participe pas au contrôle de la décision prise par les axones rétiniens, de croiser ou non la ligne médiane.

Dans le diencephale, l'état de fasciculation des projections rétiniennes peut être corrélé avec la répartition des Slits. Exprimés dans l'hypothalamus et l'épithalamus, Slit1 et Slit2 stimulent la condensation du faisceau rétinien passant à proximité de ces régions tout en l'empêchant d'y pénétrer. Les Slits sont à l'inverse absents du thalamus dorsal où certains des axones rétiniens se projettent (Ringstedt et coll., 2000 ; Thompson et coll., 2006a). En l'absence de Slit1 et Slit2, de nombreux axones atteignent tout de même le colliculus supérieur. Il a été démontré dernièrement que le système Slit/Robo régule alors l'étape tardive de synaptogénèse entre les axones des RGC et leurs cibles. En effet, l'action des Slits diminue l'état de branchement de ces axones et le nombre de contacts synaptiques établis (Campbell et coll., 2007).

3.3.1.3 Conclusion

L'absence de Slit1 et de Slit2 a donc un impact considérable sur la mise en place des projections axonales dans le télencéphale. Sécrétés par des structures médianes, ces facteurs répulsifs participent au guidage de plusieurs faisceaux d'axones à progression longitudinale comme le TOL et les projections corticofuges, non seulement en les empêchant de franchir la ligne médiane, mais aussi en stimulant leur fasciculation et en focalisant leur trajectoire. Les Slits participent également à la formation des projections commissurales formant le corps calleux et le chiasma optique. Leur fonction est alors bien différente de celle décrite chez la drosophile, puisqu'ils ne déterminent pas la capacité d'un axone à croiser ou non la ligne médiane. Dans ces systèmes commissuraux, les récepteurs Robos semblent présents et actifs à la surface des axones pré et post-commissuraux. D'autre part, les Slits sont exprimés par des cellules qui ne sont pas positionnées en travers, mais de part et d'autre de la voie de projection des axones traversant la ligne médiane. La fonction des Slits est alors de canaliser la progression de ces axones en leur indiquant où décuquer. Mis à part pour le corps calleux, les différents faisceaux de projection analysés ne sont faiblement ou pas du tout perturbés chez les souris déficientes pour un des gènes *slit1* ou *slit2*. Ceci reflète la redondance fonctionnelle qu'il existe entre ces gènes *in vivo*.

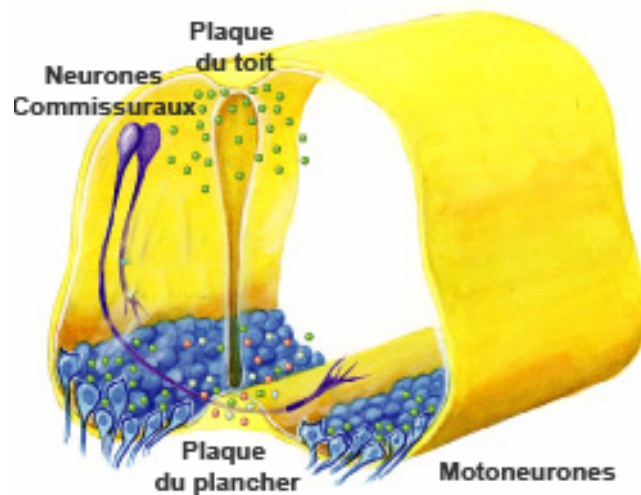


Figure 29: Projection des axones commissuraux de la moelle épinière.

Représentation schématique de la projection axonale des neurones commissuraux de la moelle épinière. Positionnés dorsalement, ces neurones envoient un axone qui pousse vers la plaque du plancher ventrale, la traverse et progresse ensuite dans le territoire controlatéral. Plusieurs facteurs chimiotropiques exprimés dans la plaque du plancher et la plaque du toit guident ces axones au cours de leur projection.

(Adapté de http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04AxonGuidance.asp)

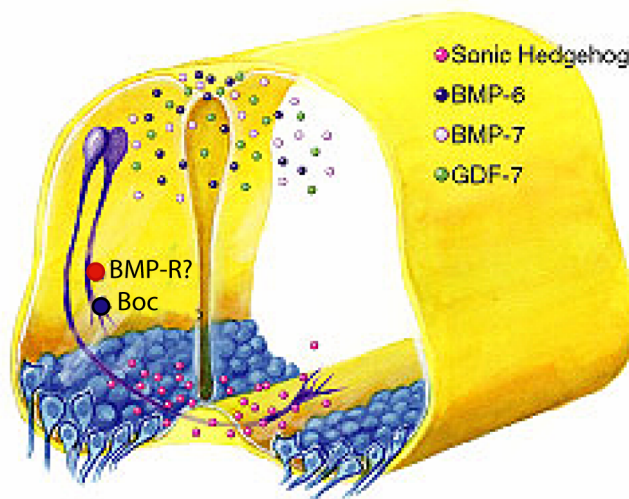


Figure 30: Actions complémentaires de Sonic Hedgehog et des BMPs

Schéma représentant l'expression de Shh (Sonic hedgehog), des BMPs (Bone morphogenic proteins) et de leurs récepteurs respectifs durant la projection des axones commissuraux de la moelle épinière. Les molécules de la famille des BMPs, BMP6, BMP7 et GDF7 (Growth Differentiation Factor 7) sont exprimées par la plaque du toit. BMP7 agit comme un facteur répulsif dorsal sur la croissance des axones commissuraux. Cette action est amplifiée par son association à GDF7 sous la forme d'un hétérodimère. La nature des récepteurs (BMP-R) mis en jeu reste inconnue. Shh, sécrété par la plaque du plancher, agit initialement en interaction avec le récepteur Boc (biregional Cdon-binding protein) pour attirer ventralement les axones commissuraux.

(Adapté de http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04AxonGuidance.asp)

3.3.2 Guidage des axones commissuraux de la moelle épinière

Les neurones commissuraux de la moelle épinière dorsale envoient leurs axones vers la plaque du plancher, qu'ils traversent en formant la commissure ventrale de la moelle épinière (Fig.29). Ces axones pénètrent ensuite le territoire contralatéral, peuvent progresser dorsalement, puis changent brusquement leur trajectoire pour longer la plaque du plancher vers les régions antérieures où ils vont élaborer des connexions variées (Colamarino et Tessier-Lavigne, 1995a ; Kadison et Kaprielian, 2004 ; Nissen et coll., 2005). Les trois gènes *slits* sont co-exprimés avec la Nétrine1 par la plaque du plancher et la zone ventriculaire adjacente (Kennedy et coll., 1994 ; Brose et coll., 1999). Les Slits sont également retrouvés dans la plaque du toit et les motoneurones (Fig.29).

La projection des axones commissuraux de la moelle épinière a été analysée chez l'ensemble des souris déficientes pour un ou plusieurs gènes *slits* ou *robos*. Les résultats obtenus permettent de proposer un modèle expliquant comment le système Slit /Robo contrôle le croisement de la plaque du plancher. Nous allons voir que celui-ci est très proche de celui proposé chez la drosophile. Cependant, une différence essentielle tient à l'absence de Commissureless chez les vertébrés qui a soulevé une question essentielle : comment l'activité des récepteurs Robos est-elle régulée dans les neurones commissuraux ?

3.3.2.1 Guidage des axones pré-commissuraux

➤ Répulsion par le territoire dorsal sous l'action des BMPs

BMP7 (Bone Morphogenetic Protein 7) est une protéine sécrétée au niveau de la plaque du toit, diffusant en un gradient dorso-ventral (Fig.30). *In vitro*, BMP7 est capable de repousser à distance les axones commissuraux et pourrait ainsi permettre l'initiation de leur croissance vers les régions ventrales *in vivo* (Augsburger et coll., 1999). Le GDF7 (Growth Differentiation Factor 7), un autre facteur diffusible de la famille BMP, est exprimé au niveau de la plaque du toit et n'a pas d'activité par lui-même. En revanche, lorsqu'il s'associe à BMP7 sous forme d'un hétérodimère, il potentialise l'effet répulsif de ce partenaire (Butler et Dodd, 2003).

➤ La Nétrine1 et Sonic hedgehog attirent les axones commissuraux ventralement

Nous avons vu précédemment que la Nétrine1 sécrétée par la plaque du plancher exerce un effet chimio-attractif sur la croissance des axones commissuraux. L'action de la Nétrine1 passe essentiellement par son interaction avec DCC (Fig.31, 34 ; Keino-Masu et coll., 1996). Chez les souris *nétrine1^{-/-}* ou *DCC^{-/-}*, la plupart des axones commissuraux ne parviennent pas à atteindre la plaque du plancher. Ils apparaissent plus courts, défasciculés et pénètrent anormalement dans le territoire occupé par les motoneurones (Serafini et coll., 1996 ; Fazeli et coll., 1997 ; Charron et coll., 2003). Néanmoins, certains axones croisent toujours la plaque du plancher en

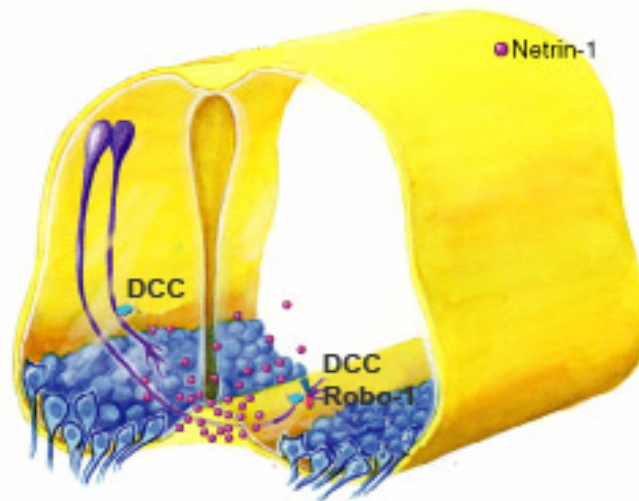


Figure 31: Attraction vers la plaque du plancher sous l'effet de la Netrine1

Schéma représentant l'action du système Nétrine1/DCC durant la projection des axones commissuraux de la moelle épinière. Les axones pré-commissuraux expriment le récepteur DCC (Deleted in colorectal cancer) et sont attirés par la plaque du plancher qui sécrète la Netrine1. Après le croisement de la ligne médiane, une interaction directe entre DCC le récepteur Robo1 pourrait expliquer la désensibilisation des axones post-commissuraux à la Netrine1.

(Adapté de http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname MR04AxonGuidance.asp)

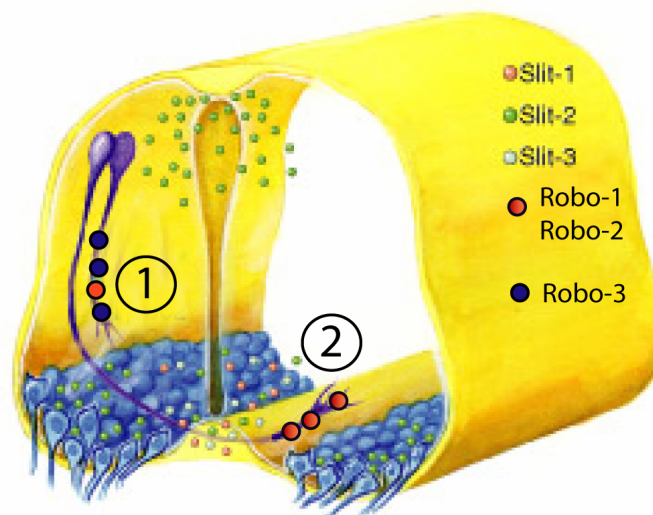


Figure 32: Expression des gènes *slits* et *robos* au cours de la projection des axones commissuraux de la moelle épinière

Schéma représentant la dynamique d'expression des protéines Slits et Robos durant la projection des axones commissuraux de la moelle épinière. Les trois gènes *slits* sont exprimés dans la plaque du plancher et Slit2 est également sécrété par la plaque du toit. A la surface des axones pré-commissuraux (1), le niveau d'expression de Robo3 est élevé, contrairement à Robo1 et Robo2. Ces axones ne sont pas alors sensibles à l'effet répulsif des Slits et peuvent pousser vers la ligne médiane. Robo1 et Robo2, à l'inverse de Robo3, sont ensuite enrichis au niveau des axones post-commissuraux (2) qui deviennent alors sensibles à Slit.

(Adapté de http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname MR04AxonGuidance.asp)

formant une commissure plus fine. De plus, une plaque du plancher issue de souris *nétrine1^{-/-}* exerce toujours un effet stimulateur sur la croissance axonale. Ces observations suggèrent donc l'existence d'un autre facteur attractif (Serafini et coll., 1996). Sonic hedgehog (Shh), présent dans la plaque du plancher, exerce aussi un effet chimio-attractif sur la croissance de ces axones commissuraux (Fig.30). L'utilisation d'un antagoniste classique de la voie de signalisation activée par Shh inhibe l'attraction par la plaque du plancher persistante chez les souris *nétrine1^{-/-}* (Charron et coll., 2003). Chez les souris déficientes en *Gli2*, qui est un facteur de transcription impliqué dans l'induction de la plaque du plancher, celle-ci se retrouve absente. L'expression de Shh disparaît complètement, alors que celle de la nétrine1 persiste partiellement au niveau de la zone ventriculaire. La projection ventrale des axones commissuraux n'est alors que légèrement désorganisée. En revanche, chez les souris *Gli2^{-/-}* ; *nétrine1^{-/-}*, plus aucun axone ne croise la ligne médiane (Matisse et coll., 1999 ; Charron et coll., 2003). Il a été démontré que le récepteur Boc (« biregional Cdon-binding protein ») est impliqué dans la réponse à Shh *in vivo* (Fig.30 ; Okada et coll., 2006). Shh et Nétrine1, co-exprimés dans la plaque du plancher, agissent donc en synergie pour attirer ventralement les axones commissuraux.

➤ Inhibition de l'effet répulsif des Slits sous l'action de Robo3

Les trois récepteurs Robo1, Robo2 et Robo3 sont co-exprimés dans les neurones commissuraux (Brose et coll., 1999 ; Kidd et coll., 1998a ; Long et coll., 2004). Le taux de protéines Robo1 et Robo2 à la surface des cônes de croissances commissuraux est initialement faible et augmente après le croisement de la plaque du plancher (Long et coll., 2004). En revanche, Robo3 n'est exprimé que durant la croissance de ces axones vers la ligne médiane (Fig.32 ; Sabatier et coll., 2004 ; Mambetisaeva et coll., 2005).

Chez les souris *robo3^{-/-}*, les axones commissuraux ne peuvent traverser la plaque du plancher et progressent longitudinalement dans le funiculus ipsilatéral (Sabatier et coll., 2004). *In vitro*, les axones dépourvus de Robo3 sont toujours sensibles à l'effet attractif de la Nétrine1. Ils ne peuvent pas progresser vers un explant de plaque du plancher, à moins que la signalisation répulsive Slit/Robo ne soit inactivée. Par ailleurs, l'inactivation de *slit1/slit2* ou de *robo1* dans un contexte *robo3^{-/-}* permet de restaurer partiellement une projection commissurale. Il a donc été proposé que Robo3 inhibe la répulsion déclenchée par l'interaction entre les Slits et Robo1 (Fig.34). Exprimé initialement, Robo3 permettrait aux axones d'approcher et croiser la plaque du plancher en les rendant insensibles à l'action des Slits. En son absence, cette signalisation répulsive serait anormalement activée avant le croisement de la ligne médiane et empêcherait les axones commissuraux de l'atteindre.

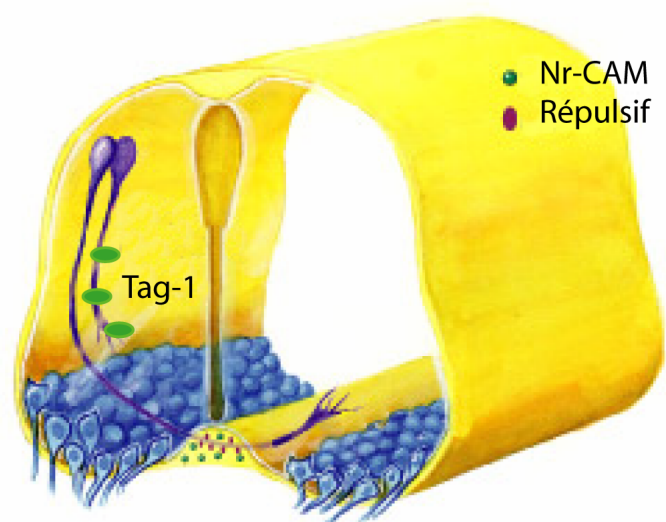


Figure 33: Interactions entre Tag1 et NrCAM aidant à la traversée de la plaque du plancher

Représentation schématique de la dynamique d'expression des molécules d'adhésion NrCAM et Tag1 durant la projection des axones commissuraux de la moelle épinière. NrCAM est localisée dans la plaque du plancher. Elle agit par contact en association avec Tag1 présent à la surface des axones commissuraux, afin de leur permettre de franchir la ligne médiane. Cette action est essentielle car elle permet de masquer l'effet d'un facteur inhibiteur indéterminé, présent à la ligne médiane et déclenchant le collapsus de ces axones.

(Adapté de http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04AxonGuidance.asp)

3.3.2.2 Processus de guidage par contact favorisant le franchissement de la ligne médiane

Il a été suggéré depuis longtemps que des contacts adhésifs avec la plaque du plancher puissent aider les axones à décusser (Fig.33 ; Shiga et Oppenheim, 1991 ; Stoeckli et coll., 1997). Tag1 (transient axonal glycoprotein1) est présente à la surface des axones commissuraux (Dodd et coll., 1988 ; Shiga et Oppenheim, 1991 ; Stoeckli et Landmesser, 1995) et NrCAM (NgCAM (neuron-glia cell adhesion molecule) related cell adhesion molecule) est exprimée au niveau de la plaque du plancher (Krushel et coll., 1993 ; Stoeckli et Landmesser, 1995). Ces deux protéines de la famille des IgCAMs peuvent interagir en *trans* de manière hétérophilique (Suter et coll., 1995). Chez l'embryon de poulet, si la fonction de NrCAM ou de Tag1 est perturbée, de nombreux axones commissuraux ne parviennent pas à traverser la ligne médiane. Ils tournent avant la plaque du plancher et se mettent à la longer (Stoeckli et Landmesser, 1995). La plaque du plancher présente une activité déclenchant le collapsus des axones commissuraux, qui est normalement masquée par la présence de la NrCAM (Stoeckli et coll., 1997). Ainsi, lorsque l'interaction Tag1/NrCAM est perturbée, les axones commissuraux atteignent la plaque du plancher mais se rétractent à son contact.

3.3.2.3 Guidage des axones post-commissuraux

Une fois que les axones commissuraux ont franchi la plaque du plancher, ils doivent la quitter. Ils perdent alors leur sensibilité aux facteurs attractifs présents à la ligne médiane. De plus, ces axones deviennent sensibles à une action répulsive de la plaque du plancher (Guthrie et Pini, 1995). Ce changement de compétence des neurones commissuraux met en jeu à la fois des processus de régulation d'ordre transcriptionnel (Condron, 2002) et traductionnel (Brittis et coll., 2002), ainsi que des interactions fonctionnelles entre récepteurs membranaires (Stein et Tessier-Lavigne, 2001).

➤ Inhibition de l'action attractive de la Nétrine1 sous l'effet des Slits

La sensibilité des axones commissuraux à l'attraction exercée par la plaque du plancher n'est que transitoire. Elle disparaît une fois que ces axones sont entrés en contact avec celle-ci (Shirasaki et coll., 1998). L'activation du système Slit/Robo à cette étape peut permettre de court-circuiter la réponse attractive à la Nétrine1 (Fig.34). Stein et Tessier-Lavigne ont montré par des techniques biochimiques, qu'en réponse à une stimulation par les Slits, le récepteur Robo1 peut interagir directement avec DCC. Dans les axones de la moelle épinière de Xénope, cette association se traduit par une inhibition de l'activité attractive de la nétrine1. L'interaction directe entre le domaine CC1 de Robo1 et le domaine P3 de DCC empêche ce dernier de déclencher les voies de signalisation nécessaires à l'attraction. Le domaine CC1 n'est en revanche pas nécessaire à l'effet répulsif des Slits *in vivo* (Stein et Tessier-Lavigne, 2001).

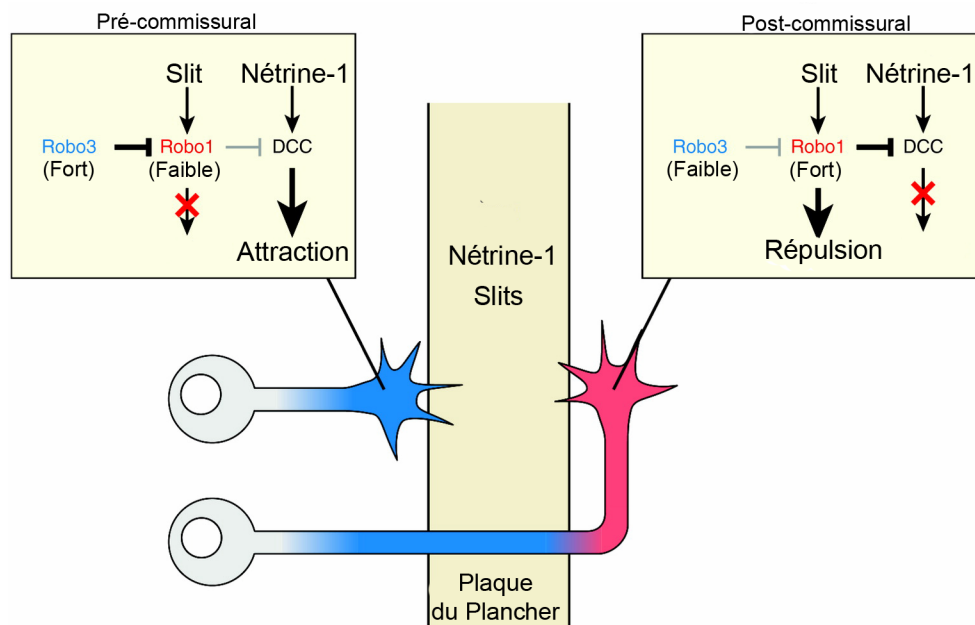


Figure 34: Modèle d'interactions fonctionnelles entre les systèmes Slit/Robo et Netrine1/DCC

Avant le croisement de la ligne médiane, Robo3 fortement exprimé peut inhiber la fonction répulsive de Robo1. Les axones sont alors attirés vers la ligne médiane sous les effets de la Netrine1. Après le croisement de la ligne médiane, l'expression de Robo3 est fortement diminuée contrairement à celle de Robo1 augmente et les axones se retrouvent repoussés par les Slits. De plus, l'attraction par la Netrine1 est inhibée par la liaison de Robo1 à DCC (Deleted in colorectal cancer) qui est également déclenchée par les Slits.

(Adapté de Dickson et coll. 2006)

➤ Acquisition d'une sensibilité à l'action répulsive des Slits et des Sémaphorines

En culture, les axones deviennent sensibles à l'effet répulsif des molécules Slits seulement après avoir croisé la plaque du plancher (Zou et coll., 2000 ; Mambetisaeva et coll., 2005). Chez les souris dépourvues des trois gènes *slits*, contrairement aux simples ou doubles mutants, une grande partie des axones commissuraux se retrouve bloquée dans la plaque du plancher. Ce phénotype rappelle les défauts observés chez le mutant *slit* de drosophile. Les protéines Slits coopèrent donc afin de repousser les axones post-commissuraux hors de la ligne médiane. Robo1 semble agir de façon prépondérante pour cette fonction. Les souris *robo1^{-/-}* ont un phénotype quasiment identique à celui des triples mutants *slits*, alors qu'en absence de Robo2, les axones commissuraux croisent correctement la ligne médiane (Long et coll., 2004). L'augmentation du taux de protéines Robo1 et Robo2 à la surface des axones post-commissuraux peut expliquer l'apparition de cette sensibilité aux Slits. Il apparaît également nécessaire que l'expression de Robo3 soit réprimée à cette étape, afin de lever son inhibition sur l'action répulsive des Slits (Fig.32, 34). La variation du taux de Robo3 à la surface des axones ne dépend pas exclusivement d'une régulation d'ordre transcriptionnel. Elle dépendrait de mécanismes survenant au contact de la plaque du plancher. En effet, l'expression de Robo3 est anormalement maintenue après le croisement de la ligne médiane chez les embryons *Gli2* dépourvus de plaque du plancher (Kadison et coll., 2006). Certains axones parviennent à croiser correctement la plaque du plancher en l'absence des gènes *slits*. Ils ne sont donc pas les seuls facteurs répulsifs permettant aux axones commissuraux de quitter la ligne médiane (Sabatier et coll., 2004). Certaines Sémaphorines sécrétées (classe 3) sont exprimées dans la plaque du plancher et la partie ventrale de la moelle épinière (Fig.35). Les axones commissuraux sont sensibles à l'action inhibitrice de la Sema3B et la Sema3F, mais seulement après avoir franchi la plaque du plancher. En l'absence de leur récepteur Neuropiline2, des défauts de guidage surviennent pendant et après le croisement de la ligne médiane. Certains axones sont bloqués à l'intérieur de celle-ci ou poussent en spirales et décussent à nouveau (Zou et coll., 2000). Les Sémaphorines coopèrent donc avec les Slits pour repousser les axones commissuraux et les empêcher de rester dans la ligne médiane ou de la recroiser.

3.3.2.4 Positionnement latéral des axones post-commissuraux

Après avoir quitté la ligne médiane, les axones commissuraux tournent longitudinalement et rejoignent le funiculus latéral. Celui-ci se divise en deux zones, médiane et latérale, occupées respectivement par des fibres exprimant Robo1 ou Robo2 et séparées par une zone intermédiaire d'expression mixte (Fig.36). L'analyse des souris déficientes en Robo1 ou Robo2

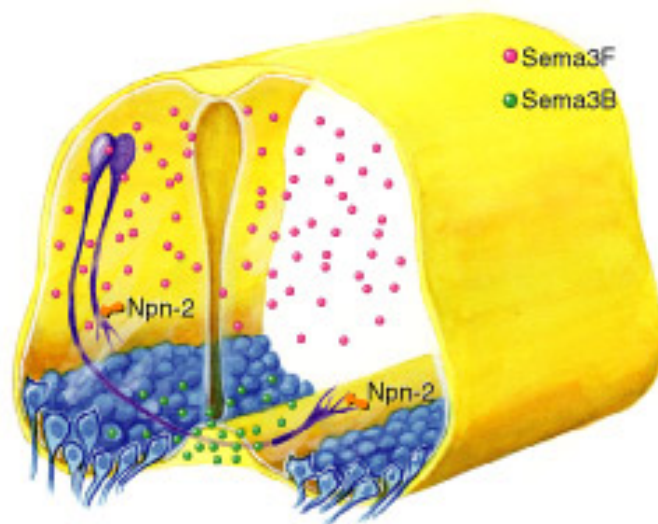


Figure 35: Fonction répulsive des Sémaphorines de classe 3

Représentation schématique de la dynamique d'expression des Sémaphorines de classe 3 et de leur récepteur Neuropiline2 (Npn2) durant la projection des axones commissuraux de la moelle épinière. La Sema3F a une expression étendue dans la moelle épinière, mais se trouve exclue de la plaque du plancher où est présente la Sema3B. Par leur interaction avec le récepteur Npn2, ces facteurs répulsifs vont agir spécifiquement sur les axones post-commissuraux afin de les exclure de la plaque du plancher et de les guider dans la moitié de la moelle épinière controlatérale.

(Adapté de http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04AxonGuidance.asp)

confirme que l'activité de ces récepteurs spécifie le positionnement latéral de ces fibres longitudinales (Long et coll., 2004). Par exemple, les fibres à projections latérales sont déplacées dans la zone médiane en l'absence de Robo2. D'autre part, chez le triple KO *Slit*, le funiculus latéral est extrêmement réduit et les quelques axones qui parviennent à traverser la plaque du plancher se positionnent dans une région trop médiane. Les Slits sécrétés dans la moelle épinière ventrale spécifient ainsi le positionnement latéral des axones post-commissuraux au sein des voies de projection longitudinale. Les ephrines de classe B sont par ailleurs exprimées dans la région dorsale de la moelle épinière. La synthèse locale des récepteurs EphA2 et EphB2 est activée dans le segment contralatéral des axones (Imondi et Kaprielian, 2001 ; Brittis et coll., 2002). Ce système empêche les axones post-commissuraux de progresser trop dorsalement. Il contribue ainsi à spécifier le point de l'axe dorso-ventral où ils vont tourner longitudinalement (Fig.36 ; Imondi et Kaprielian, 2001).

3.3.2.5 Conclusion

L'activité du système Slit/Robo détermine donc la compétence des axones commissuraux de la moelle épinière à croiser la ligne médiane. Celle-ci dépendrait de la dynamique d'expression des récepteurs Robos à la surface de ces axones, qui permet aux axones commissuraux d'inverser leur réponse à un même environnement moléculaire afin de progresser vers la plaque du plancher, puis de la quitter. La répulsion déclenchée par l'association des Slits à Robo1 aurait une action inhibitrice dominant l'attraction induite par le système Nétrine1/DCC. Ce contrôle pourrait être levé par la présence de Robo3 qui semble inactiver Robo1. Robo3 agit donc comme un homologue fonctionnel de Commissureless chez les vertébrés en inactivant la capacité des axones commissuraux à répondre aux Slits. Ces deux facteurs présentent des caractéristiques communes : leur expression s'éteint après le croisement de la ligne médiane et leur absence conduit à la disparition de nombreuses commissures. Cependant, bien que le rôle de Robo3 dans le développement des projections commissurales soit établi, ses mécanismes d'action restent indéterminés. Ils pourraient passer par une interaction directe entre Robo3 et les récepteurs Robo1, Robo2 et DCC présents à la membrane axonale, hypothèse que je défendrai par la suite. Par ailleurs, Robo3 n'est pas toujours indispensable au croisement de la ligne médiane. En effet, ce récepteur n'est pas exprimé dans les axones formant le corps calleux, le chiasma optique et les autres commissures du télencéphale, qui se développent toutes normalement en l'absence de cette protéine.

Pour conclure ce chapitre sur la fonction du système Slit/Robo dans la moelle épinière, il convient de mentionner que les récepteurs Robo1 et Robo2 sont également exprimés par les motoneurones ventraux, dont les axones quittent la moelle épinière ventralement, sans décusser (Brose et coll., 1999). En culture, leur croissance est repoussée par les cellules de la

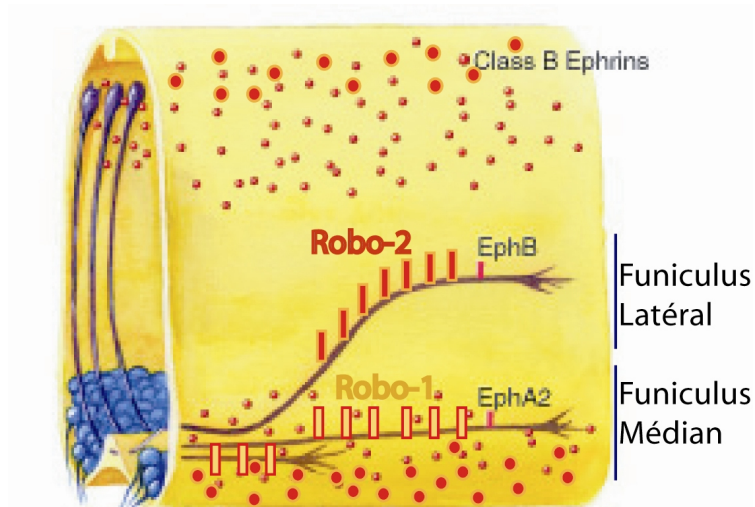


Figure 36: Positionnement latéral des axones post-commissuraux sous l'action concertée des Slits et des Ephrines de classe B

L'expression de Robo1 et Robo2 à la surface des axones post-commissuraux spécifie le positionnement de ces fibres au sein du funiculus médian ou latéral, en réponse aux Slits présents dans la région ventrale. Par ailleurs, les Ephrines de classe B sont exprimées dans la plaque du plancher et la région dorsale de la moelle épinière. Les axones commissuraux exprimant le récepteur EphB2 ont une trajectoire plus dorsale par rapport à ceux exprimant l'EphA2. Ils tournent longitudinalement en étant repoussés à la frontière d'expression dorsale des Ephrines de classe B. (Adapté de http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04AxonGuidance.asp)

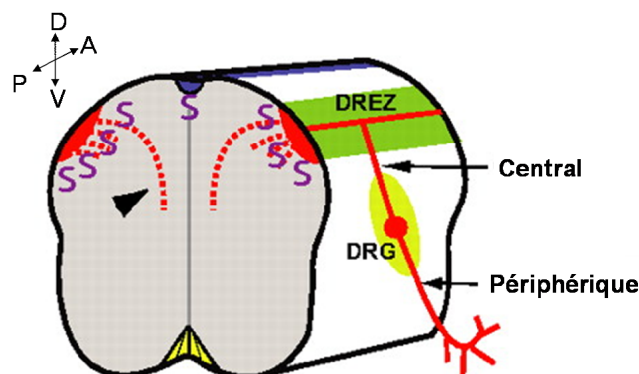


Figure 37: Fonction inattendue du système Slit/Robo durant le guidage des axones sensoriels dans la moelle épinière

Représentation schématique de la projection des neurones des ganglions rachidiens (DRG). L'axone central des neurones des DRG pénètre dans la moelle épinière par le point d'entrée de la racine dorsale (DREZ) puis bifurque en deux branches progressant longitudinalement. Les Slits (S) présents dans la moelle épinière dorsale orientent ces branches dans leur voie projection longitudinale. Chez les doubles mutants *slit1/slit2* ou *robo1/robo2*, ces branches pénètrent anormalement dans la région ventrale de la moelle épinière. Par ailleurs, Les Slits agissent sur les axones sensoriels périphériques ayant atteint leurs cibles en stimulant le branchement et l'élongation de collatérales axonales.

D: dorsal; A: antérieur; V: ventral ;P: postérieur
(Adapté de Ma et coll. 2007).

plaque du plancher ou par des cellules COS sécrétant Slit2 (Brose et coll., 1999 ; Guthrie et Pini, 1995). D'après ces expériences *in vitro*, l'action répulsive des molécules Slits pourrait donc empêcher les motoneurones de projeter leurs axones à travers la ligne médiane et/ou les pousser vers leur point de sortie de la moelle épinière, action qui reste à confirmer *in vivo*. Par ailleurs, nous avons vu que les Slits stimulent le branchement et l'élongation de collatérales des axones sensoriels issus des ganglions rachidiens (Wang et coll., 1999). Il avait alors été proposé que cette action s'exerce au moment où ces axones pénètrent dans la moelle épinière dorsale et bifurquent en deux branches poussant avec des orientations opposées (Fig.37). Cette hypothèse est aujourd'hui remise en cause : chez les doubles mutants *slit1/slit2* ou *robo1/robo2*, ces deux branches axonales sont correctement formées, mais l'une d'elles pénètre prématurément vers la moelle épinière ventrale par manque d'interactions répulsives. L'action du système Slit/Robo à ce niveau est donc de canaliser la croissance de ces branches axonales et non de stimuler leur formation (Fig.37). Cette action positive des Slits est en fait mise en jeu lorsque les axones sensoriels issus des DRG atteignent leurs cibles périphériques (Fig.37 ; Ma et Tessier-Lavigne, 2007).

3.3.3 Rôle du système Slit/Robo dans le guidage de la migration tangentielle

De nombreuses études montrent que Slits et Robos dirigent également la migration neuronale. En culture, les Slits repoussent les cellules des crêtes neurales mais aussi plusieurs populations de neurones à migration tangentielle comme les interneurones corticaux (Zhu et coll., 1999), olfactifs (Wu et coll., 1999) et les neurones précérébelleux (Causeret et coll., 2002). Mon laboratoire a participé à la confirmation de cette fonction de guidage *in vivo* (Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2004 ; Marillat et coll., 2004). Je vais brièvement revenir sur les données concernant la migration des interneurones du télencéphale, avant de présenter en détail le système des neurones précérébelleux que j'ai étudié durant ma thèse. Nous verrons que ce système est probablement le seul qui permette d'aborder et d'élucider la fonction du système Slit/Robo dans le contrôle du croisement de la ligne médiane par des neurones en migration.

3.3.3.1 Migration des interneurones du bulbe olfactif

Les neuroblastes à l'origine des interneurones du bulbe olfactif principal font partie des neurones du système nerveux central dont la prolifération et la migration persistent chez l'adulte (Lois et Alvarez-Buylla, 1994). Ils naissent dans la zone sous-ventriculaire antérieure qui borde les ventricules latéraux (Luskin, 1993 ; Altman, 1969) et migrent antérieurement jusqu'au bulbe olfactif en empruntant la voie de migration rostrale (VMR ; Marin et Rubenstein, 2003). Ce mode de migration tangentielle est essentiellement neurophilique (Fig.38 ; Rousselot et coll., 1995).

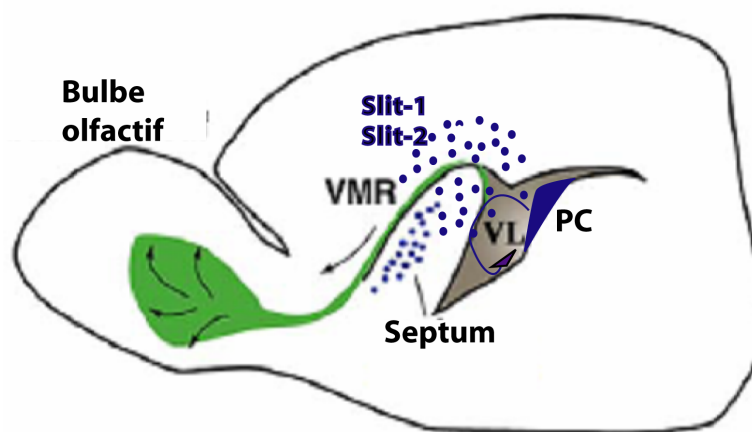


Figure 38: Fonction de guidage du système Slit/Robo durant la migration tangentielle des précurseurs des interneurones olfactifs

Représentation schématique des précurseurs des interneurones en migration (Coupe sagittale). Les précurseurs des interneurones olfactifs naissent dans la zone sous ventriculaire et migrent vers le bulbe olfactif en suivant la voie de migration rostrale (VMR). Les Slits, sécrétés par le septum (S) et le plexus choroïde (PC) repoussent ces interneurones de façon à les orienter antérieurement vers leur région cible. Le flux cérébro-spinal agitant le liquide céphalo-rachidien (Flèche circulaire) contenu dans les ventricules latéraux (VL) est orienté antérieurement au niveau de la VMR. Il entraîne les Slits sécrétés au niveau du Plexus choroïde afin de les répartir selon un gradient caudo-rostral.

Des facteurs de guidage environnementaux orientent la migration de ces neuroblastes vers le bulbe olfactif. En effet, des cellules prélevées dans la zone sous-ventriculaire puis transplantées dans la VMR orientent correctement leur migration en direction du bulbe olfactif (Doetsch et Alvarez-Buylla, 1996 ; Hu et Rutishauser, 1996). Ceci ne semble pas être dû à la sécrétion d'un facteur attractif par ce territoire cible (Jankovski et coll., 1998). *In vitro*, les plexus choroïdes ou le septum exprimant les Slits repoussent les neuroblastes issus de la zone sous-ventriculaire. La signalisation Slit/Robo paraît essentielle à cette action. En effet, si le domaine extracellulaire des récepteurs Robos est ajouté au milieu de culture, la répulsion induite par le septum est diminuée (Wu et coll., 1999). D'autre part, des cellules transfectées avec *slit1* ou *slit2*, placées face à un explant de zone sous-ventriculaire en culture ou greffées sur le trajet de la VMR, ont une action répulsive sur les neuroblastes olfactifs (Chen et coll., 2001a ; Hu, 1999 ; Wu et coll., 1999 ; Liu et Rao, 2003). Slit1 agit alors en facteur directionnel répulsif mais ne bloque pas leur migration (Fig.38 ; Ward et coll., 2003). Chez les souris déficientes en *slit1*, les neuroblastes olfactifs issus de la SVZ migrent ectopiquement vers les régions caudales et pénètrent anormalement dans le corps calleux (Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2004). Pour cette fonction, Slit1 pourrait coopérer avec le facteur MIA ("Migration Inducing Activity"). Sécrété par les astrocytes, il stimule le déplacement des précurseurs neuronaux au sein de la VMR *in vitro* (Mason et coll., 2001). Il a été suggéré récemment que le flux cérébro-spinal agitant le liquide céphalorachidien contenu dans les ventricules latéraux est essentiel à la répartition et à l'action des Slits. Ce flux orienté antérieurement entraîne les Slits sécrétées au niveau du plexus choroïde et contribuerait à la formation d'un gradient caudo-rostral. Chez les souris portant une délétion du gène *Polaris*, dont les cellules épendymales ne peuvent plus générer le flux cérébro-spinal, la migration rostrale des dérivés de la zone sous-ventriculaire est désorganisée (Fig.38 ; Sawamoto et coll., 2006).

Ces neuroblastes expriment également Slit1, qui semble agir de façon cellulaire autonome pour favoriser leur migration en chaîne. Les transcrits de *robo2* et *robo3* sont également exprimés, mais leur rôle *in vivo* n'a pas été démontré (Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2004).

3.3.3.2 Migration des interneurones corticaux

Les précurseurs des interneurones GABAergiques corticaux sont principalement issus de l'éminence ganglionnaire médiane. Les éminences ganglionnaires latérale et caudale participent également, mais dans une moindre mesure, à leur production. Ces neurones migrent de façon tangentielle en plusieurs vagues successives qui contournent le striatum et progressent jusqu'au cortex (Fig.39 ; Anderson et coll., 1997 ; Tamamaki et coll., 1997 ; De Carlos et coll., 1996 ; Nery et coll., 2002 ; voir pour revue Marin et Rubenstein, 2003 ; Andrews et coll., 2006). Slit1 est fortement exprimé dans les éminences ganglionnaires, ainsi que dans

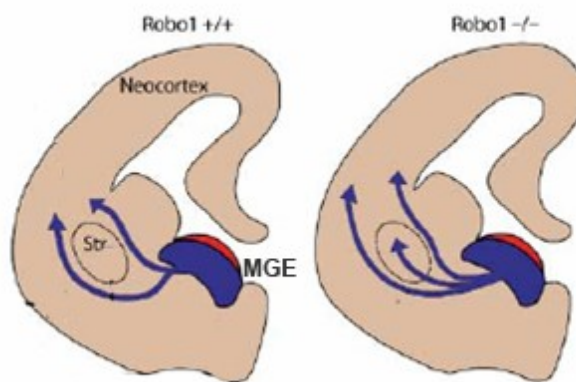


Figure 39: Migration des précurseurs des interneurons olfactifs depuis l'éminence ganglionnaire médiane

Représentations schématiques des voies de migrations des interneurons corticaux chez des souris sauvages ou déficientes en *robo1* (Coupes coronales, antérieur vers le haut). Les interneurons corticaux naissent dans l'éminence ganglionnaire médiane et migrent tangentiellement jusqu'au cortex en empruntant plusieurs voies de migration qui contournent le striatum (Str). En absence de Robo1, certains de ces neurones pénètrent anormalement dans cette région (Adapté de Andrews et coll. 2007).

l'hypothalamus ventro-médian comme Slit2 (Yuan et coll., 1999b ; Bagri et coll., 2002 ; Marillat et coll., 2002 ; Whitford et coll., 2002 ; Wichterle et coll., 2002). *In vitro*, des explants issus de ces régions exercent une action répulsive sur la migration des interneurones corticaux. Cet effet est mimé par Slit1 ou Slit2 et inhibé lorsque la partie extracellulaire de Robo est ajoutée dans le milieu de culture (Zhu et coll., 1999 ; Wichterle et coll., 2002). Les Slits pourraient donc déclencher le départ en migration de ces interneurones en les repoussant depuis les éminences ganglionnaires, puis les orienter vers le cortex en les empêchant de progresser ventralement.

Ce modèle a été cependant remis en cause, car la migration tangentielle des interneurones corticaux se fait normalement chez les souris *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}* (Marin et coll., 2003). Cependant, les interneurones corticaux expriment fortement Robo1. En son absence, leur nombre se trouve réduit de 30% et certains pénètrent anormalement dans le striatum (Fig.39 ; Andrews et coll., 2006). Cette action de Robo1 pourrait donc être indépendante des Slits. De plus, les Slits peuvent agir sur la morphologie des interneurones. En effet, après plusieurs jours en culture, la sensibilité des interneurones change. Ils ne sont plus sensibles à l'effet répulsif des Slits, qui au contraire va stimuler la croissance et l'élongation de leurs neurites (Sang et coll., 2002). La longueur et le branchement neuritique des interneurones sont réduits en l'absence de Robo1 *in vivo*, ce qui suggère que ce récepteur intervient dans ces processus (Andrews et coll., 2006).

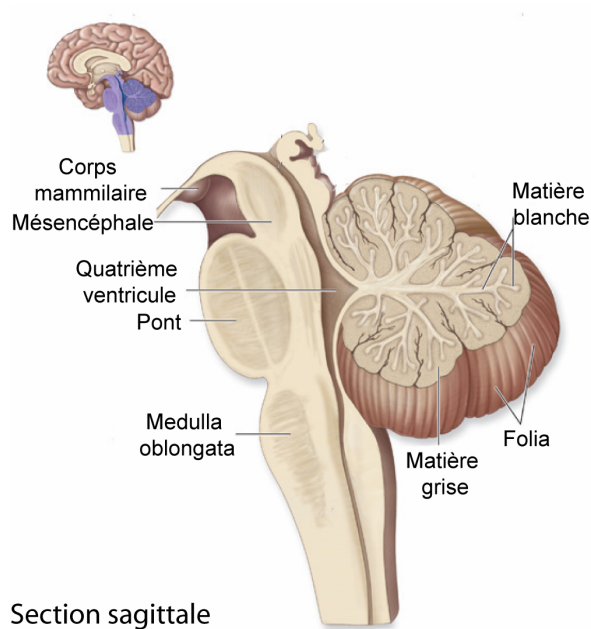


Figure 40: Le cervelet des vertébrés

Dessin représentant le cervelet et sa localisation dans un cerveau humain. Le cervelet est une structure cérébrale foliée apposée sur la *medulla oblongata* (ou bulbe rachidien) dans la région postérieure de l'encéphale. La *medulla oblongata* forme avec la région du pont plus antérieure le tronc cérébral.

(Adapté de <http://www.academic.kellogg.cc.mi.u>)



Figure 41: Cyto-architecture et connectivité du cervelet

Dessin de Ramón y Cajal représentant les différents types cellulaires du cervelet et leurs connectivités.

(Adapté de Cajal, 1911)

4 Développement des neurones précérébelleux

4.1 *Les neurones précérébelleux, origines des afférences cérébelleuses*

Le cervelet présente une morphologie plus ou moins complexe chez tous les vertébrés (Nieuwenhuys, 1967 ; Larsell, 1970). Il est apposé sur la *medulla oblongata* (ou bulbe rachidien ; Fig.40), à laquelle il est relié par trois paires de pédoncules inférieurs, médians et supérieurs, par lesquels convergent toutes les fibres afférentes ou efférentes.

Le cervelet est un élément important du système moteur qui intervient dans le contrôle et l'apprentissage sensori-moteur du mouvement. Il reçoit, directement ou indirectement, des informations en provenance des systèmes sensoriels périphériques des muscles et de la peau, vestibulaire, auditif et visuel. Ces informations sensorielles sont toutes essentielles à la coordination nécessaire à la locomotion, au maintien de l'équilibre et au contrôle des mouvements de la tête et des yeux. Les pathologies cérébelleuses engendrent pour la plupart une défaillance des fonctions motrices, alors que les déficits sensoriels restent très limités. Le terme « neurones précérébelleux » (NPC) qualifie tous les neurones projetant leurs axones au cervelet. On distingue plusieurs noyaux précérébelleux répartis dans le tronc cérébral (région du pont ou médullaire) et la moelle épinière. Ce système constitue la principale information sensorielle entrante depuis la périphérie. Il permet au cervelet d'agir comme un centre de coordination, qui intègre cette boucle de contrôle sensorielle afférente afin d'accorder finement les mouvements et l'équilibre du corps. Le cervelet agit ainsi comme un régulateur de la fonction motrice.

L'organisation laminaire du cervelet fut décrite pour la première fois par Ramón y Cajal qui, grâce à la méthode d'imprégnation de Golgi, a décrit la plupart des types neuronaux cérébelleux ainsi que leurs connectivités (Fig.41). Les fibres grimpantes et moussues issues des neurones précérébelleux constituent les principales afférences cérébelleuses. Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude de la fonction du système Slit/Robo durant le développement de neurones précérébelleux du tronc cérébral. Ces neurones à migration tangentielle ont une particularité intéressante : leurs axones croisent tous la plaque du plancher pour progresser vers la moitié du cervelet controlatérale, alors que le comportement de leurs corps cellulaires est ensuite variable. Ils peuvent soit croiser complètement la ligne médiane, soit s'arrêter juste avant celle-ci. Avant de décrire en détail la migration de ces neurones précérébelleux, j'aimerais présenter les spécificités liées à l'organisation de ces systèmes neuronaux et leur origine commune.

4.1.1 L'olive inférieure, source des fibres grimpantes

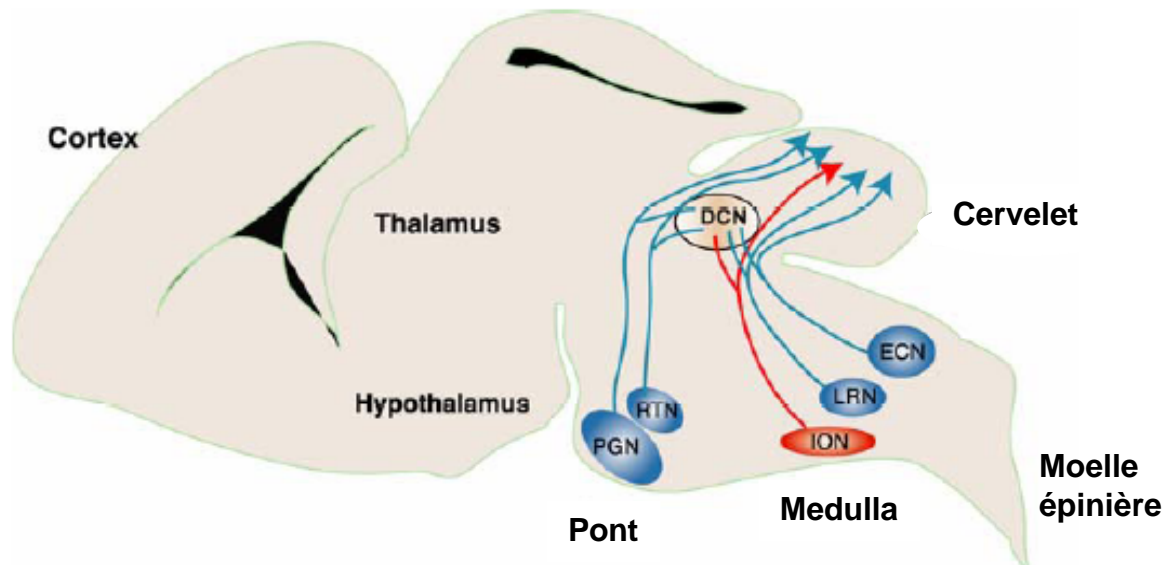


Figure 42: Noyaux du système précérébelleux

Représentation schématique de la position des principaux noyaux précérébelleux du tronc cérébral et de leurs projections respectives vers le cervelet (coupe sagittale) chez la souris. Cette représentation simplifiée montre la position respective de ces différents noyaux. Les noyaux propres du pont regroupent le noyau gris (PGN) et le noyau réticulotegmental (RTN) qui sont localisés dans la région ventrale du pont. Le noyau réticulaire latéral (NRL), le noyau cuneatus externe (ECN) et le noyau de l'olive inférieure (ION) sont localisés dans la medulla. Tous ces noyaux projettent vers le cervelet et envoient des collatérales vers les noyaux profonds (DCN). Les fibres grimpantes apparaissent en rouge alors que les fibres moussues sont en bleu.

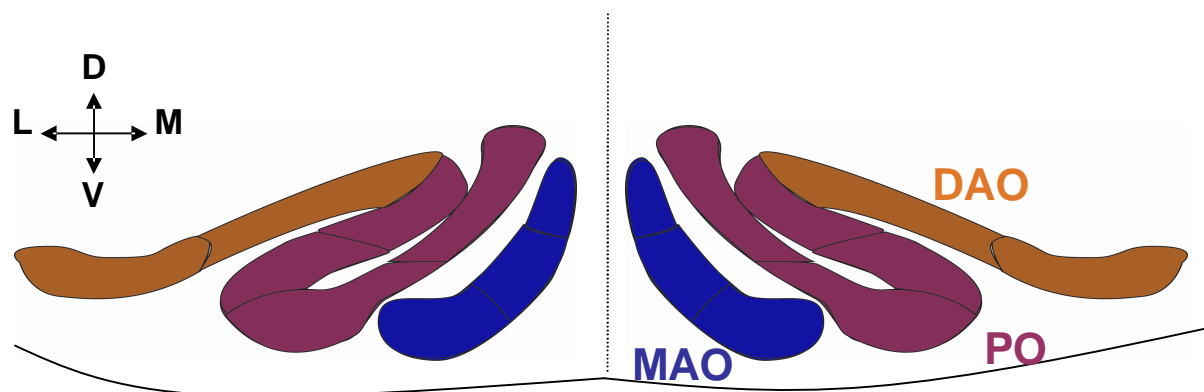


Figure 43: Cytoarchitecture du noyau olivaire

Représentation schématique d'une coupe coronale du noyau olivaire. Cette structure neuronale symétrique (Ligne médiane en pointillés) est lamellée et subdivisée en trois domaines principaux: l'olive accessoire médiane (MAO), l'olive principale (PO), l'olive accessoire dorsale (DAO)

Les fibres grimpantes glutamatergiques excitatrices (Shen et coll., 2002a) proviennent exclusivement du noyau de l'olive inférieure situé dans le tronc cérébral. La projection olivaire constitue l'unique afférence extra-cérébelleuse directe des cellules de Purkinje du cervelet (Desclin, 1974). L'olive inférieure (OI), également appelée olive bulbaire, a été décrite pour la première fois par Gabriel Fallope au 17^{ème} siècle (Willis et coll., 1664 se référer à De Zeeuw et coll., 1998). L'OI est présente chez toutes les espèces de vertébrés (Kooy, 1917 ; Kappers, 1947). Cette structure neuronale paire se situe dans la partie ventro-médiane de l'extrémité caudale du tronc cérébral, à la jonction avec la moelle épinière (Fig.42 ; région médullaire). Elle se positionne au-dessus de la décussation pyramidale. L'OI est constituée de deux noyaux symétriques et adjacents à la plaque du plancher. Chez les mammifères, l'OI forme une structure laminaire, regroupant trois sous-noyaux (ce qui lui vaut l'appellation de complexe olivaire) : l'olive principale (PO), l'olive accessoire médiane (MAO), l'olive accessoire dorsale (DAO ; Schild, 1970 ; Whitworth et Haines, 1986 ; Gwyn et coll., 1977 ; Fig.43). Ces trois lamelles peuvent elles-mêmes être subdivisées en plusieurs sous-noyaux (Azizi et Woodward, 1987) sur des critères morphologiques, hodologiques (afférences ou efférences communes) et biochimiques (expression spécifique de certains marqueurs moléculaires). Cette architecture lamellée n'est acquise que durant les étapes tardives du développement olivaire embryonnaire (entre E15 et E18 chez la souris), à l'issue de la migration de ces neurones.

La projection olivaire est exclusivement croisée (Sotelo et coll., 1984). Dès le XIX^{em} siècle, Meynert avait observé qu'une lésion cérébelleuse s'accompagnait d'une atrophie de l'olive inférieure controlatérale (voir Brodal et Kawamura, 1980). Ceci peut également être vérifié par des expériences de traçage à la peroxydase (Bourrat et Sotelo, 1988) ou au Dil (Fig.44). Une injection unilatérale d'un traceur axonal dans le cervelet permet de visualiser uniquement des neurones du complexe olivaire controlatéral. Chaque neurone olivaire envoie un axone qui émerge à partir du corps cellulaire ou de la base d'une dendrite. Cet axone va s'orienter vers la plaque du plancher, qu'il croise avant de traverser l'olive controlatérale. Les axones olivaires se regroupent ensuite en un faisceau progressant dorsalement puis antérieurement vers le cervelet. Ils y pénètrent par le corps restiforme du pédoncule cérébelleux inférieur (Brodal et Kawamura, 1980) et projettent vers les cellules de Purkinje ou vers les noyaux profonds (Fig.42 ; Brodal et Kawamura, 1980 ; Van Der Want et coll., 1989). La morphologie de l'arborisation terminale des fibres grimpantes sur les cellules de Purkinje a été décrite initialement par Ramón y Cajal (1888) : leur terminaison ramifiée s'enroule autour des dendrites des cellules de Purkinje (d'où le nom de fibres grimpantes) en formant de nombreuses synapses. Chez l'adulte, chaque cellule de Purkinje est mono-innervée, c'est-à-dire connectée par une seule fibre grimpante (Cajal, 1911 ; Eccles et coll., 1964). En revanche, une fibre grimpante innerve entre trois à cinq cellules de Purkinje.

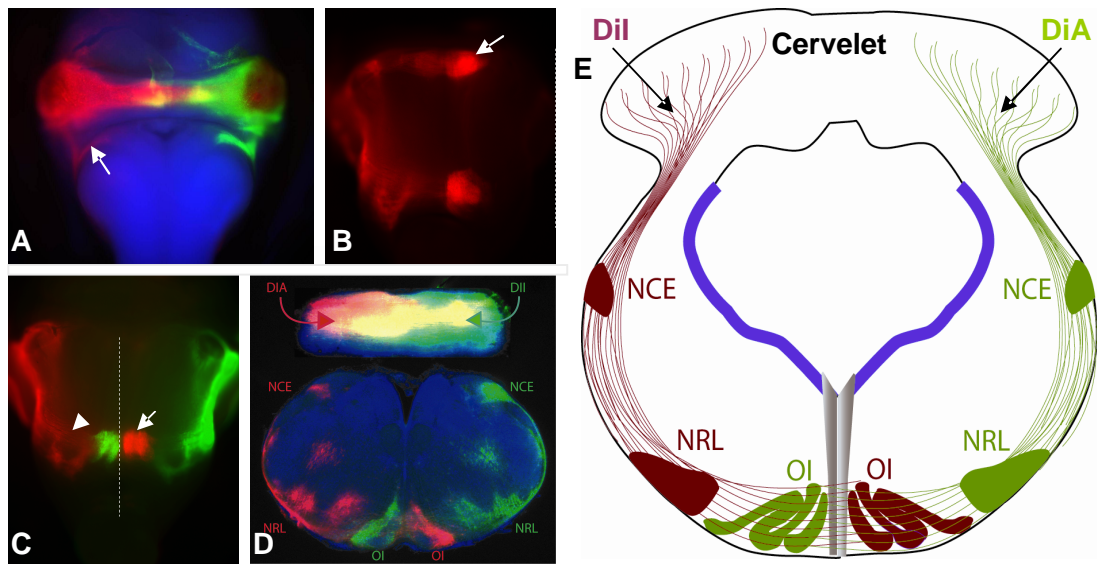


Figure 44: Traçage axonal des neurones précérébelleux du tronc cérébral

Images prises en microscopie à épifluorescence de cerveaux marqués par une technique de traçage axonal, consistant en l'injection de cristaux de DiI (rouge) ou DiA (vert) dans chaque hémicervelet d'un embryon de souris à E18. Observations *in toto* (vue dorsale en A ou ventrale en B et C, antérieur vers le haut) ou en coupe coronale (D) (niveau médullaire) associée à un schéma explicatif (E) (Ligne médiane en pointillés). Cette technique permet de tracer unilatéralement tous les neurones précérébelleux du tronc cérébral et ainsi de visualiser leur localisation et la nature de leur projection. L'olive inférieure (OI, flèche en C) constitue un noyau bilatéral ventral, accolé à la plaque du plancher et dont la projection est entièrement décussée. Le noyau réticulaire latéral (NRL, tête de flèche en C) et le noyau cuneatus externe (NCE, flèche en A) occupent respectivement des positions ventro-latérale et dorsale dans la partie médullaire du tronc cérébral. Ils projettent ipsilatéralement vers le cervelet. Les neurones propres du pont (Flèche en B) sont positionnés à la pointe antérieure ventrale du tronc cérébral et projettent majoritairement vers le cervelet controlatéral.

4.1.2 Les noyaux précérébelleux à fibres moussues du tronc cérébral

Les fibres moussues ont également été découvertes par Ramón y Cajal en 1888. Ces afférences regroupent des fibres d'origines diverses, soit internes en provenance des noyaux profonds, soit externes au cervelet depuis différents noyaux précérébelleux (Palay et coll., 1974). Ces noyaux sont tous situés dans la moelle épinière ou le tronc cérébral (Fig.42 ; Tolbert et coll., 1978 ; Gould, 1979 ; Matsushita et coll., 1979 ; Gould, 1980). Les fibres moussues sont principalement glutamatergiques et possèdent de larges extrémités axonales dénommées « rosettes » qui contactent les dendrites des grains. Ces cellules sont également contactées par les cellules de Golgi et ces trois éléments forment un complexe synaptique appelé glomérule (Altman et Bayer, 1997). Les fibres moussues envoient également des collatérales vers les noyaux profonds (Fig.42 ; Shinoda et coll., 1992 ; Mihailoff, 1994 ; Mihailoff, 1993).

Nous avons étudié trois populations de neurones à fibres moussues qui sont situées comme l'OI dans le tronc cérébral : le noyau réticulaire latéral (NRL), le noyau cuneatus externe (NCE), et les noyaux propres du pont (NP) (Fig.42). Ils sont à l'origine de l'essentiel des fibres moussues. Le NRL et le NCE occupent respectivement des positions ventro-latérale et dorsale dans la partie postérieure du tronc cérébral (Fig.42, 44). Le NRL est proche du noyau de l'olive inférieure et constitué de deux sous-unités, la région parvocellulaire ventrale et la région magnocellulaire dorsale, qui commencent à se former à l'issue de l'étape de migration (Bourrat et Sotelo, 1990b). Les fibres moussues issues du NRL et NCE innervent exclusivement l'hémisphère cérébelleux ipsilatéral à travers le pédoncule cérébelleux inférieur. Lors d'une injection de Dil unilatérale dans le cervelet, les neurones tracés dans ces noyaux sont situés du même côté que le site d'injection (Fig.44).

Les NP occupent une position ventrale au niveau de la flexure pontique (Fig.42, 44). Ces noyaux symétriques sont directement accolés à la ligne médiane ventrale. Les noyaux propres du pont regroupent le noyau basal (ou noyau gris) et le noyau réticulotegmental qui occupe une position plus dorsale. Les projections axonales des NP forment la classe la plus importante de fibres moussues (Brodal et Bjaalie, 1992). Elles pénètrent dans le cervelet par le pédoncule cérébelleux médian (Azizi et coll., 1981). La projection des NP est à dominante controlatérale (Fig.44). Cependant, une partie de ces neurones projettent leurs axones vers le cervelet ipsilatéral (Brodal, 1979 ; Harkmark, 1954 ; Cicirata et coll., 2005).

4.2 Origine des neurones précérébelleux

4.2.1 Les lèvres rhombiques, territoire dorsal du rhombencéphale

Chez les vertébrés, le rhombencéphale va se segmenter transitoirement le long de son axe antéro-postérieur en sept à huit domaines (en fonction de l'espèce), appelés rhombomères (R1

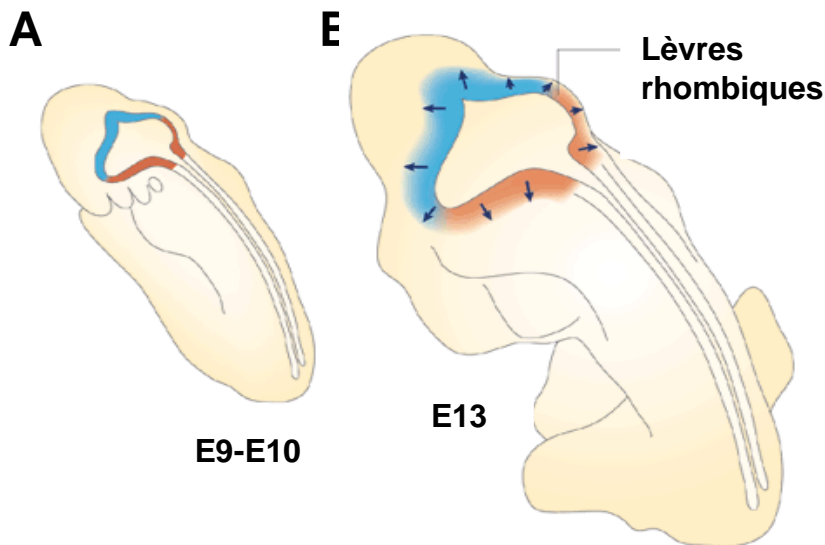


Figure 45: Description morphologique des lèvres rhombiques

Représentation schématique d'embryons de souris aux stades E9-E10 (a) et E13 (b) en vue dorso-latérale. Les lèvres rhombiques bordent le quatrième ventricule dans le rhombencéphale dorsal. Elles se divisent en deux régions: les lèvres rhombiques supérieures (en bleu) et inférieures (en rouge). Cette zone germinative est la source de plusieurs populations de neurones à migration tangentielle (flèches en b).

(Adapté de Wang et coll. 2001)

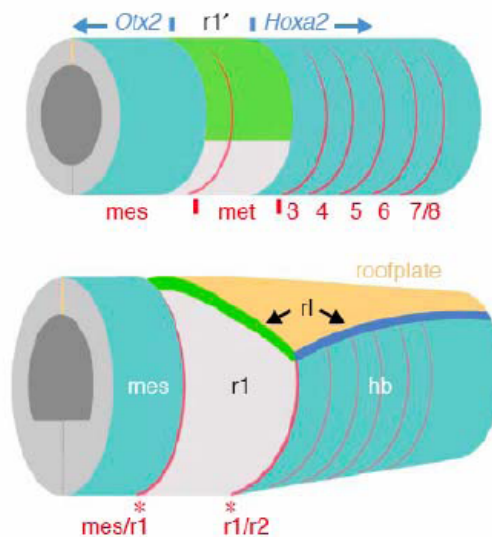


Figure 46: Définition des lèvres rhombiques en fonction de leur origine rhombomérique

Représentations schématiques de l'origine rhombomérique distincte des lèvres rhombiques supérieures et inférieures. Les lèvres rhombiques supérieures dérivent exclusivement du rhombomère1 (r1). Les limites présomptives de r1 (futur métencéphale, met) sont définies par les limites d'expression de *Otx2* et *Hoxa2*, situées respectivement dans les régions antérieures (futur mésencéphale, mes) et postérieures (futur tronc cérébral, hb) du tube neural. Les lèvres rhombiques inférieures proviennent de la région s'étalant de R2 à R8 et définie par l'expression de *Hoxa2*.

(Adapté de Wingate 2001)

à R8 chez les rongeurs ; Lumsden, 1990). La position d'un précurseur neuronal dans ce neuroépithélium régionalisé est essentielle pour la détermination de son identité et de sa localisation au sein du cerveau mature.

Les lèvres rhombiques, territoire d'origine des neurones précérébelleux forment une région particulière du neuroépithélium, située à la jonction entre la plaque alaire et la toile choroïdienne du quatrième ventricule tout le long du rhombencéphale (Fig.45). Cette région dorsale fut décrite tout d'abord par His en 1890 puis par Essik en 1912. Ils ont pour la première fois suggéré que les lèvres rhombiques constituent la source des neurones du noyau olivaire (His, 1890 ; Essick 1912). Des expériences d'ablation des lèvres rhombiques chez le poulet ont permis de vérifier les observations de W. His. La cautérisation précoce et unilatérale de cette zone empêche l'apparition de l'olive du côté lésé (Harkmark, 1954). L'origine des neurones précérébelleux a été confirmée depuis par des méthodes de marquage à la thymidine tritiée (Altman et Bayer, 1978 ; Altman et Bayer, 1987a ; Bourrat et Sotelo, 1988) ainsi que par des expériences de lignage cellulaire marqué par un rétrovirus (Hemond et Glover, 1993) ou par des techniques de greffes caille-poule (Tan et Le Douarin, 1991). Par exemple, lors de la greffe de la plaque alaire du rhombencéphale située entre R2/R3 et la moitié de R8, les neurones précérébelleux sont tous issus du greffon et vont migrer ventralement (Tan et Le Douarin, 1991 ; pour revue Hallonet et Alvarado-Mallart, 1997). Ces travaux ont démontré que les neurones précérébelleux sont produits tout au long des lèvres rhombiques dorsales, puis migrent selon plusieurs voies de migration tangentielle vers leurs positions respectives finales (voir également Miale et Sidman, 1961 ; Ellenberger et coll., 1969

4.2.2 Précisions sur la localisation des précurseurs des neurones précérébelleux au sein des lèvres rhombiques

En complément des méthodes d'embryologie classique présentées ci-dessus, de nouvelles approches de cartographie basées sur des techniques de recombinaisons génétiques (constitutives ou temporellement et spatialement inductibles) ont été mises au point. Elles permettent de suivre la destinée de cellules issues de groupes de précurseurs, définis par l'expression commune d'un gène ou leurs positions au sein des zones germinatives. Ces techniques novatrices ont amélioré notre connaissance de la cartographie des territoires des lèvres rhombiques à l'origine des neurones précérébelleux (NPC).

4.2.2.1 Régionalisation antéro-postérieure des lèvres rhombiques

Il a été montré que les lèvres rhombiques se divisent sur l'axe antéro-postérieur en deux territoires : les lèvres rhombiques supérieures et inférieures. Ces deux régions ont été initialement définies sur des critères morphologiques (Fig.45), puis par leur localisation

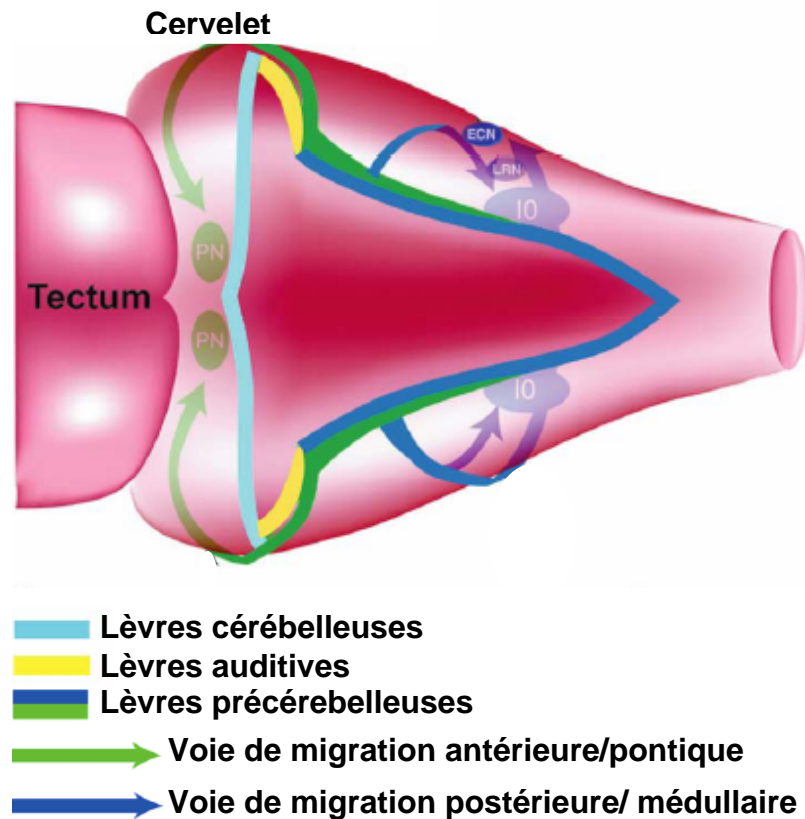


Figure 47: Origine des neurones précérébelleux chez la souris (I)

Représentation schématique d'une vue dorsale de tronc cérébral en développement. Les lèbres rhombiques inférieures sont subdivisées en deux territoires: les lèbres rhombiques précérébelleuses qui produisent tous les neurones précérébelleux empruntant différentes voies de migrations tangentielle ventrales ;les lèbres rhombiques auditives plus antérieures qui génèrent des neurones participant à la formation du noyau cochléaire (cf. Figure 48).

(Illustration Adapté de Zhang et coll. 2003)

rhombomérique (Fig.46) et la nature des neurones qu'elles produisent (Fig.47, 48 ; pour revue Lumsden et Krumlauf, 1996). Les lèvres rhombiques supérieures (rostrales ou cérébelleuses) correspondent à la partie dorsale du neurectoderme de R1, alors que les lèvres rhombiques inférieures (caudales) s'étalent entre R2 et R8 (Fig.46, 48 ; Miale et Sidman, 1961 ; Altman et Bayer, 1997 ; Wingate et Hatten, 1999 ; Cambroner et Puellas, 2000 ; Koster et Fraser, 2001). La frontière entre ces deux régions est définie précocement par la limite antérieure d'expression du gène *Hoxa2* (facteur de transcription à homéodomaine). La frontière antérieure de R1 correspond à la limite postérieure d'expression de *Otx2* (Fig.46 ; Wingate et Hatten, 1999).

4.2.2.2 Les neurones précérébelleux naissent séquentiellement dans les lèvres rhombiques inférieures

L'origine rhombomérique des NPC a été établie chez l'embryon de poulet. Ces neurones sont générés principalement au sein des lèvres rhombiques inférieures en une vague antéro-postérieure. Les neurones olivaires proviennent de la région chevauchante entre R7-R8 et la partie dorsale de la moelle épinière antérieure (Ambrosiani et coll., 1996 ; Cambroner et Puellas, 2000). Les neurones du NRL et du NCE sont générés entre R7 et R8. Les NP, d'origine plus complexe, proviennent d'un large domaine des lèvres rhombiques entre R1 et R7 (Marin et Puellas, 1995 ; Tan et Le Douarin, 1991 ; Wingate et Hatten, 1999).

Chez la souris, la distribution des précurseurs des NPC sur l'axe antéro-postérieur était moins bien connue. Des travaux récents ont cependant précisé cette origine en dévoilant une nouvelle subdivision des lèvres rhombiques inférieures en deux domaines distincts (Fig.47, 48 ; Farago et coll., 2006) :

- Les lèvres rhombiques pré-cérébelleuses s'étendent caudalement de R6 à R8 et produisent les principaux NPC à fibres moussues et grimpantes du tronc cérébral.
- Les lèvres rhombiques auditives localisées de R2 à R5, produisent plusieurs dérivés neuronaux distincts s'intégrant au noyau cochléaire du tronc cérébral dorsal.

Grâce à la technique de datation par marquage à la thymidine tritiée, de nombreuses études ont déterminé la date de naissance des NPC chez le rat (Altman et Bayer, 1978 ; Altman et Bayer, 1980 ; Altman et Bayer, 1987a ; Altman et Bayer, 1987b ; Altman et Bayer, 1987c ; Bourrat et Sotelo, 1988) et la souris (Pierce, 1966 ; Pierce, 1973 ; De Diego et coll., 2002). Chez la souris, modèle animal que j'ai étudié, les neurones olivaires naissent à partir de E10 jusqu'à E12, les neurones du NRL et du NCE entre E11 et E13 et ceux des NP entre E12 et E16.

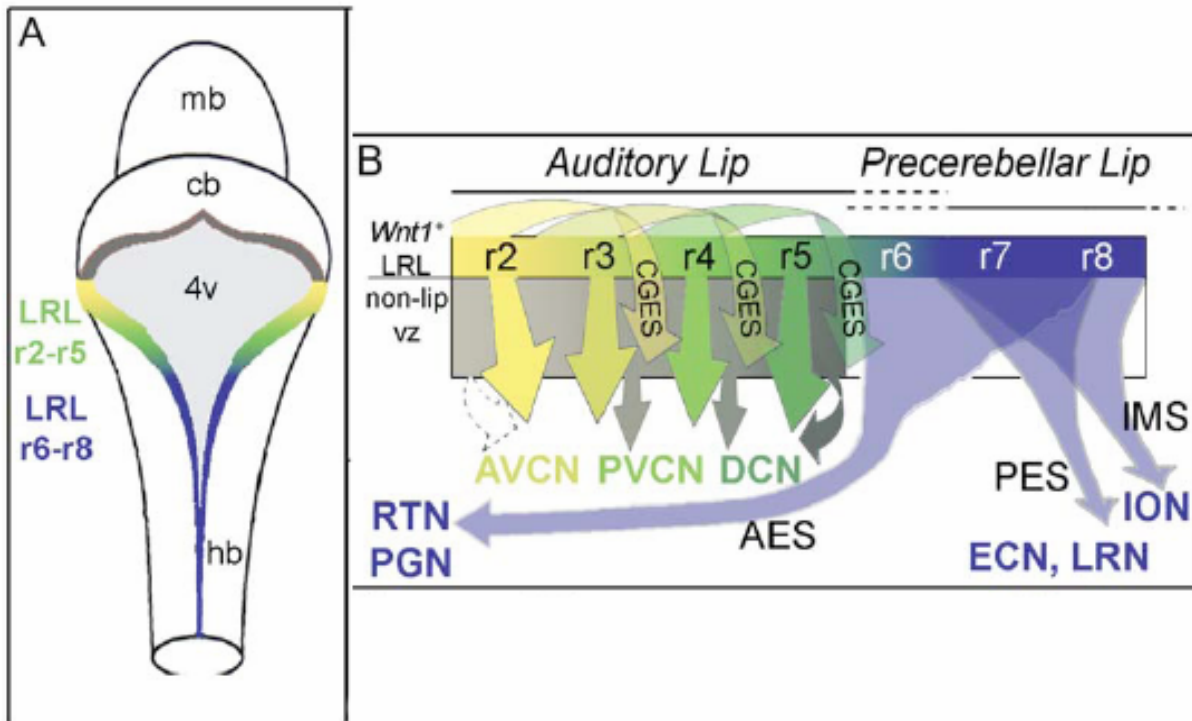


Figure 48: Origine des neurones précérébelleux chez la souris (II)

Représentations schématiques de la partition précoce des lèvres rhombiques inférieures (LRL) sur l'axe rostro-caudal (A, vue dorsale, antérieur vers le haut) et des catégories neuronales qu'elles produisent plus tardivement (B, face dorsale vers le haut et antérieure vers la gauche). Les lèvres rhombiques auditives (R2-R5 ; jaune-vert) génèrent des neurones du système cochléaire: le noyau cochléaire antero-ventral (AVCN) provient de R2 et R3, le noyau cochléaire postérieur ventral (PVCN) provient principalement de R4, alors que des neurones du noyau cochléaire dorsal naissent dans R5. Les cellules granulaires cochléaires sont pour leur part générées de R2 à R5 et migrent dans la voie de migration extramurale des cellules granulaires (CGES). Le noyau cochléaire reçoit également une contribution de la zone ventriculaire (VZ) adjacente (flèches grises). Les lèvres rhombiques précérébelleuses (R6-R8) génèrent l'ensemble des neurones précérébelleux (NPC). Les neurones de l'olive inférieure (ION), du noyau réticulaire latéral (LRN) et du noyau cuneatus externe (ECN) proviennent de R7 et R8 alors que les neurones propres du pont (RTN, PGN) naissent dans la zone s'étalant de R6 à R8. Ces différents NPC quittent les lèvres rhombiques en formant trois voies de migration: intramuraire (IMS ou sous-marginale), extramuraire postérieure (PES ou marginale postérieure) et extramuraire antérieure (AES ou marginale antérieure).

4v: quatrième ventricule ; cb: cervelet ; hb: tronc cérébral ; mb: cerveau moyen.

(Adapté de Landsberg et coll. 2005)

4.2.2.3 Dérivés des lèvres rhombiques supérieures

Les lèvres rhombiques supérieures sont la source des précurseurs des grains du cervelet (générés à partir de E13). Cette population neuronale, qui constitue presque la moitié des neurones d'un cerveau adulte, provient exclusivement de R1 (Ryder et Cepko, 1994 ; Altman et Bayer, 1997 ; Wingate et Hatten, 1999). On pensait que tous les autres neurones du cervelet provenaient de la zone ventriculaire dorsale adjacente. Ce modèle a été récemment corrigé, puisqu'il a été montré que les neurones des noyaux profonds (Machold et Fishell, 2005 ; Fink et coll., 2006) et les cellules unipolaires à brosse (Englund et coll., 2006) naissent également dans les lèvres rhombiques supérieures. Ainsi, cette zone germinative produit tous les neurones glutamatergiques excitateurs du cervelet (Fig.49). De plus, elle génère également des neurones de plusieurs noyaux extra-cérébelleux du tronc cérébral (Machold et Fishell, 2005).

4.2.2.4 Fonction des gènes homéotiques (*hox*) dans la régionalisation des lèvres rhombiques inférieures

La compétence des lèvres rhombiques à générer des types cellulaires distincts semble dépendre de leur origine rhombomérique (Farago et coll., 2006 ; Wingate et Hatten, 1999). Nous avons vu précédemment un exemple illustrant l'importance des gènes *Hox*s dans l'établissement des frontières rhombomériques. L'information positionnelle codée par l'expression d'*Hoxa2* contribue également à déterminer le potentiel des précurseurs neuronaux des lèvres rhombiques. En effet, chez les souris déficientes pour *Hoxa2*, une transformation homéotique des lèvres rhombiques auditives en lèvres rhombiques cérébelleuses résulte en une extension caudale du cervelet et la perte du noyau cochléaire (Gavalas et coll., 1997). A l'inverse, la surexpression ectopique d'*Hoxa2* dans R1, qui en est normalement dépourvu, entraîne une transformation homéotique inverse. Les cellules issues des lèvres rhombiques cérébelleuses empruntant alors des voies de migration caractéristiques des cellules issues de R2 (Eddison et coll., 2004). Ainsi l'expression d'*Hoxa2* semble déterminer l'identité et la compétence migratoire des précurseurs contenus dans les lèvres rhombiques inférieures auditives. Ce facteur est également exprimé dans la région des lèvres rhombiques précérébelleuses, sa fonction dans la détermination des NPC qui en dérivent restait inconnue.

4.2.3 Régionalisation dorso-ventrale des lèvres rhombiques inférieures

4.2.3.1 Cartographie moléculaire des groupes de précurseurs présents dans les lèvres rhombiques cérébelleuses

Les neurones précérébelleux à fibres grimpances ou à fibres moussues étaient connus pour être issus de groupes de précurseurs distincts (Rodriguez et Dymecki, 2000). Les lèvres

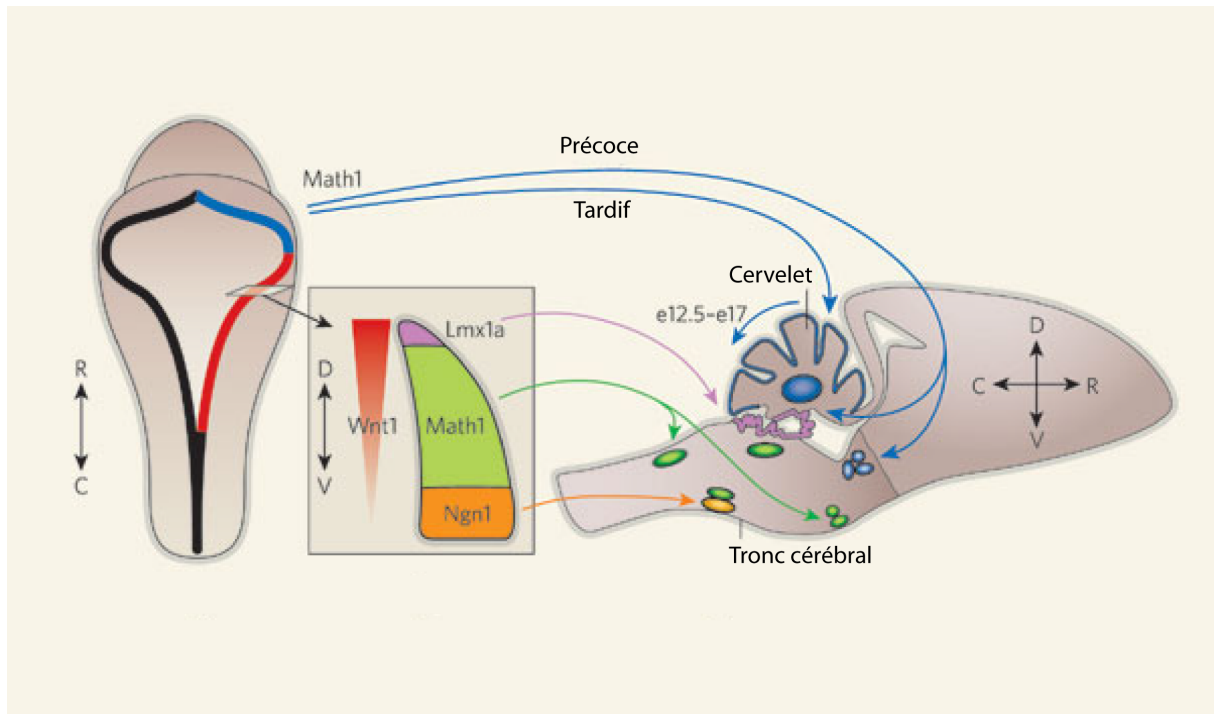


Figure 49: Régionalisation dorso-ventrale des populations de précurseurs présents dans les lèvres rhombiques

Représentations schématiques des lèvres rhombiques en vue dorsale (a) ou en coupe coronale (b), et des populations qu'elles produisent au sein du cerveau mature (c, coupe sagittale). Les flèches indiquent les courants migratoires provenant des différentes régions des lèvres rhombiques. Les lèvres rhombiques cérébelleuses (en bleu) produisent les précurseurs des cellules granulaires (surface du cervelet), ainsi que des neurones des noyaux profonds du cervelet et plusieurs noyaux du tronc cérébral. Les lèvres rhombiques inférieures (en rouge) peuvent être subdivisées en trois régions d'expression génique à l'origine de dérivés cellulaires distinctes. Wnt1 est exprimé selon un gradient dorso-ventral et co-localise dorsalement avec Lmx1a dans une zone qui est à l'origine du plexus choroïde. La région intermédiaire d'expression de Math1 est à l'origine de tous les neurones précérébelleux à fibres moussues et de neurones du système cochléaire. Dans la partie ventrale où l'expression de Wnt1 décroît se trouvent les précurseurs des neurones olivaires exprimant Ngn1. (Adapté de Zhang et coll. 2003)

rhombiques inférieures sont subdivisées selon leur axe dorso-ventral en plusieurs domaines d'expressions de facteurs moléculaires tels que *Wnt1*, *Math1*, *Pax6* ou *Pft1a*. Nous allons voir qu'ils permettent de définir spatialement les différentes populations de précurseurs tout en intervenant dans leur détermination (Fig.49). Le facteur sécrété *Wnt1* est exprimé dans les lèvres rhombiques selon un gradient dorso-ventral décroissant. Ce domaine d'expression comprend trois groupes de précurseurs distincts :

- Dans la région la plus dorsale, *Wnt1* est co-exprimée avec *Gdf7* et *Lmx1a* dans des précurseurs générant la plaque du toit (Fig.49 ; Awatramani et coll., 2003 ; Rodriguez et Dymecki, 2000 ; Landsberg et coll., 2005).

- Dans la région intermédiaire, l'expression de *Wnt1* reste forte. Elle est associée à l'expression de *Math1* (« mouse atonal homolog 1 »), un facteur de transcription à domaine bHLH (Akazawa et coll., 1995 ; Landsberg et coll., 2005). Il a été prouvé que tous les NPC à fibres moussues du tronc cérébral dérivent de ces précurseurs *Wnt1* et *Math1* positifs (Fig.49 ; Rodriguez et Dymecki, 2000 ; Nichols et Bruce, 2006 ; Ben-Arie et coll., 1997 ; Ben-Arie et coll., 2000 ; Machold et Fishell, 2005 ; Wang et coll., 2005). *Math1* est essentiel à leur développement, puisque ces NPC sont quasiment tous absents chez les souris déficientes pour ce gène (Ben-Arie et coll., 2000 ; Wang et coll., 2005). D'autre part, les précurseurs exprimant *Math1* de la moelle épinière dorsale sont également à l'origine des populations d'interneurones à fibres moussues formant le faisceau spino-cérébelleux (Birmingham et coll., 2001). Il a donc été conclu que *Math1* possède une fonction pro-neurale intervenant dans la spécification des précurseurs de l'ensemble des neurones à fibres moussues projetant vers le cervelet. Ces études s'accordent sur le fait que les progéniteurs des neurones de l'OI sont exclus de cette zone intermédiaire des lèvres rhombiques précérébelleuses. De plus, l'absence de *Math1* n'affecte pas le développement olivaire (Ben-Arie et coll., 1997 ; Wang et coll., 2005).

- Enfin, dans la région ventrale des lèvres rhombiques inférieures, l'expression de *Wnt1* décroît progressivement. La présence du facteur *Ngn1* définit alors le primordium à l'origine des neurones olivaires (Fig.49 ; Landsberg et coll., 2005). Les cellules olivaires proviennent donc bien de précurseurs *Wnt1* positifs, pourtant elles n'ont jamais été tracées lors des expériences de lignage citées précédemment (Rodriguez et Dymecki, 2000 ; Nichols et Bruce, 2006). Une technique basée sur l'utilisation d'une recombinaise à haute activité placée sous le contrôle du promoteur de *wnt1*, a permis pour la première fois de suivre le lignage de cette zone ventrale de faible expression de *Wnt1*. Cette étude a confirmé que les neurones olivaires proviennent bien de cette région (Landsberg et coll., 2005).

Par ailleurs, Il a été montré indépendamment qu'une partie des neurones olivaires proviendrait de précurseurs exprimant le facteur de transcription *Pft1a* (Hoshino et coll., 2005). Le domaine d'expression de ce facteur au sein des lèvres rhombiques n'a pas été positionné précisément

par rapport à Wnt1. Toutefois, en accord avec des données obtenues dans la moelle épinière, Pftu1a pourrait être présent dans un domaine chevauchant ventralement la zone d'expression de Ngn1 (Obata et coll., 2001).

Ainsi, l'origine des neurones de OI est bien distincte des autres NPC, ce qui peut expliquer que ces neurones présentent des propriétés de migration et projection axonale qui leur sont propres. Il a été proposé que les neurones de l'OI ne soient pas générés dans les lèvres rhombiques au sens strict, mais plutôt dans la partie de la zone ventriculaire germinative dorsale juste adjacente (Altman et Bayer, 1987a ; Ellenberger et coll., 1969 ; Funfschilling et Reichardt, 2002 ; De Diego et coll., 2002 ; Hoshino et coll., 2005).

4.2.3.2 Facteurs contrôlant l'établissement de cette régionalisation dorso-ventrale

➤ Fonction inductrice des BMPs

Les BMPs sont produites et sécrétées par les cellules des plexus choroïdes issus de la plaque du toit. Ce signal intervient dans l'induction des lèvres rhombiques cérébelleuses et la production des précurseurs des grains (Alder et coll., 1999 ; Qin et coll., 2006 ; Krizhanovsky et Ben-Arie, 2006). Les souris dépourvues de récepteurs aux BMPs perdent l'expression du facteur Math1 dans cette région germinative (Helms et Johnson, 1998 ; Wang et coll., 2005). Le facteur de transcription Pax6 semble intervenir dans la signalisation déclenchée par les BMPs à l'origine de la détermination des précurseurs des NPC (Landsberg et coll., 2005). Son domaine d'expression chevauche ceux de Math1 et Ngn1 au sein des lèvres rhombiques. Chez les souris *Pax6*^{-/-}, l'expression de Ngn1 se retrouve anormalement étendue au niveau dorsal, aux dépens de celle de Math1 qui est alors plus restreinte. Ce déséquilibre provoque une hypertrophie olivaire associée à une hypoplasie de tous les autres NPC à fibres moussues.

➤ Fonction inductrice de l'acide rétinoïque

Chez l'humain, l'administration d'acide rétinoïque (AR) a des effets tératogènes pouvant être à l'origine de malformations du système nerveux. Le développement du tronc cérébral se trouve alors particulièrement affecté. Les NPC en développement apparaissent sensibles à l'effet de l'AR endogène. En effet, l'expression d'un gène rapporteur codant la β -galactosidase, placé sous le contrôle d'un élément de réponse à l'AR est fortement induite dans ces neurones (Yamamoto et coll., 2003 ; Zhang et coll., 2003). D'autre part, la protéine cellulaire de liaison à l'AR (CRABPI) est détectée au niveau des lèvres rhombiques ainsi que dans tous les NPC qui en sont issus (Zhang et coll., 2003). L'AR est synthétisé grâce aux enzymes RALDH (rétinaldéhyde déhydrogénase) qui semblent absents du tronc cérébral (Gavalas et Krumlauf, 2000 ; Niederreither et coll., 2000). En revanche, les méninges exprimant l'enzyme RALDH2 constituent une source d'AR importante (Zhang et coll., 2003). L'administration d'AR exogène

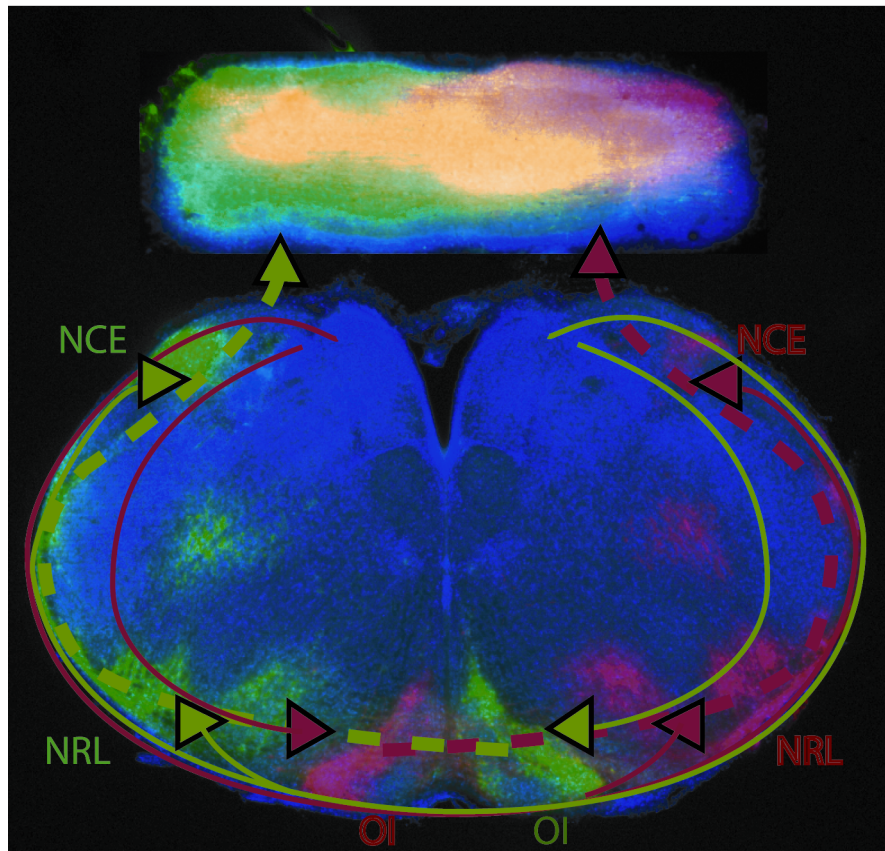


Figure 50: Tous les neurones précérébelleux croisent la ligne médiane au cours de leur développement

Coupes coronales de tronc cérébral marqué par un traçage axonal, réalisé grâce à l'injection de cristaux de DiI, (rouge) ou DiA (vert) dans chaque hémis-cervelet d'un embryon de souris à E18 (microscopie à épifluorescence). Les neurones précérébelleux projetant vers l'hémisphère cérébelleux gauche (traçage vert, pointillés) proviennent des lèvres rhombiques de l'hémisphère droit (flèches vertes) et réciproquement (rouge). Tous leurs axones franchissent la ligne médiane. Les corps cellulaires des neurones olivaires (OI) s'arrêtent avant la ligne médiane (projection finale controlatérale) alors que ceux des neurones du noyau réticulaire latéral (NRL) et du noyau cuneatus externe (NCE) franchissent la plaque du plancher et se positionnent controlatéralement (projection finale ipsilatérale).

durant une période critique située entre E9,5 et E11 chez la souris, affecte la formation des noyaux olivaires et pontins. La migration neurophilique des neurones du pont apparaît fortement affectée, ce qui se traduit par un étalement de la voie de migration. Ils progressent de façon éparsée dans tout le tronc cérébral ventral (Yamamoto et coll., 2003). En revanche, l'OI est anormalement développée et compte un nombre trop élevé de neurones. A l'inverse, une réduction du taux d'AR endogène causée par une carence en vitamine A résulte en une perte de neurones olivaires (Yamamoto et coll., 2005). Il a donc été proposé que l'AR endogène agisse à cette période critique dans l'induction des précurseurs olivaires au sein des lèvres rhombiques.

4.3 Migration des neurones précérébelleux

4.3.1 Aspects descriptifs

A leur sortie des lèvres rhombiques, tous les NPC migrent tangentiellement vers la plaque du plancher. Leur déplacement s'effectue le long de plusieurs voies positionnées sous la surface piaie du rhombencéphale (Bourrat et Sotelo, 1990a). Leur mode de migration est principalement neurophilique (Ono et Kawamura, 1990 ; Alcantara et coll., 2000 ; Kawachi et coll., 2006). Les prolongements guides des NPC, qui deviendront leurs axones, traversent tous la plaque du plancher ventrale. Ainsi, tous les axones des neurones générés d'un côté des lèvres rhombiques pénètrent dans leur territoire cible par le pédoncule cérébelleux controlatéral. La nature ipsi ou controlatérale finale de la projection des noyaux formés dépend du comportement des corps cellulaires en cours de migration, à savoir s'ils croisent ou non la ligne médiane à la suite de leur axone (Fig.50).

4.3.1.1 Migration sous-marginale des neurones de l'olive inférieure

Les neurones olivaires migrent dorso-ventralement en empruntant un courant de migration dit sous-marginal (Fig.51 ; Harkmark, 1954 ; Bourrat et Sotelo, 1988 ; Bourrat et Sotelo, 1990a ; Tan et Le Douarin, 1991 ; Altman et Bayer, 1987b). Ces neurones ont un prolongement axonal guide relativement long. Celui-ci va initialement s'allonger en direction de la plaque du plancher et la traverser. Il progresse ensuite dorsalement en s'éloignant de la ligne médiane puis tourne rostralement pour rejoindre le cervelet controlatéral (Pierce, 1966 ; Ellenberger et coll., 1969 ; Bourrat et Sotelo, 1988 ; Bourrat et Sotelo, 1990a ; Chédotal et coll. 1996 ; Zhu et coll., 2003). Les corps cellulaires des neurones olivaires quittent les lèvres rhombiques au moment où leur prolongement guide a quasiment atteint la ligne médiane. Ils migrent alors ventralement vers le territoire olivaire ipsilatéral et s'arrêtent juste avant de franchir la plaque du plancher (Fig.50, 51). La projection de ces neurones est donc au final entièrement croisée (Ambrosiani et coll., 1996 ; Altman et Bayer, 1987b ; Bourrat et Sotelo, 1988). Chez la souris, les neurones olivaires

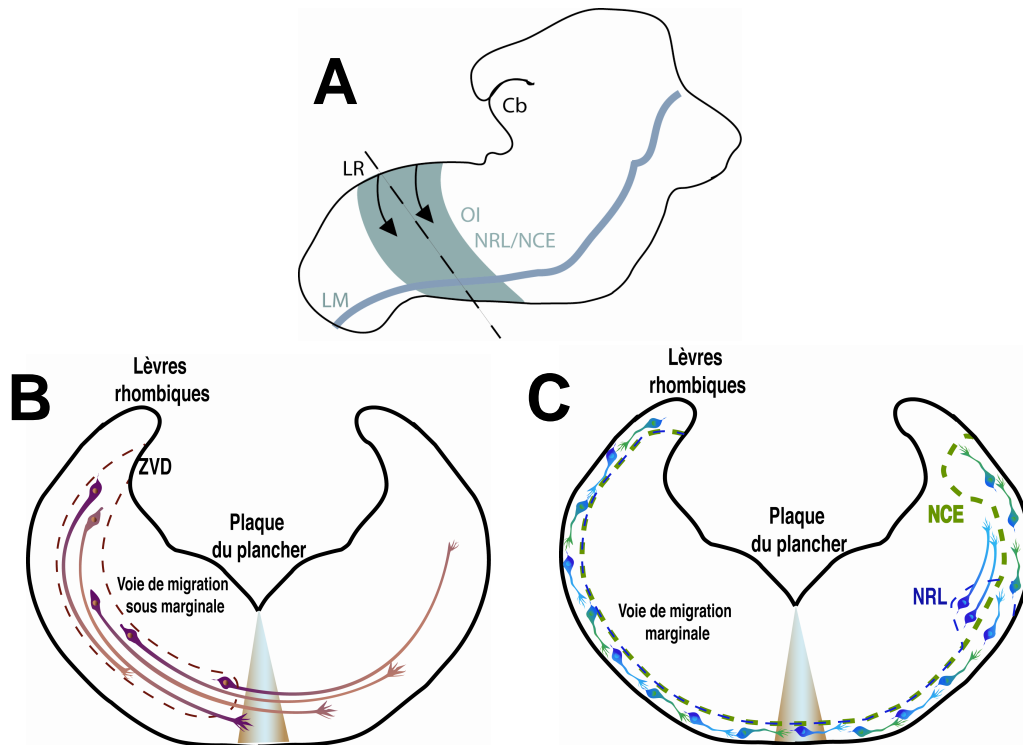


Figure 51: Courants de migrations medullaires

Représentations schématiques des voies de migration sous-marginale et marginale *in toto* (A, antérieur vers la droite) ou en coupes coronales (B, C, pointillés en A). Les neurones olivaires migrent depuis la zone ventriculaire dorsale (ZVD) des lèvres rhombiques au sein de la voie de migration sous marginale (pointillés en B). Leurs axones croisent la ligne médiane ventrale (LM) et progressent vers le cervelet controlatéral. Leurs corps cellulaires s'arrêtent ventralement avant la plaque du plancher. Les neurones du noyau réticulaire latéral (NRL) et du noyau cuneatus externe (NCE) migrant au sein de la voie de migration marginale franchissent la plaque du plancher et pénètrent dans l'hémisphère controlatéral. Les axones de ces neurones progressent ensuite tous vers le cervelet (Cb).

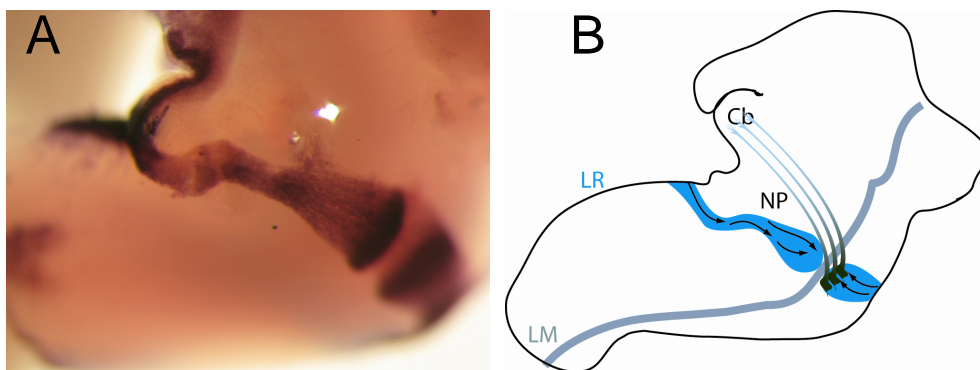


Figure 52: Migration des neurones propres du pont

Tronc cérébral d'un embryon de souris à E15 (vue latéro-ventrale, antérieur vers la droite) marqué en hybridation *in situ* par une sonde reconnaissant le messager de Barhl1 exprimé par les neurones du pont (NP) en migration (A), associé à un schéma explicatif (B). Les neurones du pont en migration forment la voie de migration marginale antérieure. Ces neurones quittent les lèvres rhombiques cérébelleuses dorsales, se déplacent longitudinalement en traversant plusieurs rhombomères, pour rejoindre ensuite la ligne médiane (LM) ventrale au terme d'un ultime déplacement transversal. La majorité de ces neurones s'arrêtent avant la ligne médiane, alors que leurs axones la franchissent pour projeter vers l'hémi-cervelet (Cb) controlatéral.

quittent les lèvres rhombiques entre E10 et E11 et ont tous rejoint la ligne médiane à E14. L'OI va alors entamer sa lamellation, qui repose sur des mouvements cellulaires complexes (Bourrat et Sotelo, 1991). Nous reviendrons sur cette étape dans la discussion.

4.3.1.2 Migration marginale des neurones précérébelleux à fibres moussues

Nous avons vu que tous les neurones à fibres moussues proviennent des mêmes précurseurs. Ces neurones partageront ensuite les mêmes caractéristiques de projections axonales (morphologie de la terminaison synaptique, populations cellulaires cibles). Leurs modes de migration sont également similaires. D'une part, leur déplacement tangentiel est superficiel et placé juste sous la membrane piale (Altman et Bayer, 1987d ; Altman et Bayer, 1987c ; Bourrat et Sotelo, 1990b ; Ono et coll., 2004). D'autre part, ces neurones émettent un prolongement guide axonal plus court que celui des neurones olivaires. Enfin, une fois arrivés au niveau de leur région cible, les NPC à fibres moussues envoient un prolongement de nature dendritique au contact des cellules de la glie radiaire (Bourrat et Sotelo, 1990b). Ils entameraient alors un mouvement de migration radiaire orientée vers le ventricule, rejoignant ainsi leur territoire cible où ils s'agrègent (Kawauchi et coll., 2006).

➤ Voie de migration marginale postérieure

Les neurones du noyau réticulaire latéral (NRL) et du noyau cuneatus externe (NCE) quittent les lèvres rhombiques inférieures à partir de E11,5 et suivent un courant de migration marginal externe (ou extramural ; Bourrat et Sotelo, 1991 ; Altman et Bayer, 1997 ; De Diego et coll., 2002), à la surface du rhombencéphale postérieur. Ils progressent parallèlement aux neurones de l'OI en direction ventrale et franchissent entièrement la plaque du plancher à son niveau le plus ventral (entre E13,5 et E15,5). Les neurones du NRL et du NCE pénètrent alors dans le territoire controlatéral et se positionnent respectivement latéralement ou dorsalement (Fig.51). Leurs axones continuent alors leur croissance vers le cervelet, la projection établie étant par conséquent ipsilatérale (Bourrat et Sotelo, 1991 ; Altman et Bayer, 1987c). L'origine controlatérale de ces noyaux a été confirmée *in vitro* (Kyriakopoulou et coll., 2002 ; Taniguchi et coll., 2002) et *in vivo* grâce à l'électroporation des lèvres rhombiques *in utero* avec un vecteur codant la GFP (Kawauchi et coll., 2006 ; Okada et coll., 2007). Cette technique présente l'avantage d'atteindre unilatéralement cette région germinative dorsale et ses dérivés.

➤ Voie de migration marginale antérieure

Les neurones à l'origine des noyaux propres du pont (NP) forment un courant de migration marginal antérieur pontobulbaire ou pontomédullaire (Harkmark, 1954 ; Ono et Kawamura, 1990). Leur trajectoire est plus complexe que celle des autres NPC (Fig.52). Ces neurones

naissent dans une région étalée des lèvres rhombiques et se rejoignent pour constituer une voie de migration compacte. Ils entament alors un déplacement longitudinal dirigé antérieurement (migration longitudinale antérieure), puis tournent à 90° et rejoignent la plaque du plancher (migration transversale ventrale) qu'ils ont tous atteinte vers E17,5. Les neurones du pont en migration peuvent ainsi traverser plusieurs frontières rhombomériques. Ils sont générés dans les lèvres rhombiques s'étalant de R5 à R7 et rejoignent le territoire ventral de R4 (Farago et al., 2006).

Les corps cellulaires des neurones du pont s'arrêtent majoritairement avant la ligne médiane ventrale (Ono et Kawamura, 1990 ; Altman et Bayer, 1987d). Cependant, des expériences de greffes caille-poule unilatérales de la région dorsale du tube neural suggéraient que certains neurones du pont croisent la ligne médiane (Tan et Le Douarin, 1991). Ceci a pu être confirmé sans ambiguïté grâce à la technique d'électroporation des lèvres rhombiques *in utero* (Kawauchi et coll., 2006 ; Okada et coll., 2007). Les neurones du pont à migration controlatérale seraient générés en premier au sein des lèvres rhombiques. Ceci explique donc que la projection ponto-cérébelleuse soit mixte, avec une forte dominance controlatérale.

4.3.2 Facteurs de transcription impliqués dans la migration des neurones précérébelleux

L'expression des gènes de détermination précoces *Math1* et *Pft1a* dans les précurseurs des NPC n'est que transitoire. Leur expression disparaît durant les phases migratoires qui suivent. D'autres facteurs de transcription sont exprimés spécifiquement par les NPC à fibres moussues (*Pax6*, *Barhl1*) ou les NPC à fibres grimpanes (*Brn3.a* ; *Brn3.b*) en migration. Ces facteurs sont impliqués dans certains aspects tardifs du développement de ces neurones.

4.3.2.1 Pax6, un facteur nécessaire à la migration

Chez les souris « *small eye* » dépourvues du gène *pax6*, les contingents cellulaires formant les noyaux à fibres moussues sont réduits de 90%. Cette déficience est due en grande partie à un défaut de la fonction précoce de *Pax6*, qui intervient comme nous l'avons vu dans la spécification des précurseurs de ces NPC au sein des lèvres rhombiques (Landsberg et coll., 2005). Toutefois, *Pax6* semble également impliqué dans le processus de migration tangentielle. En effet, son absence compromet le départ en migration des neurones à fibres moussues restants, qui s'accumulent dans les lèvres rhombiques inférieures. De plus, *Pax6* est exprimé par les précurseurs des grains et nécessaire à leur migration depuis les lèvres rhombiques antérieures. L'absence de *Pax6* affecte fortement les processus d'extension neuritique et de translocation nucléaire de ces neurones en culture, observation qui peut expliquer leur incapacité à migrer *in vivo* (Engelkamp et coll., 1999).

4.3.2.2 Barhl1, un facteur de survie

Le facteur de transcription à homéodomaine Barhl1 agit en aval de Math1 durant le développement de la moelle épinière et de l'oreille interne (Bermingham et coll., 1999 ; Bermingham et coll., 2001 ; Li et coll., 2002a). Dans cette dernière structure, Barhl1 est indispensable à la survie à long terme des cellules de la cochlée (Li et coll., 2002a). Dans le système pré-cérébelleux, Barhl1 semble également agir sous le contrôle de Math1. En effet, son expression est induite au sein des lèvres rhombiques dans la zone préalablement définie par Math1. Il ne semble pas être nécessaire à l'étape initiale de détermination de ces précurseurs. Son expression est maintenue à long terme dans les NPC à fibres moussues et également nécessaire à leur survie. En effet, ces NPC sont moins nombreux et plus dispersés chez les souris déficientes pour le gène *Barhl1*. Ils meurent par apoptose au cours de leur migration. Le facteur de survie NT3 apparaît comme une cible potentielle de Barhl1 (Bates et coll., 1999 ; Li et coll., 2004). Par ailleurs, les NPC survivants rejoignent leur territoire cible, mais ne peuvent répondre aux facteurs de guidage locaux leur permettant d'y pénétrer (Li et coll., 2004).

4.3.2.3 Brn3a et Brn3b, une compensation fonctionnelle apparente

Brn3a et Brn3b sont deux facteurs de transcription à domaine POU exprimés spécifiquement durant le développement de tous les neurones de l'OI. A E18, l'expression de Brn3a est uniforme dans l'OI, alors que l'expression de Brn3b est variable. Celle-ci est plus forte dans l'OI rostrale et la partie ventrale de l'OI caudale (Xiang et coll., 1996). En l'absence de Brn3a, le noyau olivaire ne présente pas de défauts majeurs, ce qui pourrait refléter une compensation fonctionnelle par Brn3b dont l'expression persiste. Seule une légère diminution du nombre de neurones olivaires est observée dans la région caudale de l'OI où Brn3b est faiblement exprimé (Xiang et coll., 1996).

4.3.3 Guidage de la migration des neurones précérébelleux

Les NPC migrent dans un environnement moléculaire riche en molécules de guidage de plusieurs natures : des facteurs diffusibles sécrétés par les lèvres rhombiques, la plaque du plancher ou d'autres cellules présentes sur leur trajet de migration ; des molécules d'adhérence situées à la surface d'axones commissuraux. Enfin, l'ensemble des NPC est généré et migre sur une longue période (entre E10 et E18) au cours de laquelle cet environnement peut évoluer rapidement et imposer différents comportements migratoires.

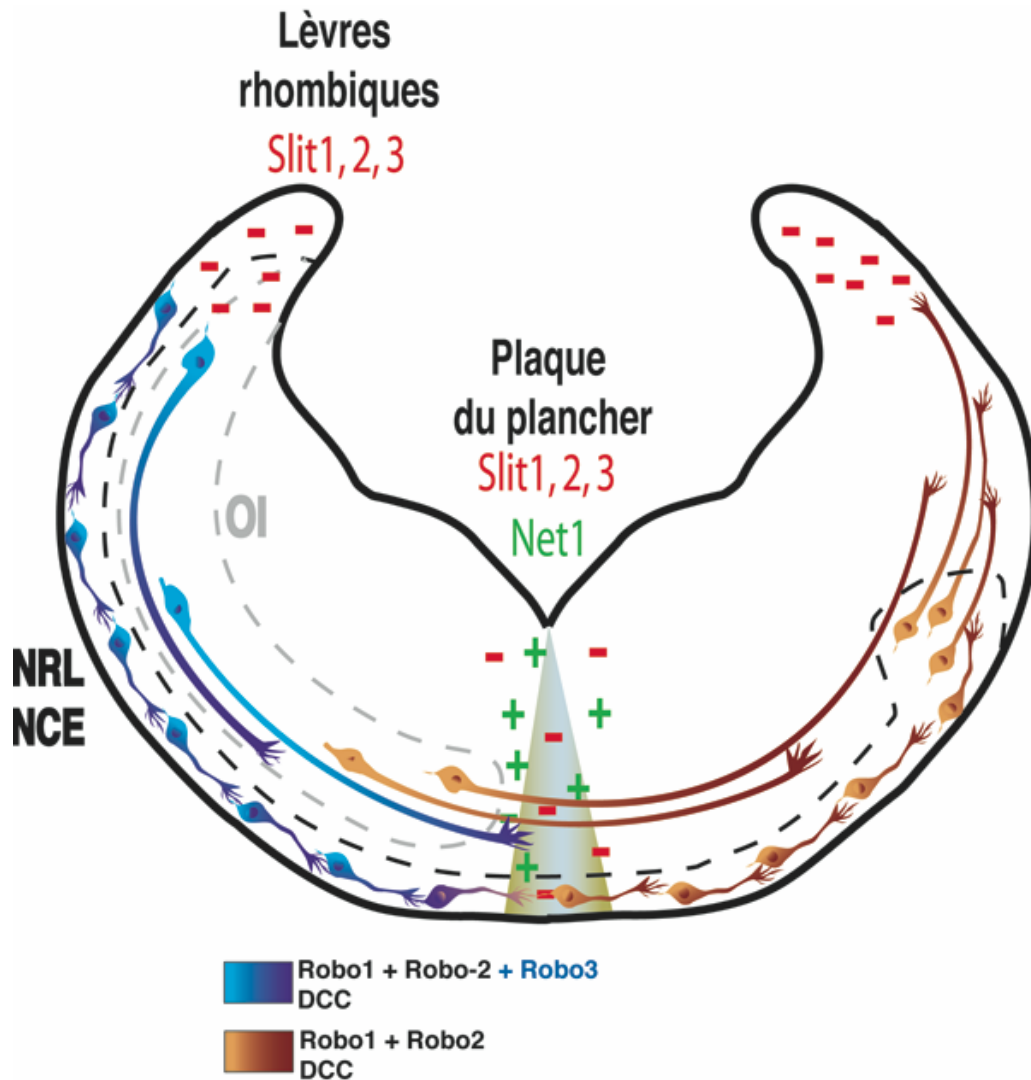


Figure 53: Systèmes de guidage pouvant être impliqués dans la migration des neurones précérébelleux

Représentation schématique des voies de migration marginale (pointillés gris) et sous marginale (pointillés noir) en coupe coronale médullaire (A). Les gènes *robo1*, *robo2* et *DCC* sont exprimés (ARN messagers détectés) à toutes les étapes de la migration des neurones de l'olive inférieure et du noyau réticulaire latéral (NRL). L'expression de *robo3* est retrouvée initialement à la sortie des lèbres rhombiques. Elle est ensuite inactivée dans les neurones du NRL qui ont franchi la ligne médiane (LM) ou dans les neurones olivaires dont les axones ont décussé. Ces derniers n'expriment plus *robo3* quand leurs corps cellulaires arrivent à la ligne médiane. Les neurones du noyau cuneatus externe ne sont pas représentés mais se comportent comme les neurones du NRL.

4.3.3.1 Fonctions des molécules d'adhérence de la famille des IgCAM

Les neurones à fibres moussues ou à fibres grimpances n'expriment pas les mêmes molécules d'adhérence au cours de leur migration. Comme dans la moelle épinière, la NrCAM est présente à la surface des prolongements épithéliaux des cellules de la plaque du plancher du tronc cérébral. Elle est aussi enrichie à la surface de l'axone ou du soma des neurones olivaires en migration (Backer et coll., 2002). A l'inverse, Tag1 est fortement exprimée à la surface des NPC à fibres moussues (NRL, NCE et NP) en migration, mais absente des neurones olivaires (Wolfer et coll., 1994 ; Yee et coll., 1999 ; Alcantara et coll., 2000 ; De Diego et coll., 2002 ; Kyriakopoulou et coll., 2002 ; Backer et coll., 2002). Cette expression persiste après le croisement de la ligne médiane jusqu'à la période post-natale (Kyriakopoulou et coll., 2002). Nous avons vu que Tag1 agit en interaction avec la NrCAM afin de permettre aux axones commissuraux de la moelle épinière de progresser à travers la ligne médiane (Fitzli et coll., 2000). Une même fonction a été envisagée durant la migration des NPC. Chez les souris déficientes en *Tag1*, le nombre de neurones du NRL et de NCE en migration est diminuée. La plupart meurent par apoptose, ce qui suggère que Tag1 puisse être un facteur de survie. Les neurones persistants croisent la ligne médiane et se positionnent normalement (Denaxa et coll., 2005). L'analyse des souris déficientes en *NrCAM* n'a révélé aucun défaut majeur dans la mise en place des NPC et de leurs projections (communication personnelle de C. Sotelo). De plus, le blocage des fonctions de la NrCAM ou de Tag1 en culture, ne compromet pas la migration des neurones du NRL et de NCE à travers la ligne médiane. Tag1 semble cependant faciliter cette étape en leur permettant de rentrer au contact de fibres commissurales (Tuj1 positives), qui les aident à franchir la ligne médiane (Kyriakopoulou et coll., 2002). La NgCAM est connue pour son implication dans la migration neuronale d'autres systèmes (Schwanzel-Fukuda et Pfaff, 1994). Exprimée par les neurones du pont, cette IgCAM pourrait compenser fonctionnellement l'absence de Tag1 (Ono et coll., 1992 ; Denaxa et coll., 2005).

4.3.3.2 Fonctions de facteurs chimiotropiques

Durant la migration des NPC, les gènes *slit 1, 2, 3* et *nétrine1* sont co-exprimés par les cellules formant la plaque du plancher (Fig.53), ainsi que dans la zone ventriculaire adjacente (Bloch-Gallego et coll., 1999 ; Alcantara et coll., 2000 ; De Diego et coll., 2002). Les Slits sont aussi exprimés dans les lèvres rhombiques et plusieurs noyaux des nerfs moteurs et sensoriels (Marillat et coll., 2004 ; Hammond et coll., 2005 ; observations personnelles). Les NPC sont susceptibles d'être guidés sous l'action de ces facteurs chimiotropiques, car ils expriment plusieurs de leurs récepteurs. Tous les NPC en migration expriment les messagers codant les trois récepteurs aux Slits (Robo1, Robo2 et Robo3/Rig1). L'expression de Robo3 disparaît

lorsque ces neurones (NRL/NCE) ou leurs axones (OI, PN) ont franchi la ligne médiane, alors que l'expression des autres gènes *robos* persiste (Fig.53 ; Marillat et coll., 2004 ; Taniguchi et coll., 2002 ; observations personnelles). Plusieurs récepteurs à la Nétrine1 sont également exprimés par les NPC. Dans les lèvres rhombiques, leurs précurseurs expriment les messagers codant les récepteurs *Unc5h1* et *Unc5h2* mais pas *DCC*. En revanche, durant la migration des NPC vers la ligne médiane, l'expression de *DCC* est activée alors que celle des récepteurs *Unc5h* est transitoirement réprimée. Enfin, ces deux types de récepteurs se retrouvent co-exprimés quand les neurones des NP et de l'OI atteignent la plaque du plancher (Yee et coll., 1999 ; Bloch-Gallego et coll., 1999 ; Alcantara et coll., 2000). Ils sont ensuite retrouvés dans certaines sous-unités olivaires durant la lamellation de ce noyau (Bloch-Gallego et coll., 1999).

➤ Fonction attractive de la Nétrine1 sécrétée par la plaque du plancher

Dans des cultures en gel de collagène, la plaque du plancher stimule la migration de toutes les catégories de NPC issus d'explants prélevés à différents âges embryonnaires et à différents niveaux antéro-postérieurs des lèvres rhombiques (Yee et coll., 1999 ; Alcantara et coll., 2000 ; Taniguchi et coll., 2002). Par ailleurs, dans un système de cultures organotypiques de tronc cérébral d'embryon de poulet, les neurones de l'OI et du NRL/NCE sortant des lèvres rhombiques réorientent leur migration vers un explant de plaque du plancher placé latéralement (De Diego et coll., 2002). Cependant, après une ablation de la plaque du plancher, la migration ventrale des NPC se déroule normalement. Ceci suggère que les lèvres rhombiques exercent elles-mêmes un effet répulsif sur les NPC post-mitotiques, les poussant ventralement dans leur voie de migration. Ceci n'a toutefois jamais été vérifié expérimentalement.

La Nétrine1 mime une partie des effets de la plaque du plancher sur toutes les catégories de NPC. Cette molécule de guidage a plusieurs effets discernables *in vitro* : elle stimule la croissance axonale ainsi que la migration des NPC, tout en exerçant un effet attractif (Alcantara et coll., 2000 ; Causeret et coll., 2002 ; De Diego et coll., 2002 ; Yee et coll., 1999). Le blocage de la fonction de *DCC* abolit l'action de la Nétrine1 *in vitro* (Taniguchi et coll., 2002 ; Yee et coll., 1999). Cette influence de la Nétrine1 s'exerce également sur d'autres neurones à migration ventrale issus des lèvres rhombiques plus antérieures (Gilthorpe et coll., 2002).

La fonction de la Nétrine1 a ensuite été confirmée *in vivo* par l'analyse de la migration des neurones olivaires et pontins chez les souris *nétrine1^{-/-}*. En l'absence de Nétrine1, le nombre de neurones olivaires est fortement réduit (d'environ 40%). Ce facteur est donc impliqué dans la survie de ces neurones, avant qu'ils ne rentrent en contact avec leur cible. Les neurones olivaires qui survivent se développent anormalement. D'une part, une partie importante (50%) s'arrête prématurément le long de la voie de migration sous-marginale. D'autre part, la quasi-totalité de ces neurones projette leur axone vers l'hémisphère du cervelet ipsilatéral (Bloch-

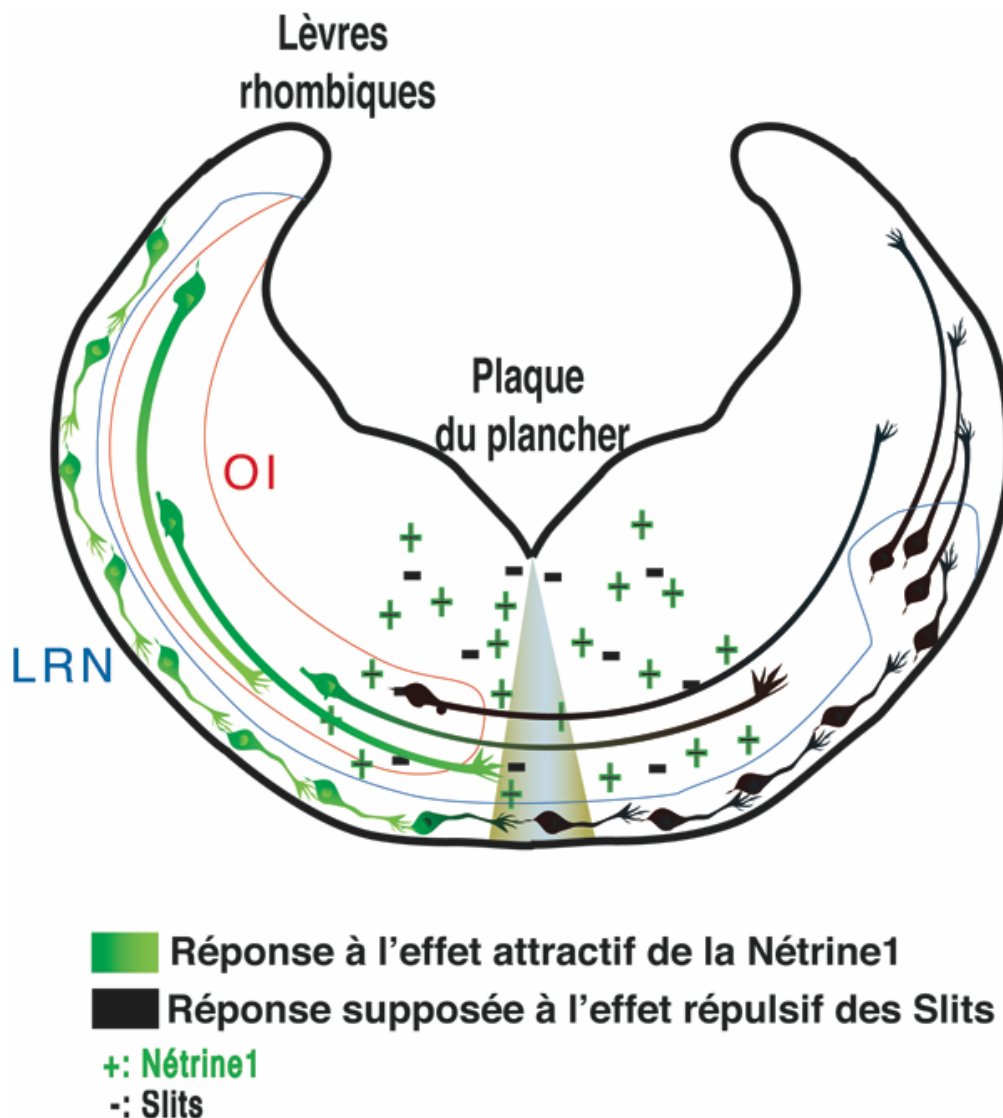


Figure 54: Modèle d'action des molécules de guidage Slits et Nétrine1

Représentation schématisée d'une coupe coronale médullaire montrant les voies de migration marginale (bleue) et sous marginale (rouge). Les neurones du noyau réticulaire latéral (NRL) qui ont franchi la ligne médiane perdent leur sensibilité à l'effet attractif de la Nétrine1. Ceci est également le cas des axones des neurones olivaires (OI). En revanche, la réponse de leurs corps cellulaires est plus complexe. Ils sont sensibles à l'action de la Nétrine1 qui les attire à la ligne médiane. Arrivés à la ligne médiane, les corps cellulaires s'arrêtent et ne répondent donc plus au signal Nétrine1.

Les Slit sont supposés agir pour déclencher l'arrêt des corps cellulaires à la ligne médiane et repousser les éléments neuronaux ayant décussé.

Les éléments neuronaux qui ont franchi la ligne médiane sont au moins en partie guidés sous l'action de facteurs attractifs diffusibles dorsaux de nature inconnue.

Gallego et coll., 1999). Ainsi, la Nétrine1 apparaît responsable de l'effet attractif de la plaque du plancher sur les neurones olivaires en migration. Elle permet à leurs axones de croiser la ligne médiane et à leurs corps cellulaires de se positionner ventralement. L'implication du récepteur DCC dans cette action de guidage est supposée, mais reste à confirmer. DCC agit comme un récepteur « à dépendance » : il peut déclencher un signal apoptotique en absence de son ligand. Il serait ainsi responsable de la mort des neurones olivaires survenant chez les souris *nétrine1^{-/-}* (Llambi et coll., 2001).

L'absence de Nétrine1 engendre également d'importants défauts de migration des neurones du pont. Ils n'atteignent pas leur localisation ventrale et restent positionnés de manière ectopique au niveau latéral du tronc cérébral. Ils n'apparaissent donc plus sensibles à l'effet attractif de la plaque du plancher. En absence de Nétrine1, la survie des neurones du pont est également affectée (Serafini et coll., 1996 ; Yee et coll., 1999). Dans ce système, il est établi que la Nétrine1 agit en interaction avec le récepteur DCC *in vivo*. En effet, chez les souris déficientes en DCC, les neurones du pont forment des agrégats ectopiques et ne pénètrent pas non plus dans la région ventrale du tronc cérébral. La migration des neurones du NRL/NCE chez les souris déficientes en *nétrine1* ou *DCC* n'a en revanche jamais été décrite.

➤ Mise en jeu de l'action répulsive des Slits à la ligne médiane ?

Lors des expériences de greffes citées ci-dessus, les neurones olivaires attirés par une plaque du plancher ectopique vont venir s'agréger autour de celle-ci sans la traverser. Chez le poulet, l'excision des cellules de la plaque du plancher provoque la fusion des deux compartiments olivaires à la ligne médiane (Bloch-Gallego et coll., 1999). Cette région médiane a donc deux effets sur ces neurones en migration : un effet attractif s'exerçant à longue distance et contribuant à attirer ces neurones ventralement ; un effet répulsif à courte distance déclenchant l'arrêt de ces neurones ventralement (De Diego et coll., 2002). A l'inverse, les neurones du NRL et du NCE, déviés de leur voie de migration par une plaque du plancher ectopique vont pouvoir la traverser. Ainsi, ce signal d'arrêt agit spécifiquement sur les neurones olivaires. Par ailleurs, seuls les neurones du NRL et du NCE pré-commissuraux sont attirés vers une plaque du plancher ectopique. Ils deviennent insensibles à cet effet attractif une fois qu'ils ont franchi la ligne médiane et pénétré dans le territoire controlatéral. Ce changement se produit au contact de la plaque du plancher. En effet, si la plaque de plancher endogène est excisée et qu'une plaque du plancher ectopique est placée controlatéralement, les neurones post-commissuraux restent sensibles à son effet attractif (Taniguchi et coll., 2002). Il apparaît donc que le comportement de tous ces NPC à la ligne médiane met en jeu une perte de sensibilité à la Nétrine1 exprimée par plaque du plancher. Celle-ci survient dans les neurones olivaires

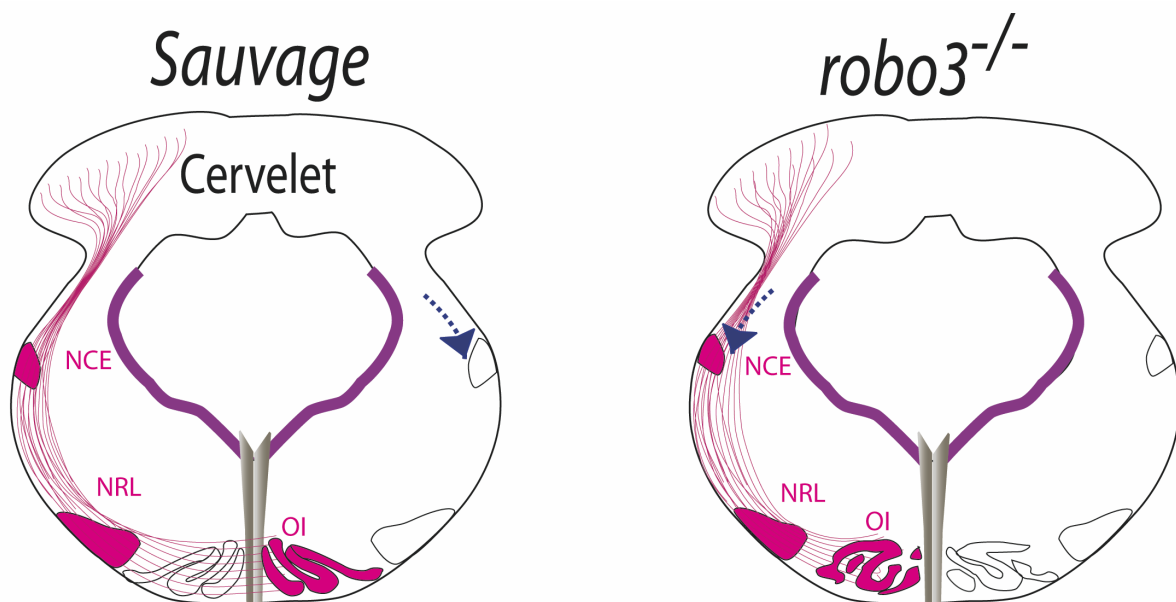


Figure 55: Analyse des souris déficientes en Robo3, un facteur indispensable à la décussation des neurones précérébelleux

Représentation schématique de coupes coronales médullaires de tronc cérébral, illustrant le positionnement des neurones de l'olive inférieure (OI), du noyau réticulaire latéral (NRL) et du noyau cuneatus externe (NCE) chez des souris sauvages ou déficientes en *robo3*. En absence de Robo3, ces NPC ne parviennent pas à croiser la ligne médiane. Ils projettent tous leurs axones ipsilatéralement, vers l'hémisphère cérébelleux situé du côté de leur lieu de naissance (flèche bleue).

approchant la plaque du plancher et dans les neurones du NRL et du NCE l'ayant croisée (Fig.54).

Plusieurs données *in vivo* suggèrent que l'action des Slits peut-être déterminante dans ce changement de sensibilité des NPC à la Nétrine1 (Causeret et coll., 2002). En culture, la migration de NPC issus d'explants de lèvres rhombiques inférieures à E11, est fortement attirée et stimulée par une source de Nétrine1. A l'inverse, les protéines Slits seules n'ont qu'un léger effet répulsif sur la croissance axonale des NPC. Cependant, l'action des Slits peut antagoniser les effets permissifs de la Nétrine1 sur la croissance axonale et la migration des NPC. Les Slits ont alors un effet dose dépendant : à faible dose, ils inhibent seulement l'effet attractif de la Nétrine1, alors qu'à forte dose ils inhibent également son effet stimulant la migration et la croissance neuritique des NPC (Causeret et coll., 2002). Le modèle d'interaction vérifié dans les axones commissuraux de la moelle épinière pourrait expliquer cet effet. Les récepteurs Robo1, Robo2 et DCC sont co-exprimés dans les NPC en migration. L'activation des récepteurs Robos par les Slits peut inhiber l'effet attractif du système Nétrine1/DCC par une interaction directe entre ces récepteurs à la membrane (Stein et Tessier-Lavigne, 2001). Ceci implique cependant que Robo1 et Robo2 doivent rester inactifs tant que les NPC n'ont pas franchi la plaque du plancher.

Plusieurs données suggèrent que Robo3 pourrait être responsable de cette inhibition, comme c'est le cas pour les axones commissuraux de la moelle épinière (Sabatier et coll., 2004). D'une part, l'expression de Robo3 dans les NPC en migration disparaît après le croisement de la ligne médiane (Fig.55 ; Marillat et coll., 2004). D'autre part, aucun NPC ne parvient à franchir la ligne médiane en son absence. Chez les souris déficientes pour Robo3, les neurones olivaires occupent bien une position ventrale mais projettent anormalement leurs axones vers le cervelet ipsilatéral. Les neurones du NRL et du NCE ne traversent pas la ligne médiane au cours de leur migration et se positionnent dans la moitié du cerveau où ils sont nés. Enfin, les corps cellulaires des neurones du pont restent bloqués latéralement sans parvenir à entamer leur dernière phase de migration transversale ventrale. *Robo3* est également essentiel à la migration des neurones du pont chez l'homme, ce noyau n'étant pas formé chez les patients atteints du syndrome HGPPS causé par la mutation de ce gène (Jen et coll., 2004). La fonction de Robo3 dans les NPC se doit donc d'être précisée.

5 Présentation des travaux

La formation des projections commissurales met donc en jeu l'action concertée de plusieurs familles de molécules de guidage. Celles-ci sont capables d'attirer/stimuler ou de repousser/inhiber la croissance axonale et/ou la migration neuronale. Elles contrôlent ainsi l'orientation de ces mouvements neuronaux *in vivo*. Le système Slit/Robo a été découvert chez les invertébrés grâce à l'étude d'animaux déficients pour ces gènes et se trouve impliqué dans le contrôle du croisement de la ligne médiane. Ces gènes sont conservés chez les vertébrés, mais en est-il de même de leur fonction? Les travaux réalisés au laboratoire depuis plusieurs années visent à répondre à cette question, tout d'abord par la caractérisation *in vitro* de l'activité des molécules Slits et Robos mais aussi par l'analyse *in vivo* des conséquences de l'absence d'un ou plusieurs de ces gènes chez la souris. Une première étape a consisté en l'analyse des souris déficientes pour les gènes *slits*, qui permet de démontrer leur implication dans la formation de plusieurs voies de projections commissurales de la moelle épinière et du cerveau antérieur (cf. introduction). Ainsi j'ai commencé mon travail de thèse, au moment où la mise en jeu des récepteurs Robo1 et Robo2 dans l'action des Slits restait à confirmer *in vivo*. Une compensation fonctionnelle entre Robo1 et Robo2 était à envisager, puisque ces deux récepteurs sont souvent co-exprimés dans les systèmes neuronaux affectés chez les mutants *slits*. Nous avons donc entrepris l'étude des souris simplement et doublement déficientes pour *robo1* et *robo2* en nous focalisant sur les systèmes olfactifs et corticaux (cf. articles 1 et 2). Depuis, l'analyse des projections corticales chez des souris dépourvues de récepteurs Robo1 fonctionnels a été publiée (Andrews et coll., 2006). Ces souris présentent un phénotype moins fort que les souris déficientes en *slit1* et *slit2*. Ceci nous a donc conforté dans l'idée d'une éventuelle action compensatrice de Robo2 dans ce système, ce que nous avons par la suite confirmé (cf. article 2).

Nous avons également utilisé le système des neurones précérébelleux afin de caractériser et de comprendre le rôle des Slits et Robos dans le contrôle du croisement de la ligne médiane par des neurones en migration. La fonction du gène *robo3* avait précédemment été caractérisée au laboratoire : il est essentiel au croisement de la ligne médiane (Marillat et coll., 2004). D'une part, nous avons poursuivi ce travail par l'étude des souris déficientes en *robo1/robo2* ou *slit1/slit2* afin de démontrer leurs interactions *in vivo*. D'autre part, nous avons analysé les souris déficientes en *DCC* afin de vérifier son implication dans la réponse de tous les NPC à l'effet de la Nétrine1 *in vivo*. La fonction de ces deux systèmes attractif et répulsif ayant été précisée, il devenait envisageable d'essayer de comprendre le mode d'action de Robo3. Selon le modèle d'interactions proposé pour expliquer le guidage des axones commissuraux de la moelle épinière, Robo3 pourrait fonctionner comme un modulateur négatif de l'activité répulsive induite par la liaison des Slits aux récepteurs Robo1 et Robo2 (Long et coll., 2004). Nous avons

testé ce schéma d'interactions par l'analyse des souris déficientes en *robo1/robo2/robo3*. Toutefois, Robo3 pourrait aussi participer à la fonction attractive de DCC ou agir en parallèle de celui-ci. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude des souris déficientes en *robo3/DCC*.

Ces travaux ont permis de révéler deux nouveaux aspects de la fonction du système Slit/Robo durant la migration neuronale *in vivo* :

- Il contrôle le comportement des corps cellulaires à la ligne médiane en déterminant notamment leur capacité à la franchir (article 4).
- Il détermine le choix entre une orientation de migration tangentielle antéro-postérieure ou dorso-ventrale (article 3) en agissant sous le contrôle de gènes *Hoxs* dans ce processus.

RESULTATS

Article 1 : Robo1 et Robo2 coopèrent au guidage des axones du tractus olfactif latéral

Article 2 : Robo1 et Robo2 coopèrent au guidage des voies de projections axonales du télencéphale

Article 3 : La signalisation Slit/Robo dirige la migration des neurones du pont sous le contrôle des gènes *Hox*s

Article 4 : Mécanismes moléculaires contrôlant le croisement de la ligne médiane par les neurones précérébelleux en migration

Article 1 : Robo1 et Robo2 coopèrent au guidage des axones du tractus olfactif latéral

Le tractus olfactif latéral (TOL) est formé par les axones des cellules mitrales du bulbe olfactif, qui projettent ipsilatéralement sous la surface piaie vers le cortex olfactif plus caudal. Ces axones sont repoussés *in vitro* par des molécules diffusibles répulsives sécrétées par le septum, région ventro-médiane du télencéphale que ces axones évitent durant leur croissance (Pini, 1993). Il est maintenant établi que Slit1 et Slit2 sont impliqués dans l'activité répulsive exercée par le septum sur ces axones *in vitro* et *in vivo*. En effet, les axones du TOL sont fortement désorganisés chez les souris déficientes en Slit1 et Slit2 (Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2002). Les récepteurs impliqués dans la réponse des axones du TOL aux Slits *in vivo* n'étaient cependant pas identifiés. Nous montrons ici que les récepteurs Robo1 et Robo2 coopèrent à cette fonction :

- Ces récepteurs sont co-exprimés à partir de E13 à la surface des axones du TOL en projection. Robo1, qui n'est détecté que dans une sous-population d'axones du TOL, a totalement disparu à E16. Robo2, exprimé par l'ensemble de ces axones, persiste à leur surface plus tardivement.
- Les axones du TOL sont capables d'interagir avec des protéines de fusion constituées du domaine LRR2 de Slit1 ou Slit2 couplé à la phosphatase alcaline. Cette interaction persiste chez les souris *robo1^{-/-}* ou *robo2^{-/-}* contrairement aux souris *robo1^{-/-} ; robo2^{-/-}*. Ces récepteurs sont donc les seuls récepteurs des Slits exprimés à la surface du TOL.
- En l'absence de Robo1 et Robo2, les axones du TOL perdent leur capacité à répondre à l'effet des Slits ou à un explant de plaque du plancher *in vitro*.
- Des expériences de traçage axonal ou l'utilisation de marqueurs immuno-histochimiques démontrent que les souris *robo1^{-/-} ; robo2^{-/-}* présentent les mêmes défauts de développement du TOL que les souris *slit1^{-/-} ; slit2^{-/-}*. La majorité des axones formant le TOL sont defasciculés et déplacés vers le septum. En revanche, le TOL est normal chez les souris *robo1^{-/-}* ou *robo2^{-/-}*.
- Les cellules du TOL n'expriment pas les récepteurs Robos et sont correctement présentes et positionnées chez les souris *slit1^{-/-} ; slit2^{-/-}* ou *robo1^{-/-} ; robo2^{-/-}*. Elles sont retrouvées au contact de certains axones du TOL projetant normalement en position latérale mais n'entourent pas les faisceaux d'axones ectopiques.

Ainsi, ces résultats démontrent que les récepteurs Robo1 et Robo2 coopèrent *in vivo* lors du guidage des axones du TOL, en leur permettant de répondre à l'activité répulsive des molécules Slit1 et Slit2 sécrétées au niveau du septum. Ils empêchent ces axones de croiser la ligne médiane et leur permettent d'emprunter une voie de projection latérale correcte.

Robo1 and Robo2 Control the Development of the Lateral Olfactory Tract

Coralie Fouquet,^{1,2} Thomas Di Meglio,^{1,2} Le Ma,⁴ Takahiko Kawasaki,³ Hua Long,⁴ Tatsumi Hirata,³ Marc Tessier-Lavigne,³ Alain Chédotal,^{1,2} and Kim T. Nguyen-Ba-Charvet^{1,2}

¹Centre National de la Recherche Scientifique and ²Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Unité Mixte de Recherche 7102, Paris, 75005 France, ³Division of Brain Function, National Institute of Genetics, Graduate University for advanced Studies (Sokendai), Yata 1111, Mishima 411-8540, Japan, and ⁴Howard Hughes Medical Institute, Department of Biological sciences, Stanford University, Stanford, California 94305

The development of olfactory bulb projections that form the lateral olfactory tract (LOT) is still poorly understood. It is known that the septum secretes Slit1 and Slit2 which repel olfactory axons *in vitro* and that in *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{-/-} mutant mice, the LOT is profoundly disrupted. However, the involvement of Slit receptors, the roundabout (Robo) proteins, in guiding LOT axons has not been demonstrated. We show here that both Robo1 and Robo2 receptors are expressed on early developing LOT axons, but that only Robo2 is present at later developmental stages. Olfactory bulb axons from *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-} double-mutant mice are not repelled by Slit *in vitro*. The LOT develops normally in *Robo1*^{-/-} mice, but is completely disorganized in *Robo2*^{-/-} and *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-} double-mutant embryos, with many LOT axons spreading along the ventral surface of the telencephalon. Finally, the position of lot1-expressing cells, which have been proposed to be the LOT guidepost cells, appears unaffected in *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{-/-} mice and in *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-} mice. Together, our results indicate that Robo1 and Robo2 directly mediate the repulsive activity of Slit receptors on LOT axons, and are required for normal guidance of these axons *in vivo*.

Key words: chemorepulsion; olfactory bulb; Slit; roundabout; axon guidance; midline

Introduction

The development of axonal projections has been studied extensively in the olfactory system. Olfactory neurons from the olfactory epithelium send their axons to specific glomeruli in the main olfactory bulb (OB), where they synapse on the dendrites of mitral and tufted cells. These OB neurons then project to the primary olfactory cortex (Schwob and Price, 1984; Shipley and Ennis, 1996; Zou et al., 2001). OB axons are positioned laterally, under the pial surface, and constitute the lateral olfactory tract (LOT). The first mitral cell axons leave the OB at embryonic day 12.5 (E12.5) in mice and the LOT is discernible the following day (Pini, 1993; Sugisaki et al., 1996). Organotypic cocultures of OB and telencephalic vesicles or cell membranes have suggested that LOT axons are guided by short-range cues distributed along their pathway on guidepost cells called “lot” cells (Sugisaki et al., 1996; Hirata and Fujisawa, 1997). Moreover, LOT axons were also shown to be repelled *in vitro* by diffusible factors secreted by the olfactory epithelium, septum, and olfactory cortex (Pini, 1993; Hu and Rutishauser, 1996; de Castro et al., 1999). Thus, the path-

finding of LOT axons in the telencephalon involves a combination of short- and long-range cues. We have shown previously that the septum-derived repellents for LOT axons are two Slit proteins, Slit1 and Slit2 (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999, 2002), but the receptor(s) mediating Slit function in this system have not been fully defined.

The major functional receptors for Slits are members of the roundabout (Robo) receptors. The first roundabout gene, *Robo*, was identified in *Drosophila* in a screen for genes regulating midline crossing in the CNS (Seeger et al., 1993). Three *Robo* genes have been found in *Drosophila* (Kidd et al., 1998; Rajagopalan et al., 2000a; Simpson et al., 2000b) and mammals (Brose et al., 1999; Li et al., 1999; Yuan et al., 1999; Jen et al., 2004), and one in *Caenorhabditis elegans* (Zallen et al., 1998). Mammalian Slits can bind to all Robo receptors with comparable affinity (Brose et al., 1999; Li et al., 1999; Sabatier et al., 2004). Robo proteins belong to the Ig superfamily and have five Ig-like domains followed by three fibronectin type III repeats, a transmembrane portion and an intracellular tail containing conserved cytoplasmic motifs. Another protein, Robo4, containing the first two Ig domains has been found only expressed by endothelial cells and plays a role in angiogenesis (Huminiacki et al., 2002; Bedell et al., 2005), but its ability to bind Slit is debated (Suchting et al., 2005). The involvement of Robo receptors in Slit signaling *in vivo* has been well demonstrated in invertebrates (Kidd et al., 1998; Rajagopalan et al., 2000a,b; Simpson et al., 2000a), in the spinal cord of vertebrates (Sabatier et al., 2004), and in *C. elegans* (Hao et al., 2001). We show here, using *in vitro* assays, binding studies, and the phenotypic analysis of *Robo1* and *Robo2* mouse knock-outs, that

Received Nov. 6, 2006; revised Feb. 13, 2007; accepted Feb. 14, 2007.

This work was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer to A.C. We thank Dr. Yumiko Saga (National Institute of Genetics, Mishima Japan) for providing the gene-trap mouse line.

Correspondence should be addressed to Alain Chédotal, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7102, Université Pierre et Marie Curie, Equipe Développement Neuronal, Case 12, 9 quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France. E-mail: alain.chédotal@snv.jussieu.fr.

L. Ma's present address: Department of Cell and Neurobiology, Zilkha Neurogenetic Institute, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089.

M. Tessier-Lavigne's present address: Genentech, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0172-07.2007

Copyright © 2007 Society for Neuroscience 0270-6474/07/273037-09\$15.00/0

Robo1 and Robo2 are the receptors mediating Slit repulsive action on LOT axons.

Materials and Methods

Swiss mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were used for binding studies. *Slit*-deficient mice and *Robo*-deficient mice were described previously and genotyped by PCR (Plump et al., 2002; Grieshammer et al., 2004; Long et al., 2004) (L. Ma and M. Tessier-Lavigne, unpublished observation). To better visualize LOT axons, *Slit1*/*Slit2* mutant mice were crossed to the ERE mouse line, a trap line in which the *lacZ* reporter gene was randomly inserted into the genome (a gift from Y. Saga, National Institute of Genetics, Mishima, Japan). The insertion site is still unknown. The day of the vaginal plug was counted as E0 and the day of the birth as postnatal day 0 (P0). Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg). All animal procedures were performed in accordance with institutional guidelines.

Generation of LRR2-hSlit1-AP and LRR2-hSlit2-AP. To generate the human leucine-rich repeat (LRR) Slit1/2-alkaline phosphatase (AP) fusion proteins (LRR2-hSlit1-AP or LRR2-hSlit2-AP), the second LRR of Slit1 (amino acids 282–512) or Slit2 (amino acids 341–505) was amplified by PCR and cloned between the *Xho*I and *Xba*I sites of the AP-Tag5 vector (GenHunter, Nashville, TN).

Binding studies. Human embryonic kidney 293 cells were transfected with LRR2-hSlit1/2-AP using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, Ca) and grown for 48 h. The supernatant was used directly without additional purification. AP activity was measured as described previously (Flanagan and Leder, 1990) and the presence of the fusion protein in the supernatant confirmed on Western blot with an anti-AP antibody (1:6000; GenHunter). A single band at the expected molecular weight 100 kDa was detected (data not shown).

Binding was performed as described by Kolodkin et al. (1997). Briefly, 20 μ m cryosections (from fresh-frozen brains) were fixed for 8 min in cooled 100% methanol. The sections were then washed three times in PBS, 4 mM MgCl₂, and incubated in a blocking solution (PBS, 4 mM MgCl₂, 10% fetal bovine serum; Invitrogen) for 1 h at room temperature (RT). Four-hundred microliters of LRR2-hSlit1/2-AP supernatant, diluted 1/5 in PBS, were added to the sections and incubated for 2 h. After five washes in 4 mM MgCl₂ in PBS at RT, sections were fixed for 2 min with 60% acetone, 4% paraformaldehyde, and 20 mM HEPES, pH 7. After five additional washes in PBS, the sections were incubated at 65°C for 2 h in PBS to inactivate endogenous phosphatases. Sections were washed twice in PBS and incubated in 100 mM Tris, pH 9.5, 100 mM NaCl, and 5 mM MgCl₂ for 5 min. Last, the slides were incubated for 2 h at RT in 100 mM Tris, pH 9.5, 100 mM NaCl, and 5 mM MgCl₂, containing 300 μ g/ml nitroblue tetrazolium (NBT; Roche, Meylan, France) and 250 μ g/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP; Roche).

Immunocytochemistry. Until E16, embryos were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.12 M phosphate buffer, pH 7.4. Older mice were perfused transcardially with 4% PFA, postfixed for 3 h, and then cryoprotected in 10% sucrose. Cryostat sections were blocked in 0.2% gelatin in PBS containing 0.25% Triton X-100 and incubated overnight at RT with goat anti-neuropilin 1 (NP1; R & D Systems, Minneap-

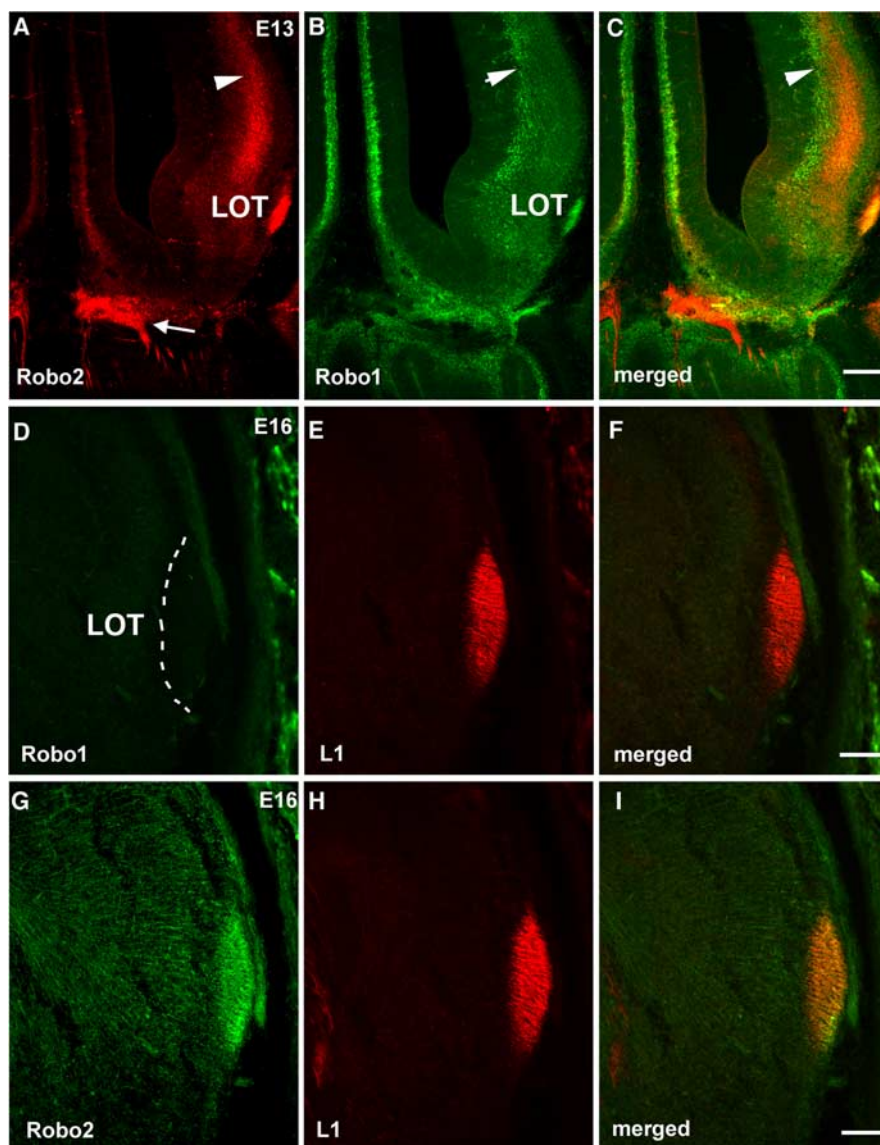


Figure 1. Expression of Robo1 and Robo2 in the lateral olfactory tract. **A–C**, Immunocytochemical analysis of Robo2 (**A**) and Robo1 (**B**) expression on E13 coronal sections of mouse forebrain. Robo1 and Robo2 are both expressed in the LOT, but Robo1 is only detected in a subpopulation of axons. Robo2 is also present in olfactory sensory axons (arrow). Robo1 and Robo2 are expressed in the intermediate zone of the neocortex (arrowhead). **D–I**, Immunocytochemistry against Robo1 (**D**, **F**), Robo2 (**G**, **I**), and L1 (**E**, **F**, **H**, **I**) on E16 telencephalon coronal sections. At this stage, Robo1 is no longer detected in the LOT (dashed line), although Robo2 is still observed in all of the LOT axons labeled by L1 (**I**). Scale bars: (in **C**) **A–C**, 150 μ m; (in **F**, **I**) **D–I**, 90 μ m.

olis, MN), rat anti-L1 (Millipore, Temecula, CA), goat anti-Robo1 (R & D Systems), goat anti-Robo2 (R & D Systems), rabbit anti-Robo2 (a gift from Dr. Murakami, Osaka, Japan) (Sabatier et al., 2004), goat anti-Robo3 (R & D Systems), rabbit anti- β -galactosidase (MP Biomedicals, Irvine, CA), and rat mAb Lot1 (Sato et al., 1998), followed by species-specific secondary antibodies directly conjugated to fluorophores [cy-3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) or Alexa Fluor (Invitrogen)]. Sections were examined under a fluorescent microscope (DMR; Leica, Nussloch, Germany).

PLAP staining. Cryostat section, pretreated just as for immunocytochemistry, were incubated 30 min in PBS at 65°C, buffered 10 min in B3 buffer (0.1 M Tris, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂). We then detected human placental alkaline phosphatase (PLAP) activity with 0.1 mg/ml BCIP and 1 mg/ml NBT in B3 buffer. PLAP-stained tissue was then washed in PBS and mounted in Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA).

X-Gal staining. ERE mouse is a gene-trap line isolated from the random insertion series of the β -galactosidase gene into the mouse genome performed by Dr. Yumiko Saga at the National Institute of Genetics in

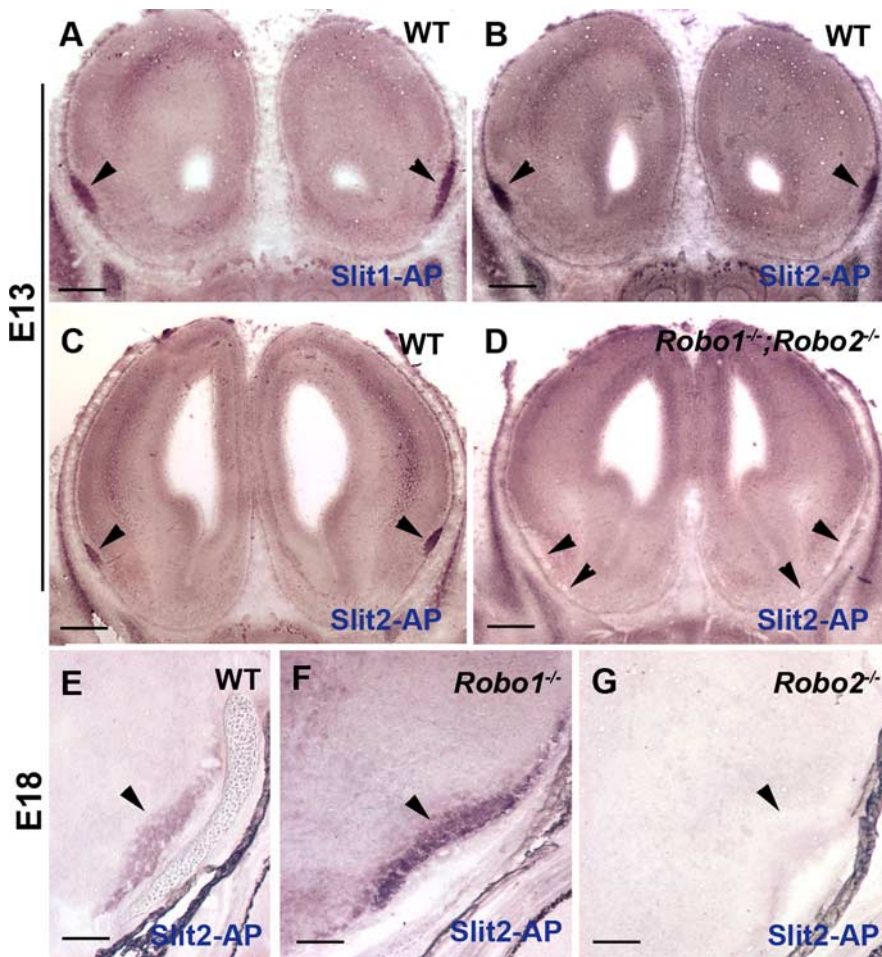


Figure 2. LRR2-hSlit-AP binding to LOT axons. **A–G**, LRR2-hSlit1-AP (Slit1-AP) and LRR2-hSlit2-AP (Slit2-AP) proteins were applied to E13 (**A–D**) or E18 (**E–G**) forebrain coronal sections at the level of the LOT. **A, B**, Both Slit1-AP and Slit2-AP bind to the LOT (arrowheads). **C, D**, Slit2-AP binding is only observed on LOT axons from wild-type mice (WT; **C**, arrowheads) and not on defasciculated LOT axons from *Robo1;Robo2* double mutants (**D**, arrowheads). **E–G**, At E18, Slit2-AP still strongly binds to LOT axons (arrowheads) from WT (**E**) and *Robo1^{-/-}* mice (**F**), but not on LOT axons from *Robo2^{-/-}* mice (**G**). Scale bars: **A–D**, 560 μm ; **E–G**, 60 μm .

Japan. The brains of the embryos were dissected and stained using X-Gal by the method of Saga et al. (1992). In the line, most, if not all, of the main olfactory projection neurons were found expressing β -galactosidase (T. Kawasaki and T. Hirata, unpublished observation).

Repulsion assay. OB explants from E14.5 *Robo*-deficient, heterozygous, and wild-type littermate embryos were cocultured in collagen gels with aggregates of *Slit2*-transfected COS-7 cells [transformed African green monkey kidney fibroblast cells (COS cells)] or floor-plate cells from E13 rat embryos as described previously (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999). Explants were cultured in neurobasal medium supplemented with B27 for 48 h. At the end of this period, explants were fixed in ice-cold 4% PFA and immunostained with a neuron-specific anti-class III β -tubulin monoclonal antibody (TuJ-1; Covance, Berkeley, CA) for visualization of the axons.

Dil tracing. The olfactory bulb of E16 to E18 embryos was injected with the lipophilic tracer 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI; Invitrogen) as described previously (de Castro et al., 1999).

Results

Robo1 and Robo2 are expressed in the lateral olfactory tract

To determine whether LOT axons expressed Robo receptors, we first performed an immunohistochemical study. At E13, LOT axons were strongly immunoreactive for Robo2, consistent with our previous *in situ* hybridization data (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999; Marillat et al., 2002) (Fig. 1A). Interestingly, E13 LOT ax-

ons were also immunoreactive for Robo1 (Fig. 1B). Neither Robo1 nor Robo2 were expressed on so-called lot cells (see below). Double immunolabeling revealed that Robo1 is expressed by a subset of Robo2-positive LOT axons (Fig. 1C). This expression pattern was unchanged until E15 (data not shown). From E16, we were unable to detect Robo1 protein on LOT axons (Fig. 1D), visualized with an anti-L1 antibody (Fig. 1E,F,H,I) (Inaki et al., 2004), whereas Robo2 was still highly expressed (Fig. 1G). In *Robo1*-deficient mice, a cassette encoding β -galactosidase (β -gal) and PLAP was inserted in the *Robo1* locus (Long et al., 2004). Similarly, β -galactosidase-fused with tau was inserted into the *Robo2* locus (Grieshammer et al., 2004). At E16, neither β -galactosidase, nor PLAP could be detected in the LOT of *Robo1^{+/-}* mice, whereas β -gal was expressed in the LOT of *Robo2^{+/-}* mice (data not shown). In contrast, β -gal was not expressed by lot cells. *Robo3/Rig1* (retinoblastoma inhibiting gene 1) expression was never detected on LOT axons (data not shown). Overall, these results show that early developing LOT axons coexpress Robo2 and Robo1, whereas only Robo2 is expressed on older LOT axons.

LRR2-hSlit bind to LOT axons

A previous structure–function analysis of the LRR domains of *Drosophila* Slit (Howitt et al., 2004) revealed that the active site of Slit is located on the second of the four LRR (LRR2), which is highly conserved between Slits (Howitt et al., 2004). To attempt to visualize Slit binding sites in the developing mouse brain we generated two fusion proteins consisting of LRR2-hSlit1 or LRR2-hSlit2 (see Materials and Methods) fused to AP and performed binding studies. We found that at E13–E18, both LRR2-hSlit1-AP and LRR2-hSlit2-AP strongly bound to LOT axons (Fig. 2A–C,E). To determine if Slit-AP constructs selectively bound to Robo receptors, we next performed binding on OB and forebrain sections from E13 and E18 *Robo1* and *Robo2* single and double mutants (see Materials and Methods). We used LRR2-hSlit2-AP, because it is more highly expressed by transfected cells than LRR2-hSlit1-AP. At E13, LRR2-hSlit2-AP binding to LOT axons was observed in *Robo1* and *Robo2* single mutants, but not in *Robo1;Robo2* double mutants (Fig. 2D) (data not shown). At E18, LRR2-hSlit2-AP binding was still intense in wild-type and *Robo1^{-/-}* LOT axons (Fig. 2E,F), but was absent in *Robo2^{-/-}* or *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* LOT axons (Fig. 2G) (data not shown). At no time did LRR2-hSlit2-AP bind to LOT cells. These results confirm the immunocytochemical data, and also show that Robo1 and Robo2 are most likely the only major Slit receptors on LOT axons (see Discussion).

Slits do not repel OB axons from *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* mutant mice

We next examined whether OB axons from mice deficient for both *Robo1* and *Robo2* could still respond to Slit chemorepulsive

activity. We used E14 OB explants from wild-type, *Robo1*^{+/-};*Robo2*^{+/-}, or *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mutant mice, and cultured them for 24–36 h in collagen gels adjacent to explants of spinal cord floor plate, which is a source of Slit proteins (Hu and Rutishauser, 1996; Hu, 1999) or adjacent to COS cell aggregates expressing Slit2. OB axons were visualized after immunostaining with anti-class III β -tubulin monoclonal antibody TuJ-1, a pan-neuronal marker. As described previously (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999), very robust repulsion was observed, with OB axons growing away from the Slit2-secreting COS cells [with a proximal/distal ratio (see Materials and Methods) of 0.196 ± 0.08 (SEM), from six explants] (Fig. 3E) or floor plate explants (0.229 ± 0.09 , from eight explants) (Fig. 3B). The behavior of OB axons from *Robo1*^{+/-};*Robo2*^{+/-} mice was similar to that of controls, whether the chemorepulsive activity was from floor plate (0.245 ± 0.12 , from four explants) (Fig. 3G) or from Slit2-secreting COS cells (0.313 ± 0.16 , from four explants) (Fig. 3H). In contrast, the repulsion was virtually abolished with OB explants from *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mice adjacent to floor-plate explants (0.993 ± 0.31 , 10 explants from three distinct double mutants) or Slit2-secreting aggregates (1.12 ± 0.1 , nine explants from three distinct double mutants) (Fig. 3C,F). Together, these results indicate that the repulsive responses of OB axons to Slit proteins *in vitro* requires Robo1 and Robo2 receptors.

LOT axon defects in *Slit1;Slit2* and *Robo1;Robo2* mutant mice

We observed previously that the LOT is very disorganized in *Slit1;Slit2* double-mutant mice, consistent with a role in mediating septal repulsion *in vivo* (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002). To confirm the involvement of Robo receptors in LOT guidance *in vivo*, we next analyzed LOT development in *Robo1* and *Robo2* single- and double-mutant mice. Dil injections in the olfactory bulb of E15 to E18 embryos in wild-type mice ($n = 5$) (Fig. 4A) always lead to the anterograde tracing of a single axon tract that runs rostrocaudally just under the pial surface, which corresponds to the LOT. We observed the same phenotype using different LOT markers, such as the anti-L1 antibody, which has been shown to label all LOT axons and an antibody against neuropilin-1, which is expressed by all LOT axons, except the deepest ones (Inaki et al., 2004). Both antibodies reveal a thick LOT axon bundle in the lateral telencephalon of wild-type animals (Fig. 5A–C). In *Robo1*^{-/-} mutant mice (seven of seven cases) or *Robo1*^{+/-};*Robo2*^{+/-} mutant mice (nine of nine cases), the LOT ran normally as a thick axon bundle similar to wild-type (Figs. 4B,C, 5D–F). Nevertheless, in most *Robo1*^{-/-} mice, the LOT was slightly enlarged (six of seven cases). In contrast, in *Robo2*^{-/-} mice (two of two cases), the LOT was thinner and spread along the ventrolateral surface of the telencephalon (Figs. 4D, 5G–I), although they still respect their normal dorsal bound-

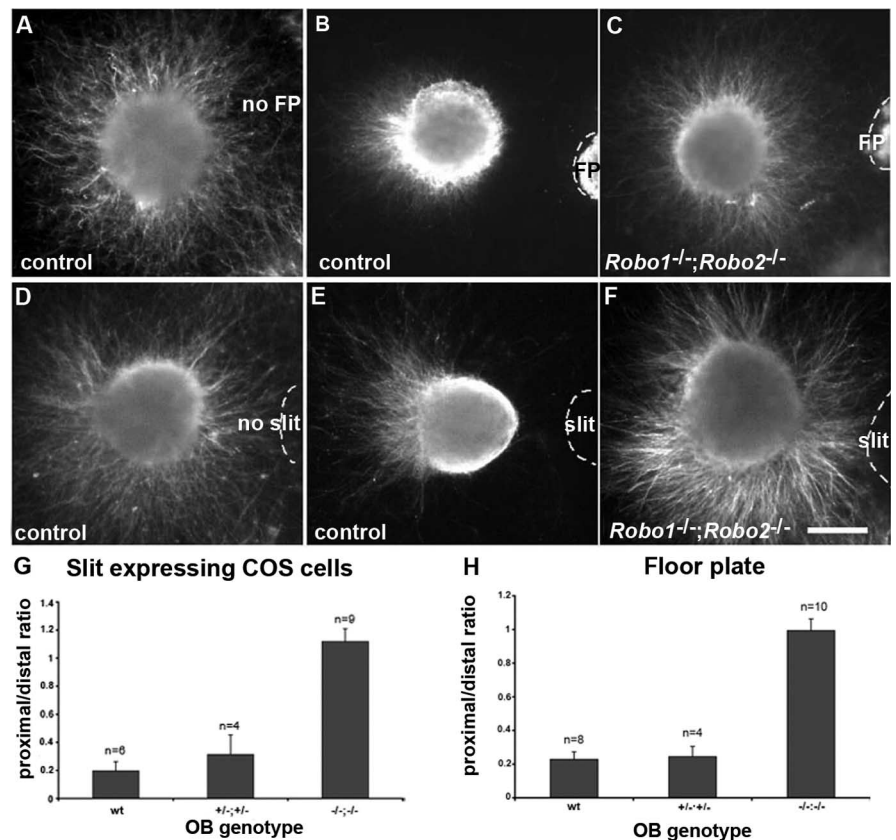


Figure 3. Olfactory axons from *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mutant are not repelled by *Slit2*-expressing cells. **A–C**, Olfactory bulb explants from wild-type (**A**, **B**) or *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} E14 mice were cultured with floor plate (FP) explants (**B**, **C**) from E13 rat embryos. Wild-type OB axons grow radially in absence of FP (**A**) but are strongly repelled by FP (**B**). In contrast, axons from *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} OB are not repelled by FP (**C**). **D–F**, Wild-type OB axons grow radially in front of control COS cells but are repelled by *Slit2*-expressing COS cells (**D**, **E**). **F**, In contrast, *Robo1*;*Robo2*-deficient axons are not repelled by *Slit2*-expressing cells. **G**, **H**, Quantification of the repulsion assay. Scale bar: (in **F**) **A–F**, 150 μ m. Error bars indicate SEM.

ary. These defects were even more striking in *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mice (seven of seven cases) at E15.5 (data not shown) as well as at E18: the LOT was very defasciculated into small axonal bundles fanned all over the ventral side of the telencephalon (Fig. 4E,F). On coronal forebrain sections from *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mice, L1-positive axons as well as NP1-positive axons were divided into multiple small bundles scattered from the initial LOT lateral position to the ventral midline (Fig. 5J,K). This phenotype was the same as described previously in *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} mice (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002). Interestingly, in *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mice, a subset of LOT axons, originating from the lateral OB, were still present at their normal position (Fig. 5J–L). This heterogeneous behavior of medial/lateral LOT axons was even more striking in *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} mice injected with Dil in the OB or that expressed β -galactosidase in LOT axons (see Materials and Methods) (Figs. 6, 7A–D) ($n = 2$). Again, medial OB axons were more severely affected than lateral ones. This also confirmed that LOT axons were specifically misrouted ventrally, but still respect their dorsal boundary. Together, these results show that the pathfinding of the LOT axons, in particular those originating from the medial OB, is profoundly disrupted in *Robo2*^{-/-} and *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mutant mice.

Lot cell pattern is not perturbed in *Slit*- or *Robo*-deficient mice

It has been shown previously that LOT axons may be guided through short-range interaction with so-called “lot cells,” which

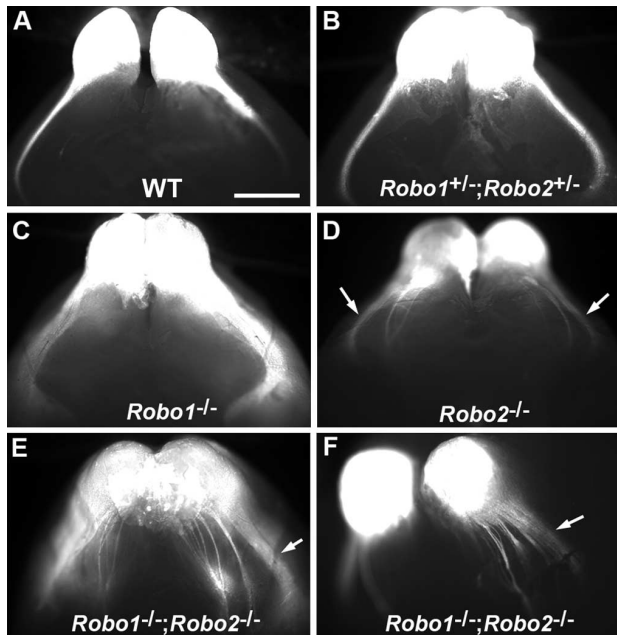


Figure 4. Ventrolateral views of whole-mount brains from *Robo*-deficient mice at E18 showing the localization of the LOT. **A, B**, Embryos were injected in the OB with Dil. The LOT extends caudally and laterally along the pial surface of the telencephalon, forming a single axon bundle in wild-type brain (**A**) but also *Robo1*^{+/-};*Robo2*^{+/-} mice (**B**). **C, D**, In *Robo1*^{-/-} mutants, the LOT spreads slightly at the surface (**C**), and in *Robo2*^{-/-} mice (**D**), little LOT ectopic fascicles are observed ventrally. **E, F**, In *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mice, OB axons are highly defasciculated along on the ventral side of the brain. Note that in *Robo2*^{-/-} (**D**) and *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mice (**E, F**), a subset of OB axons are still at their correct position (arrows). Scale bar: (in **A–F**) 575 μ m.

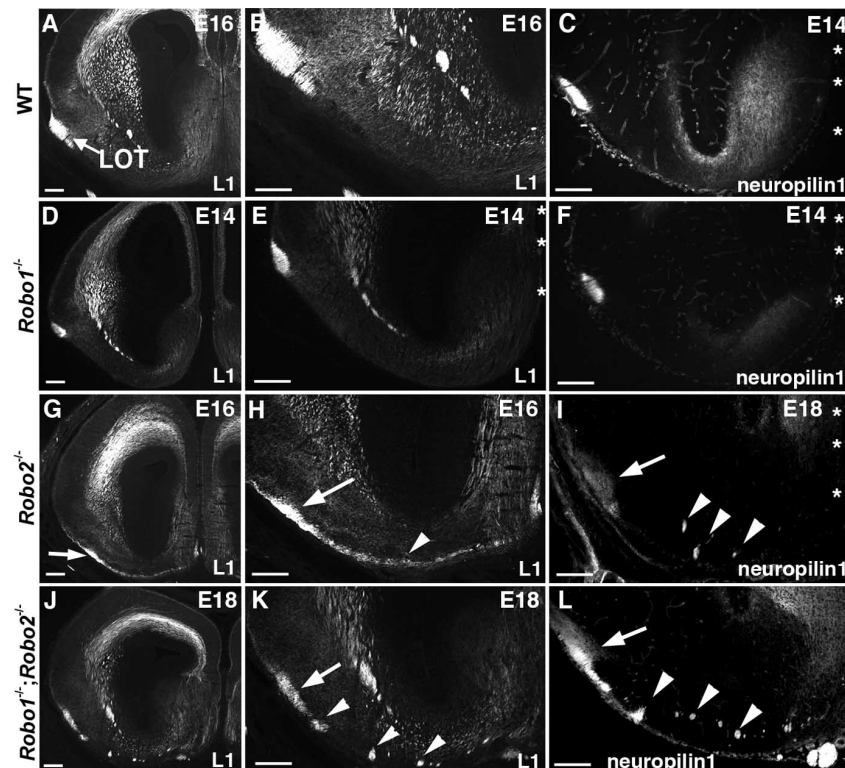


Figure 5. L1 and Neuropilin1 expression in *Robo1* and *Robo2* single and double mutants. **A–L**, Forebrain coronal sections were immunolabeled with anti-L1 (**A, B, D, E, G, H, J, K**) and anti-neuropilin-1 (**C, F, I, L**). **A–F**, In E16 (**A, B**) and E14 (**C**) wild-type (WT) or *Robo1*^{-/-} mice (**D–F**), the LOT is positioned laterally at a distance from the midline (asterisks in **C, E, F, I**). **G–I**, In contrast, in *Robo2*^{-/-} mutants, the LOT is thinner at E16 (**G, H**) and divided into multiple bundles (arrowheads) at E18 (**I**). **J–L**, In E18 coronal sections in *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mice, the LOT is totally disrupted (arrowheads) and spreads all over the ventral forebrain. Nevertheless, there is still a subset of OB axons at their correct position (arrows). Scale bars: **A, D, G, J**, 150 μ m; **B, C, E, F, H, I, K, L**, 225 μ m.

may act as guidepost cells (Hirata et al., 2001). Lot cells can be visualized with the monoclonal antibody mAb lot1 and migrate ventrally from the dorsal telencephalic vesicle to their final position (Sato et al., 1998; Tomioka et al., 2000). To determine whether the observed LOT defects observed in *Slit* and *Robo* mutants results from an abnormal development of lot cells, we studied lot1 expression in *Slit1*;*Slit2*-, *Robo1*-, *Robo2*-, and *Robo1*;*Robo2*-deficient mice. Lot cells confined to the vicinity of the LOT are the most numerous between E14.5 and E16.5 (Sato et al., 1998). At these ages, LOT axons could be detected by anti-neuropilin-1 immunohistochemistry (Sugisaki et al., 1996) (Fig. 7G). In *Slit1*^{+/-}, as in wild-type mice, lot1-expressing cells were observed surrounding and/or enriched around neuropilin-1-labeled LOT axons ($n = 2$) (Fig. 8A–C). The same distribution of lot cells was observed in *Slit1*^{+/-};*Slit2*^{+/-} mice ($n = 2$) (Fig. 8D–F). In *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{+/-} mice, although the LOT was obviously thinner (Fig. 8G) ($n = 2$) and started to divide into bundles (data not shown), the distribution of lot cells was not modified (Fig. 8H). Last, in *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} mice where the LOT was totally disrupted, with few axons still present at their normal position, lot cells were still concentrated at their proper location ($n = 5$) and were not widespread in the cortex (Figs. 7E–H, 8J–L). However, the density of lot1-positive cells was slightly decreased rostrally, near the ventral part of the OB, where many misrouted LOT axons are found ($n = 5/5$) (Fig. 7E–H). In E16 *Robo1*^{-/-} mice (Fig. 9D–F) ($n = 1$), the same pattern was observed as in wild-type mice (Fig. 9A–C). In *Robo2*^{-/-} mice, the distribution of lot cells appeared unchanged although the LOT was slightly perturbed, (Fig. 9G,H) ($n = 5$). In *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mutant mice ($n = 2$), which exhibit the most striking defects, lot cells were not seen surrounding LOT axons displaced ventromedially, but were still concentrated at their normal lateral position (Fig. 9J–L). Thus, lot cells appear to migrate normally in *Slit* and *Robo* mutants, and the action of *Slit* and *Robo* on LOT axon pathfinding is likely to be direct.

Discussion

The first diffusible chemorepulsive activity in the vertebrate brain was identified in the rat septum and proposed to guide mitral cell axons (Pini, 1993). Later, we and others showed that this septum-derived repellent activity was caused by a combination of *Slit1* and *Slit2* that are both highly expressed in the septum from the beginning of LOT development (Li et al., 1999; Nguyen Ba-Charvet et al., 1999, 2002). Nevertheless, some *in vitro* data using Robo-Fc proteins raised doubt on the role Robo receptors in the guidance of LOT axons (Patel et al., 2001) and direct evidence using Robo-function-blocking reagents was still lacking. Our current results show that Robo1 and Robo2 are the major receptors, present on LOT axons that mediate *Slit* chemorepulsive activity *in vitro* and also *in vivo*. This represents the first direct evidence in vertebrates for a role for Robo receptors in *slit*-mediated axonal repulsion. This also confirms that

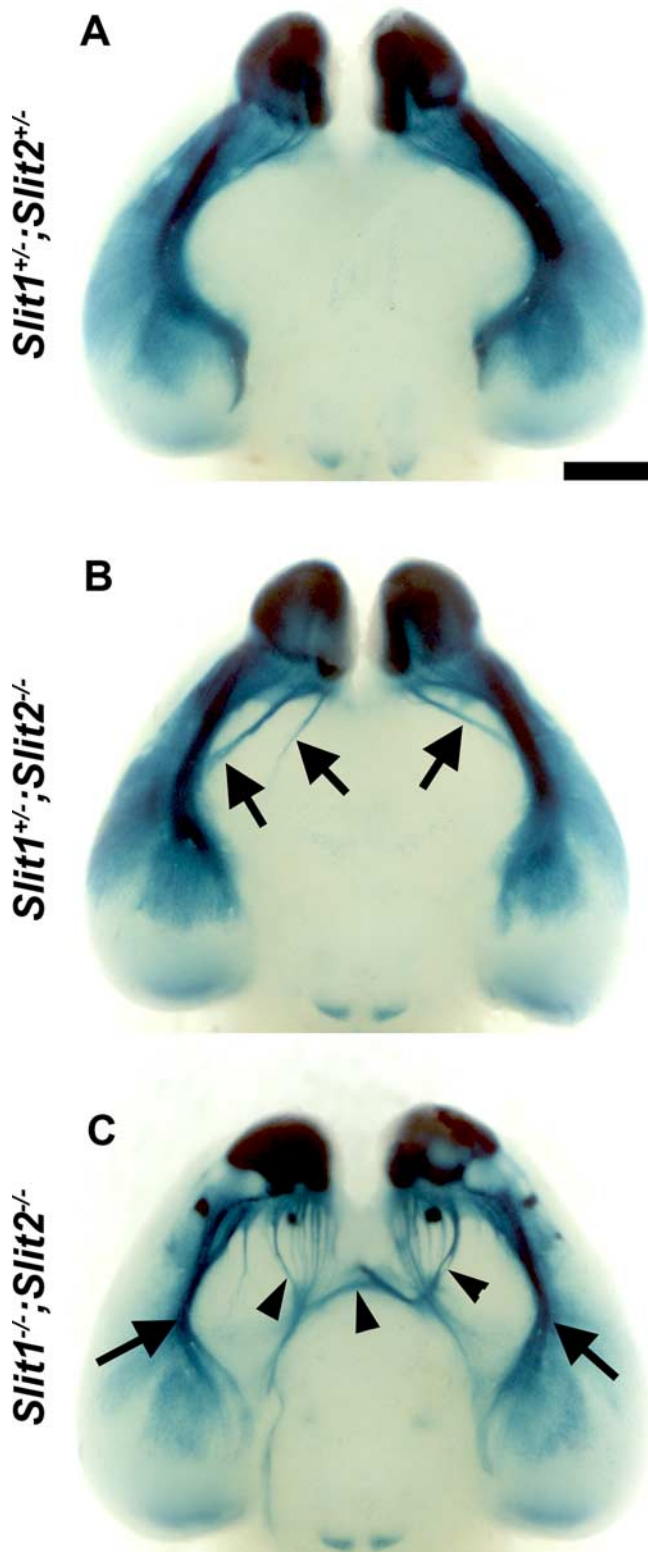


Figure 6. Ventral views from whole-mount X-Gal staining of *Slit1;Slit2* mutant brains at E18.5. *Slit1;Slit2* mice were mated with a gene-trap mouse in which β -galactosidase is expressed by most of the main OB axons. **A**, The LOT extends caudally and laterally along the pial surface of the telencephalon, forming a single axon bundle in the *Slit1*^{+/+};*Slit2*^{+/+} brain. **B**, In *Slit1*^{+/+};*Slit2*^{-/-} mutants, some small bundles escape from the main LOT trajectory to extend ventrally (arrows). **C**, In *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} mutants, stray axons from the medial OB are marked and seem to cross the ventral midline (arrowheads). There still is an axon bundle along the normal LOT trajectory (arrows). Scale bar, 1 mm.

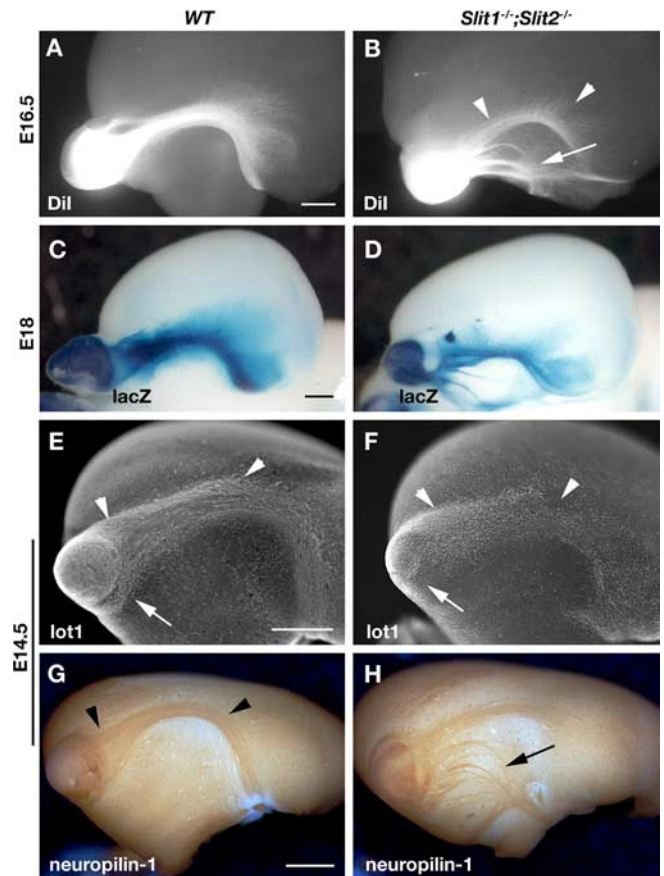


Figure 7. Lot cells and LOT axons in *Slit*-deficient mice. **A–H**, *In toto* labeling of the telencephalon of wild-type (WT) (**A, C, E, G**) or *Slit1/Slit2* double mutants (**B, D, F, H**). **A, B**, Dil labeling at E16.5. Although in WT (**A**) LOT axons are tightly fasciculated, many medial OB axons invade the ventral telencephalon in *Slit* mutants (**B**, arrow). However, axons from the lateral OB have a normal lateral distribution (**B**, arrowheads). **C, D**, lateral views from whole-mount X-Gal staining of *Slit1;Slit2* mutant brains at E18.5 (see Materials and Methods). The dorsal extent of LOT axons is similar in WT (**C**) and *Slit* mutants (**D**). **E, F**, Lot-1 immunostaining reveals that the dorsoventral distribution of lot cells (arrowheads) is largely normal in E14.5 *Slit* mutants. However, the density of lot-1-expressing cells is slightly reduced rostrally, near the exit point of medial OB axons (**F**, arrow). **G, H**, LOT axon pathfinding defects at E14.5, visualized with anti-neuropilin-1 antibodies. In *Slit* mutants, LOT axons invade the ventral telencephalon (arrow) and do not stay lateral as in the WT brain (**G**, arrowheads). Scale bars, 500 μ m.

Robo receptors play a major role in guiding forebrain axons in vertebrates (Miyasaka et al., 2005; Andrews et al., 2006).

Other studies proposed that the septum repellent and Slit proteins are not essential to guiding LOT axons, but only function in parallel with lot cells. Thus, the removal of the septum or the addition of a Robo1 ectodomain in whole-telencephalon organotypic cultures did not affect the projection of mitral cell axons (Hirata et al., 2001). Our results demonstrate that the distribution of lot1-expressing cells is not significantly perturbed in *Slit1*^{-/-}, *Slit2*^{-/-}, *Slit1;Slit2*^{-/-}, or *Robo1*^{-/-}, *Robo2*^{-/-} and *Robo1;Robo2*-deficient mice. Importantly, misrouted LOT axons do not appear surrounded or in contact with lot1-positive cells. This suggests that long-range guidance by Slit molecules and their receptors Robos is preponderant over short-range cues for guiding LOT axons. However, we cannot entirely rule out the possibility that lot cells contribute to the guidance of some LOT axons. First, in *Slit1;Slit2* double-deficient mice, the number of lot-1 expressing cells is slightly reduced near the exit point of medial OB axons, suggesting that this subtle disruption of the distribution of lot cells might play a part in the ectopic projection of OB axons.

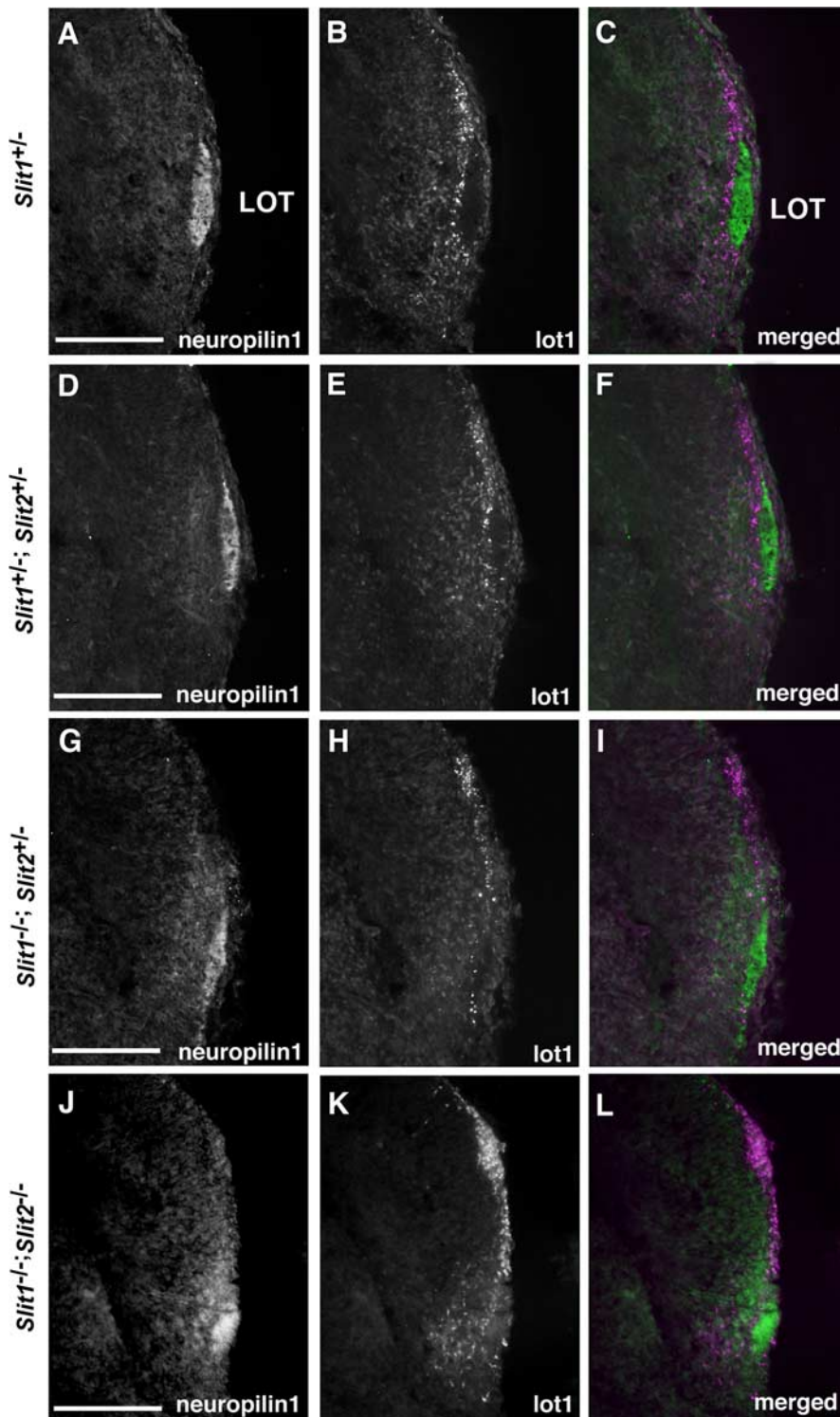


Figure 8. Lot cells in *Slit*-deficient mice. Coronal sections of E14.5 telencephalon were stained with anti-neuropilin1 (green) and mAb Lot1 (magenta) labeling the LOT and the lot cells, respectively. **A–F**, Lot cells surround the LOT in *Slit1*^{+/+} (**A–C**) and *Slit1*^{+/+};*Slit2*^{+/+} mice (**D–F**). **G–I**, In contrast, in *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{+/+} mice, the LOT is flattened along the surface, but the lot cells pattern is unchanged. **J–L**, The lot-cell pattern is similar in *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} mice, although neuropilin1-positive LOT axons are completely defasciculated. Scale bars, 0.2 mm.

Second, it has been shown previously that in deleted in colorectal cancer (DCC) mutant embryos, the perturbation of lot cell migration leads to defects of LOT axons pathfinding (Kawasaki et al., 2006). It is unlikely in this system that a direct effect of the DCC on the guidance of olfactory axons contributes to the mis-

guidance, as netrin-1 does not exert any effect on OB axons *in vitro* (de Castro et al., 1999; Li et al., 1999). Third, we show here that a subset of LOT axons originating from the lateral OB still project along the normal LOT pathway along lot cells, and that medial axons are more affected. Non-cell-autonomous factors such as lot cells might be involved in this differential behavior of the lateral and medial OB axons. Together, these results suggest that the LOT contains different type of OB axons that may be guided by distinct molecules.

In addition to Slits and their Robo receptors, developing LOT axons have been proposed to be influenced by other long-range cues of the Semaphorin family. Mitral cell axons express both neuropilin-1 and neuropilin-2. In organotypic cultures, the olfactory epithelium secretes a repellent cue for OB axons (de Castro et al., 1999). This repulsive effect can be mimicked by cells secreting Sema3F, a secreted semaphorin expressed in the olfactory epithelium at the time of LOT development. Furthermore, Sema3B secreted by aggregates of COS cells is able to attract OB axons. Nevertheless, the analysis of the mice deficient for the class 3 semaphorin receptors neuropilin-1 (Kitsukawa et al., 1997) or neuropilin-2 (Chen et al., 2000) showed a totally normal LOT, which does not support a critical role for these semaphorins in LOT axon guidance *in vivo*. Last, in Robo- and Slit-deficient mice, the preferential growth of misrouted LOT axons toward the septum may be in part caused by the presence of still unidentified attractants released by the ventral telencephalon, whose activity could be unmasked in absence of slit/robo-mediated repulsion.

We and others have shown previously that the N-terminal leucine-rich regions in Slit are sufficient to repel OB axons (Chen et al., 2001; Nguyen Ba-Charvet et al., 2001). More recently, in *Drosophila*, it has been found that the second leucine-rich domain of Slit is necessary to trigger Robo signaling. We show that in mice, LRR2 is actually sufficient for binding to LOT axons and requires Robo1 and Robo2; it is also sufficient for binding to other Robo expressing forebrain axons (Lopez-Bendito et al., 2007). The finding that LRR2-hSlit1-AP or LRR2-hSlit2-AP binding on forebrain sections is apparently abolished in *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-}

mice strongly suggests that Robo1 and Robo2 are the only receptors for Slit1 and Slit2 on these axons. Previous studies have shown that other extracellular proteins such as the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan glypican-1 also bind Slits (Liang et al., 1999; Ronca et al.,

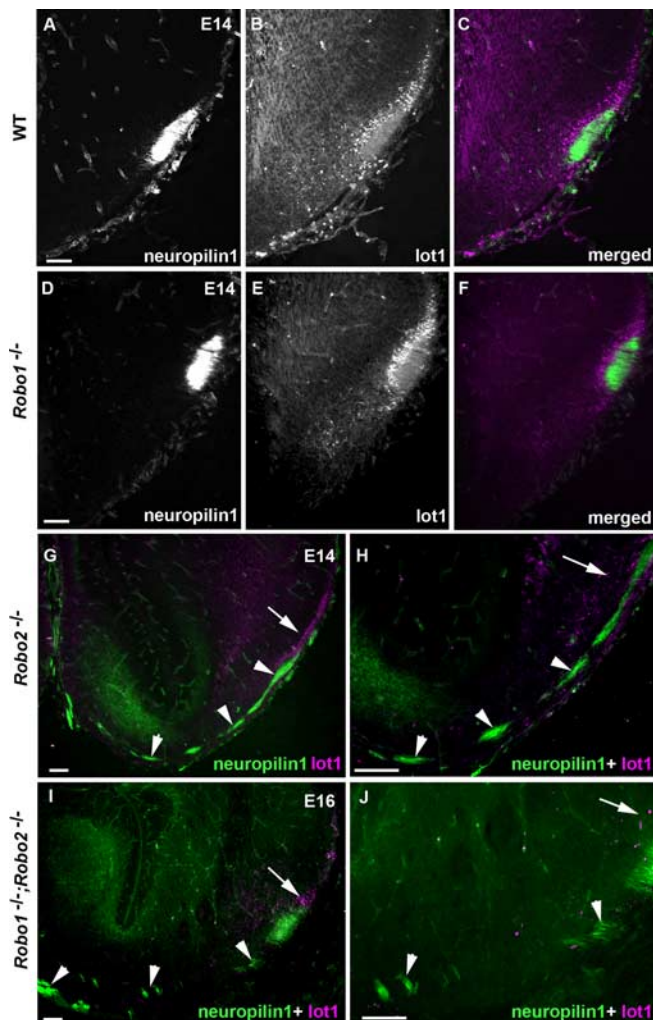


Figure 9. Lot cells in *Robo*-deficient mice. **A–J**, Coronal sections of E14 (**A–H**) or E16 (**I, J**) telencephalon were stained with anti-neuropilin1 (green) and mAb Lot1 (magenta). **A–F**, Lot cells surround the LOT in wild-type (**A–C**) and *Robo1*^{-/-} mice (**D–F**). **G–J**, In contrast, in *Robo2*^{-/-} (**G, H**) and *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mutant mice (**I, J**), the LOT is flattened along the pial surface and highly defasciculated (arrowheads) whereas the lot cell position (arrow) is similar to wild-type. Ectopic ventral LOT axonal bundles (**H, J**, arrowheads) do not contact lot1-expressing cells (arrow). Scale bars: **A, D**, 60 μ m; **G, I**, 80 μ m; **H, J**, 95 μ m.

2001). However, glypican-1 binds to the C-terminal fragment of Slit, which is dispensable for its chemorepulsive activity (Brose et al., 1999). Cell-surface heparan sulfate is also involved *in vitro*, in the repulsive activity of Slit on the postnatal migrating subventricular zone (Hu, 2001). Our results suggest that, *in vivo*, Slit directly binds to Robo receptors on embryonic forebrain axons, but do not exclude that heparan sulfate proteoglycans could still play a role in modulating Slit/Robo signaling in postnatal or adult forebrain neurons.

It has been shown previously that, as in *Drosophila*, there may be a Robo code for lateral positioning of commissural axons in mice (Long et al., 2004). Robo1-expressing commissural axons are concentrated both in the ventral and lateral funiculi, whereas Robo2-expressing axons are mainly in the lateral funiculus. LOT axons are also organized according to a mediolateral pattern: early born mature mitral cells project their axons into the middle lamina of the LOT, whereas late-born immature mitral cells send their axons into the superficial lamina (Inaki et al., 2004). We observed that Robo1 is only expressed in the LOT until E15,

whereas Robo2 is expressed in present in the all LOT axons, all along the development. Moreover, Robo1 is more highly expressed in a superficial subpopulation of Robo2-positive LOT axons (Fig. 1C). This suggests that Robo1 and Robo2 are part of a complex molecular system required to build the laminar organization of the LOT.

In conclusion, the detailed molecular mechanism of LOT formation is very complex and still needs to be thoroughly analyzed. For example, the factors controlling the growth of LOT axons along the rostrocaudal axis still have to be identified. This behavior is not affected in *Slit1*;*Slit2*-deficient mice, nor in *Robo1*;*Robo2*-deficient mice. At later ages, LOT axons send collateral branches to the olfactory cortex (Hirata and Fujisawa, 1999). These collateral branches are the only connections of mitral and tufted cell axons with the olfactory cortex. So far, only Anosmin-1, a secreted protein, defective in the X chromosome-linked form of Kallmann syndrome has been shown to promote the branching of OB axons (Soussi-Yanicostas et al., 2002). However, Slit proteins are also possible candidates because Slit2 regulates the branching of sensory axons from the dorsal root ganglia (Wang et al., 1999) and Slit1 the branching of pyramidal cell dendrites in the neocortex (Whitford et al., 2002). Unfortunately the possible branching activity of Slits on OB axons is difficult to assess in the *Slit1*;*Slit2*- or *Robo1*;*Robo2*-deficient mice, because the growth of LOT axons is very disturbed and these double mutants die at birth. Our results also indicate that some guidance cues act on all LOT axons, but a previous study (Zou et al., 2001) has clearly shown that the projection from the OB to the olfactory cortex is topographically organized and that mitral cells innervated by olfactory receptor neurons from distinct zones of the olfactory epithelium (expressing distinct olfactory receptors) project to distinct regions in the olfactory cortex. The factors that regulate the formation of this complex projection map remain unknown.

References

- Andrews W, Liapi A, Plachez C, Camurri L, Zhang J, Mori S, Murakami F, Parnavelas JG, Sundaresan V, Richards LJ (2006) Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. *Development* 133:2243–2252.
- Bedell VM, Yeo SY, Park KW, Chung J, Seth P, Shivalingappa V, Zhao J, Obara T, Sukhatme VP, Drummond IA, Li DY, Ramchandran R (2005) Roundabout 4 is essential for angiogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6373–6378.
- 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.
- Chen H, Bagri A, Zupicich JA, Zou Y, Stoeckli E, Pleasure SJ, Lowenstein DH, Skarnes WC, Chedotal A, Tessier-Lavigne M (2000) Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25:43–56.
- Chen JH, Wen L, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (2001) The N-terminal leucine-rich regions in slit are sufficient to repel olfactory bulb axons and subventricular zone neurons. *J Neurosci* 21:1548–1556.
- de Castro F, Hu L, Drabkin H, Sotelo C, Chédotal A (1999) Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *J Neurosci* 19:4428–4436.
- Flanagan JG, Leder P (1990) The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell* 63:185–194.
- Grieshammer U, Ma L, Plump AS, Wang F, Tessier-Lavigne M, Martin GR (2004) SLIT2-Mediated Robo2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 6:709–717.
- Hao JC, Yu TW, Fujisawa K, Culotti JG, Gengyo-Ando K, Mitani S, Moulder G, Barstead R, Tessier-Lavigne M, Bargmann CI (2001) *C. elegans* Slit acts in midline, dorsal–ventral, and anterior–posterior guidance via the SAX-3/Robo receptor. *Neuron* 32:25–38.

- Hirata T, Fujisawa H (1997) Cortex-specific distribution of membrane-bound factors that promote neurite outgrowth of mitral cells in culture. *J Neurobiol* 32:415–425.
- Hirata T, Fujisawa H (1999) Environmental control of collateral branching and target invasion of mitral cell axons during development. *J Neurobiol* 38:93–104.
- Hirata T, Fujisawa H, Wu JY, Rao Y (2001) Short-range guidance of olfactory bulb axons is independent of repulsive factor slit. *J Neurosci* 21:2373–2379.
- Howitt JA, Clout NJ, Hohenester E (2004) Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit. *EMBO J* 23:4406–4412.
- Hu H (1999) Chemorepulsion of neuronal migration by slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 23:703–711.
- Hu H (2001) Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nature Neurosci* 4:695–701.
- Hu H, Rutishauser U (1996) A septum-derived chemorepulsive factor for migrating olfactory interneuron precursors. *Neuron* 16:933–940.
- Huminiecki L, Gorn M, Suchting S, Poulsom R, Bicknell R (2002) Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* 79:547–552.
- Inaki K, Nishimura S, Nakashiba T, Itoharu S, Yoshihara Y (2004) Laminar organization of the developing lateral olfactory tract revealed by differential expression of cell recognition molecules. *J Comp Neurol* 479:243–256.
- Jen JC, Chan WM, Bosley TM, Wan J, Carr JR, Rub U, Shattuck D, Salamon G, Kudo LC, Ou J, Lin DD, Salih MA, Kansu T, Al Dhalaan H, Al Zayed Z, MacDonald DB, Stigsby B, Plaitakis A, Dretakis EK, Gottlob I, et al. (2004) Mutations in a human Robo gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science* 304:1509–1513.
- Kawasaki T, Ito K, Hirata T (2006) Netrin 1 regulates ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *Development* 133:845–853.
- Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92:205–215.
- Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T, Fujisawa H (1997) Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19:995–1005.
- Kolodkin AL, Leventgood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD (1997) Neuropilin is a Semaphorin III receptor. *Cell* 90:753–762.
- Li HS, Chen JH, Wu W, Fagaly T, Zhou L, Yuan W, Dupuis S, Jiang ZH, Nash W, Gick C, Ornitz DM, Wu JY, Rao Y (1999) Vertebrate Slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* 96:807–818.
- Liang Y, Annan RS, Carr SA, Popp S, Mevissen M, Margolis RK, Margolis RU (1999) Mammalian homologues of the *Drosophila* slit protein are ligands of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in brain. *J Biol Chem* 274:17885–17892.
- Long H, Sabatier C, Le M, Plump A, Yuan W, Ornitz DM, Tamada A, Murakami F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M (2004) Conserved roles for slit and robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42:213–223.
- López-Bendito G, Flames N, Ma L, Fouquet C, DiMeglio T, Chédotal A, Tessier-Lavigne M, Marin O (2007) Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain. *J Neurosci*, in press.
- Marillat V, Cases O, Nguyen-Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chédotal A (2002) Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* 442:130–155.
- Miyasaka N, Sato Y, Yeo SY, Hutson LD, Chien CB, Okamoto H, Yoshihara Y (2005) Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development* 132:1283–1293.
- Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Marillat V, Kidd T, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chédotal A (1999) Slit2-mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22:463–473.
- Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Ma L, Wang KH, Marillat V, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chédotal A (2001) Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *J Neurosci* 21:4281–4289.
- Nguyen-Ba-Charvet KT, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Chédotal A (2002) Slit1 and Slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* 22:5473–5480.
- Patel K, Nash JAB, Itoh A, Liu Z, Sundaresan V, Pini A (2001) Slit proteins are not dominant chemorepellents for olfactory tract and spinal motor axons. *Development* 128:5031–5037.
- Pini A (1993) Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system. *Science* 261:34–98.
- Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, Mason C, Tessier-Lavigne M (2002) Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33:219–232.
- Rajagopalan S, Vivancos V, Nicolas E, Dickson BJ (2000a) Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* 103:1033–1045.
- Rajagopalan S, Nicolas E, Vivancos V, Berger J, Dickson BJ (2000b) Crossing the midline: roles and regulation of robo receptors. *Neuron* 28:767–777.
- Ronca F, Andersen JS, Paech V, Margolis RU (2001) Characterization of Slit protein interactions with glypican-1. *J Biol Chem* 276:29141–29147.
- 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.
- Saga Y, Yagi T, Ikawa Y, Sakakura T, Aizawa S (1992) Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 6:1821–1831.
- Sato Y, Hirata T, Ogawa M, Fujisawa H (1998) Requirement for early-generated neurons recognized by monoclonal antibody Lot1 in the formation of lateral olfactory tract. *J Neurosci* 18:7800–7810.
- Schwob JE, Price JL (1984) The development of axonal connections in the central olfactory system of rats. *J Comp Neurol* 223:177–202.
- Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10:409–426.
- Shibley MT, Ennis M (1996) Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 30:123–176.
- Simpson JH, Bland KS, Fetter RD, Goodman CS (2000a) Short-range and long-range guidance by slit and its robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* 103:1019–1032.
- Simpson JH, Kidd T, Bland KS, Goodman CS (2000b) Short-range and long-range guidance by slit and its robo receptors: Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28:753–766.
- Soussi-Yanicostas N, de Castro F, Julliard K, Perfettini I, Chédotal A, Petit C (2002) Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell* 109:217–228.
- Suchting S, Heal P, Tahtis K, Stewart LM, Bicknell R (2005) Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration. *Faseb J* 19:121–123.
- Sugisaki N, Hirata T, Naruse I, Kawakami A, Kitsukawa T, Fujisawa H (1996) Positional cues that are strictly localized in the telencephalon induce preferential growth of mitral cell axons. *J Neurobiol* 29:127–137.
- Tomioka N, Osumi N, Sato Y, Inoue T, Nakamura S, Fujisawa H, Hirata T (2000) Neocortical origin and tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *J Neurosci* 20:5802–5812.
- Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman C, Henzel W, Tessier-Lavigne M (1999) Biochemical purification of a mammalian Slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96:771–784.
- Whitford KL, Marillat V, Stein E, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Chédotal A, Ghosh A (2002) Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron* 33:47–61.
- Yuan SS, Cox LA, Dasika GK, Lee EY (1999) Cloning and functional studies of a novel gene aberrantly expressed in RB-deficient embryos. *Dev Biol* 207:62–75.
- Zallen JA, Yi BA, Bargmann CI (1998) The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C. elegans*. *Cell* 92:217–227.
- Zou Z, Horowitz LF, Montmayeur JP, Snapper S, Buck LB (2001) Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature* 414:173–179.

Article 2 : Robo1 et Robo2 coopèrent au guidage des voies de projections axonales du télencéphale

Les fonctions du cortex cérébral reposent sur des connectivités complexes et notamment sur l'organisation de ses afférences et efférences. Les projections cortico-corticales traversent le corps calleux et établissent un lien entre les deux hémisphères cérébraux. Les fibres corticofuges formant la projection cortico-spinale progressent ipsilatéralement vers le mésencéphale, le pont et la moelle épinière. La projection cortico-thalamique relie également le cortex et le thalamus. Les fibres thalamo-corticales constituent par ailleurs les principales afférences corticales. Elles transitent comme les fibres corticofuges à travers la capsule interne. Les molécules Slits sont essentielles lors de la formation de l'ensemble de ces voies de projections, qui sont fortement désorganisées chez les souris *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}* (Bagri et coll., 2002). Cette étude, réalisée en collaboration avec le groupe du Dr O. Marin (Alicante), démontre l'implication *in vivo* des récepteurs Robo1 et Robo2 lors de la mise place des projections corticales et thalamiques sous l'effet des Slits :

- Les messagers codant les récepteurs Robo1 et Robo2 sont fortement exprimés dans le thalamus dorsal et le cortex. Ces récepteurs sont tous deux retrouvés à la surface des fibres thalamo-corticales, corticofuges et cortico-corticales. Celles-ci peuvent lier les constructions LRR2-Slit1 ou LRR2-Slit2.
- Des expériences de co-cultures démontrent que les axones thalamiques sont bien sensibles à l'effet répulsif de Slit2 *in vitro*.
- Hormis quelques défauts mineurs, l'absence de Robo1 ou de Robo2 ne semble pas perturber les trajectoires adoptées par les projections corticales et thalamiques. Chez les souris *robo1^{-/-}*, quelques fibres corticales progressent ectopiquement au niveau du corps calleux. Un léger déplacement ventro-médian des fibres thalamo-corticales et corticofuges est également observé chez les souris *robo2^{-/-}*.
- Chez les souris *robo1^{-/-}* ; *robo2^{-/-}*, un grand nombre d'erreurs de guidage surviennent. Le corps calleux est fortement désorganisé, certaines fibres étant déviées ventralement et formant des faisceaux de Probst. Les axones thalamo-corticaux ne parviennent pas à tourner rostralement vers le télencéphale et envahissent anormalement l'hypothalamus. Après avoir traverser la capsule interne, les fibres corticofuges ne parviennent pas à s'orienter longitudinalement et croisent massivement la ligne médiane en une large commissure ectopique. Ce phénotype est très comparable à celui des souris *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}* précédemment décrit.

- En l'absence de Robo1 et Robo2, ces axones perdent la capacité de fixer les constructions LRR2-Slits.

L'ensemble de ces résultats montre que Robo1 et Robo2 coopèrent au guidage des fibres corticofuges, cortico-corticales et thalamo-corticales. Ces récepteurs sont tous deux essentiels à la réponse de ces axones en croissance à l'activité de Slit1 et Slit2 exprimés dans les régions médianes.

Robo1 and Robo2 Cooperate to Control the Guidance of Major Axonal Tracts in the Mammalian Forebrain

Guillermina López-Bendito,¹ Nuria Flames,¹ Le Ma,² Coralie Fouquet,^{3,4} Thomas Di Meglio,^{3,4} Alain Chedotal,^{3,4} Marc Tessier-Lavigne,^{2,5} and Oscar Marín¹

¹Instituto de Neurociencias de Alicante, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Miguel Hernández, 03550 Sant Joan d'Alacant, Spain, ²Howard Hughes Medical Institute, Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford, California 94305, ³Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche (UMR) 7102, and ⁴Université Pierre et Marie Curie–Paris 6, UMR 7102, 75005 Paris, France, and ⁵Genentech, Inc., South San Francisco, California 84080

The function of the nervous system depends on the precision of axon wiring during development. Previous studies have demonstrated that Slits, a family of secreted chemorepellent proteins, are crucial for the proper development of several major forebrain tracts. Mice deficient in Slit2 or, even more so, in both Slit1 and Slit2 have defects in multiple axonal pathways, including corticofugal, thalamocortical, and callosal connections. In the spinal cord, members of the Robo family of proteins help mediate the function of Slits, but the relative contribution of these receptors to the guidance of forebrain projections remains to be determined. In the present study, we addressed the function of Robo1 and Robo2 in the guidance of forebrain projections by analyzing *Robo1*-, *Robo2*-, and *Robo1;Robo2*-deficient mice. Mice deficient in Robo2 and, more dramatically, in both Robo1 and Robo2, display prominent axon guidance errors in the development of corticofugal, thalamocortical, and corticocortical callosal connections. Our results demonstrate that Robo1 and Robo2 mostly cooperate to mediate the function of Slit proteins in guiding the major forebrain projections.

Key words: axon guidance; cortex; repulsion; Robo; Slit; midline; thalamocortical

Introduction

The development of the major axonal projections in the mammalian forebrain has been extensively studied in the recent years (for review, see López-Bendito and Molnár, 2003; Richards et al., 2004; Price et al., 2006). Among them, the reciprocal connections between the cortex and the thalamus, corticocortical projections linking both cerebral hemispheres through the corpus callosum, and corticofugal projections directed toward the mesencephalon, pons, and spinal cord have received much attention. These connections underlie some of the most essential functions of the mammalian cerebral cortex, such as perception and motor behavior.

Several guidance molecules have been shown to influence the development of these major forebrain connections. For example, Netrin1 is required for the formation of the corpus callosum (Serafini et al., 1996), and it has also been shown to influence the development of corticofugal (Métin et al., 1997; Richards et al., 1997) and thalamocortical projections (Braisted et al., 2000). Similarly, EphA/ephrinA signaling appears to underlie the topographic organization of thalamocortical projections (Dufour et al., 2003; Torii and Levitt, 2005). In addition, Slits have been shown to play a fundamental role in the guidance of all three major forebrain connections (corticocortical, corticofugal, and thalamocortical) in the mammalian forebrain (Bagri et al., 2002).

Slit proteins have been implicated in axon guidance of insects, nematodes, and vertebrates, contributing through different mechanisms to the development of multiple axonal projections. In addition to playing a major role in regulating axon crossing at the midline (Kidd et al., 1999; Long et al., 2004), Slits specify the lateral and dorsoventral positioning of longitudinal axonal pathways (Rajagopalan et al., 2000; Simpson et al., 2000; Bagri et al., 2002; Nguyen Ba-Charvet et al., 2002; Long et al., 2004) and contribute to the formation of commissures by channeling axons into particular regions (Bagri et al., 2002; Hutson and Chien, 2002; Plump et al., 2002; Shu et al., 2003).

As in *Drosophila* (Kidd et al., 1999) and *Caenorhabditis elegans* (Hao et al., 2001), the function of Slit proteins in the vertebrate nervous system is primarily mediated by Robo receptors (Brose et al., 1999; Li et al., 1999; Yuan et al., 1999; Hutson and Chien, 2002; Long et al., 2004; Sabatier et al., 2004). In the mammalian

Received Oct. 24, 2006; revised Feb. 15, 2007; accepted Feb. 19, 2007.

This work was supported by grants from Spanish Government (BFU2005-04773/BMC) and the European Young Investigator (EURYI) program (O.M.) and from Association pour la Recherche sur le Cancer (A.C.). G.L.-B. is a "Ramón y Cajal" Investigator from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. N.F. was supported by a Formación de Profesorado Universitario fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science. O.M. is a European Molecular Biology Organization Young Investigator, a National Alliance for Research in Schizophrenia and Depression Young Investigator, and an EURYI Awardee. We thank M. Pérez for excellence technical assistance, T. Gil and M. Bonete for daily technical support in the laboratory, and Fujio Murakami for Robo1 and Robo2 antibodies. We also thank members from the Marín and Rico laboratories for useful discussions and comments.

Correspondence should be addressed to Dr. Oscar Marín, Instituto de Neurociencias de Alicante, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Miguel Hernández, 03550 Sant Joan d'Alacant, Spain. E-mail: o.marin@umh.es.

L. Ma's present address: Department of Cell and Neurobiology, Zilkha Neurogenetic Institute, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089.

N. Flames' present address: Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Columbia University, New York, NY 10032.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4605-06.2007

Copyright © 2007 Society for Neuroscience 0270-6474/07/273395-13\$15.00/0

spinal cord, Robo1, Robo2, and the Robo family protein Rig1/Robo3 cooperate to mediate the function of Slit proteins in the guidance of commissural axons (Long et al., 2004; Sabatier et al., 2004). In the developing forebrain, the expression pattern of Robo1 and Robo2 strongly suggest their involvement in the guidance of corticocortical, corticothalamic, and corticofugal projections (Marillat et al., 2001; Bagri et al., 2002; Whitford et al., 2002; Sundaresan et al., 2004). Accordingly, a recent study has shown that Robo1 plays a role in the development of some of these pathways, most notably in the formation of corticocortical callosal projections (Andrews et al., 2006).

Here, we investigated the function of Robo1 and Robo2 in the formation of forebrain connections by analyzing mice carrying severe loss-of-function alleles for Robo1, Robo2, or both Robo1 and Robo2 receptors. Our results demonstrate that Robo1 and Robo2 mostly cooperate to control the development of the major axonal tracts in the mammalian forebrain. The resemblance of the axonal defects found in *Robo1;Robo2* and *Slit1;Slit2* double mutants strongly suggests that Robo1 and Robo2 mediate the function of Slit1 and Slit2 in the formation of these connections.

Materials and Methods

Animals. Mice were treated according to protocols approved by the Committee on Animal Research at the University Miguel Hernández, following Spanish and European Union regulations. Embryonic day 13.5 (E13.5), E14.5, and E18.5 embryos were obtained by mating *Robo1*^{+/-}, *Robo2*^{+/-}, or *Robo1*^{+/-};*Robo2*^{+/-} mice, which were maintained in CD1, C57BL/6, and mixed CD1–C57BL/6 backgrounds, respectively. Genotyping was performed by PCR as described previously (Grieshammer et al., 2004; Long et al., 2004). Because the *Robo1* and *Robo2* genes are linked (being separated by only 1.8 Mb), the *Robo1*^{+/-};*Robo2*^{+/-} colony was generated through meiotic recombination of the mutant alleles (Z. Chen B. B. Gore, H. Long, L. Ma, and M. Tessier-Lavigne, unpublished observations).

Immunohistochemistry and in situ hybridization. Embryos were obtained by cesarean section, anesthetized by cooling, perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS, and postfixed in PFA for 2–8 h. After postfixation, brains were cryoprotected in 30% sucrose and either frozen in embedding medium and cut in a cryostat [embryonic day 13.5 (E13.5) and E14.5] or frozen and cut in a freezing sliding microtome (E16.5 and E18.5). Immunohistochemistry was performed on 40- μ m-thick free-floating sections (E16.5 and E18.5) or on 20- μ m-thick cryostat sections mounted onto glass slides (E13.5 and E14.5). Free-floating sections were preincubated in 5% normal serum of the species in which the secondary antibody was raised, 1% BSA, and 0.3% Triton X-100 in PBS for 1 h at room temperature, and subsequently incubated with the primary anti-serum for 24–36 h at 4°C in 2% normal serum and 0.3% Triton X-100 in PBS. The following antibodies were used: rabbit polyclonal antibody against Robo1 (diluted 1:1000; kindly provided by Fujio Murakami, Osaka University, Osaka, Japan), rabbit polyclonal antibody against Robo2 (diluted 1:1000; kindly provided by Fujio Murakami), rat polyclonal antibody against L1 (Chemicon, Temecula, CA; diluted 1:200), rabbit anti-green fluorescent protein (Invitrogen, San Diego, CA; 1:1000), rabbit anti-calbindin (Swant, Bellinzona, Switzerland; 1:5000), rabbit anti-calretinin (Chemicon; 1:5000), and rabbit anti-Neuropeptide Y (NPY) (DiaSorin, Stillwater, MN; 1:3000). Sections were then incubated in biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories, Burlingame, CA; 1:200), and then transferred into avidin–biotin–peroxidase complex (ABC kit; Vector Laboratories; 1:200) for 2 h at room temperature. Peroxidase enzyme activity was revealed using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride [0.05% in phosphate buffer (PB), pH 7.4] as chromogen and 0.01% H₂O₂ as substrate. Sections were rinsed, dehydrated and mounted in Eukitt mounting media (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). In each experiment, sections from homozygous mutants and their wild-type and heterozygous littermates were processed together. In control experiments, the primary antibody was replaced by 0.2% Triton X-100 in PB, and then reacted as

above. These control sections showed no positive immunoreactivity. Photomicrographs were prepared by light microscopy and documented using a Leica (Nussloch, Germany) DC 500 digital camera. Immunohistochemistry was performed on cryostat sections on glass slides using essentially the same protocol. In some cases, immunofluorescence labeling using fluorochrome-conjugated secondary antibodies was performed on 40 μ m free-floating sections. DNA counterstaining was performed with bis-benzimide (2.5 μ g/ml in PBS; Invitrogen), and the slides were mounted using Prolong Antifade (Invitrogen). For *in situ* hybridization, 20- μ m-thick cryostat sections were hybridized with digoxigenin-labeled probes essentially as described previously (Schaeren-Wiemers and Gerfin-Moser, 1993), using cDNA probes for Robo1 and Robo2 (Bagri et al., 2002).

Slit-alkaline phosphatase binding. Human LRR2-Slit1-alkaline phosphatase (AP), human LRR2-Slit2-AP, or control AP constructs were transfected in COS cells. After 2 d, the conditioned media were concentrated and used directly for binding assays as described previously (Kolodkin et al., 1997). Briefly, 20 μ m cryostat sections from wild-type, *Robo1*^{-/-}, *Robo2*^{-/-}, and *Robo1;Robo2* double-mutant brains were fixed 8 min in cooled 100% methanol. After that, sections were washed in 1 \times PBS, 4 mM MgCl₂, and incubated in a blocking solution (1 \times PBS, 4 mM MgCl₂, 10% FBS) for 1 h at room temperature. For the binding step, Slit-AP fusion proteins were diluted from 1/5 to 1/10 in 1 \times PBS and incubated for 2 h at room temperature. After washes in 1 \times PBS, 4 mM MgCl₂, the bound ligand was fixed to sections with a solution containing 60% acetone, 4% paraformaldehyde, and 20 mM HEPES, pH 7.0. Then, sections were treated at 65°C for 2 h in 1 \times PBS to inactivate endogenous phosphatases. Finally, the slices were incubated in revelation buffer (100 mM Tris, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 300 mg/ml nitroblue tetrazolium, and 250 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) for 2 h at room temperature.

Quantification of axonal length. Neocortical and dorsal thalamic explants were dissected from E17.5 and E13.5 wild-type mice, respectively, and cultured in collagen for up to 96 h. Explants were confronted with COS cells aggregates transfected with *dsRed* or cotransfected with *Slit2* and *dsRed*. After fixation, dorsal thalamus explants were subdivided into four sectors and the length of the 13 longest axons was measured in every explant using SigmaScan Pro software.

Axon tracing. Axon tracing was performed on E14.5 and E18.5 mouse brains after perfusion. Brains were then postfixed by overnight immersion in 4% PFA at 4°C. For neocortical injections, large crystals of 1,1'-diiodo-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) (Invitrogen) were placed into the parietal cortex of E14.5 and E18.5 brains. For dorsal thalamic injections, the brains were bisected into hemispheres, each of which was used for a separate experiment. Small crystals of DiI (0.1–0.3 mm diameter) were injected into the medial face of dorsal thalamus with an insect pin. The depth to which the crystal was inserted into the thalamus or the cortex was ~0.5–1 mm from the midline. The brains were then incubated in 4% PFA for 2–4 weeks at 37°C, rinsed in 0.1 M PB, pH 7.4, and embedded in 4% low-melt agarose. Fifty- to 100- μ m-thick sections were then cut on a vibratome (Leica VT 1000S) in the coronal plane and subsequently counterstained with bis-benzimide, coverslipped with Aquamount (BDH, Poole, UK), and photographed in a fluorescence microscope equipped with a Leica DC500 digital camera.

Results

Expression of Robo1 and Robo2 receptors in the developing forebrain

To investigate the role of Robo receptors in axon guidance in the forebrain, we first analyzed their expression pattern focusing on regions and developmental stages where the major axonal tracts navigate and develop. Consistent with previous studies (Marillat et al., 2001; Bagri et al., 2002; Whitford et al., 2002; Sundaresan et al., 2004), *Robo1* and *Robo2* mRNA are highly expressed in the dorsal thalamus and the cerebral cortex at the time when corticofugal and thalamocortical projections form (Fig. 1A,D). Interestingly, the pattern of expression of *Robo1* and *Robo2* mRNA

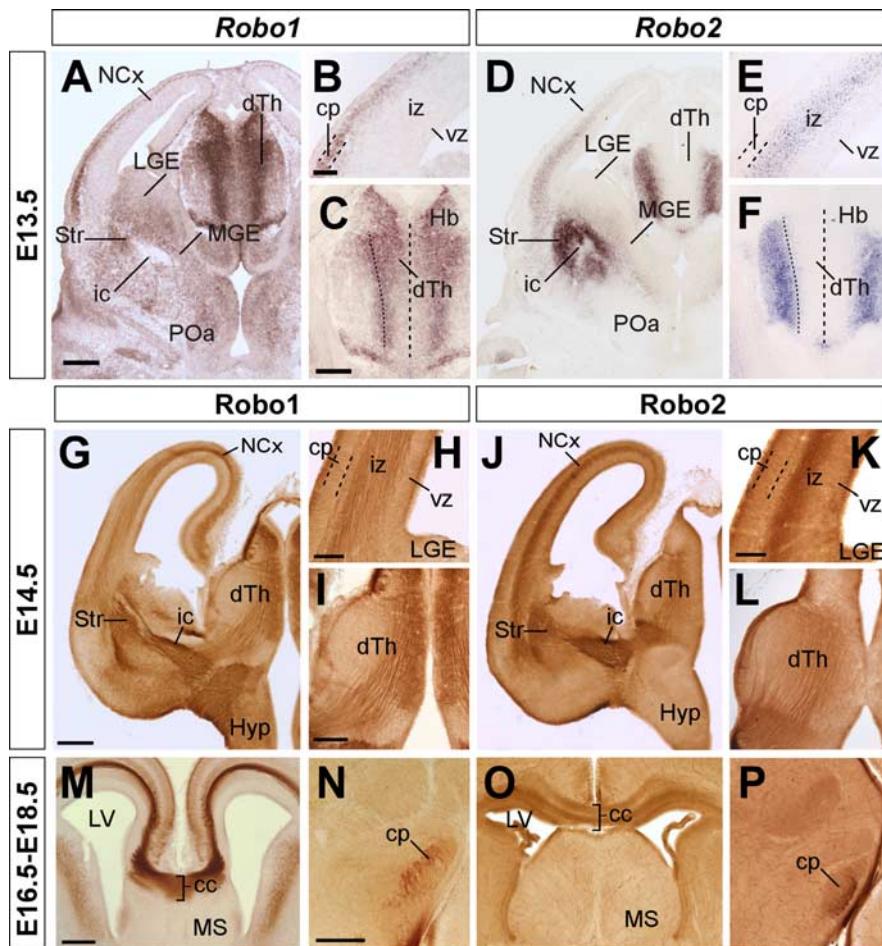


Figure 1. Expression of Robo1 and Robo2 receptors in the embryonic mouse forebrain. Serial coronal sections through mid-telencephalic/rostral diencephalic levels of an E13.5 embryo showing the expression of *Robo1* and *Robo2* mRNAs (**A–D**), and of E14.5, E16.5, and E18.5 embryos showing the expression of *Robo1* (**G–I, M, N**) and *Robo2* proteins (**J–L, O, P**). *Robo1* and *Robo2* mRNAs are expressed in the neocortex (NCx) and dorsal thalamus (dTh) in a partially complementary manner. *Robo1* is expressed in the cortical plate (cp) (**A, B**), in a gradient decreasing from lateral to medial cortex, as well as in the dTh, in a gradient decreasing from the neuroepithelium to the mantle (**A, C**). *Robo2* is expressed in the subplate and intermediate zone (iz) of the cortex (**D, E**), and in the most superficial region of the dTh (**D, F**). Coronal sections through E14.5, E16.5, and E18.5 brains showing *Robo1* (**G–I, M, N**) and *Robo2* (**J–L, O, P**) protein expression pattern are shown. *Robo1* and *Robo2* receptors are expressed in developing axons localized at the iz of the cortex (**G, H, J, K**), dorsal thalamus (**I, L**), and in the cerebral peduncle (cp) (**M, N**). ic, Internal capsule; Hb, habenula; vz, ventricular zone; Str, striatum; LGE, lateral ganglionic eminence; MGE, medial ganglionic eminence; MS, medial septum; LV, lateral ventricle; Hyp, hypothalamus; POa, anterior preoptic area. Scale bars: **A, D, G, J, P**, 300 μ m; **B, E, H, K, M, O**, 100 μ m; **C, F, I, L, N, P**, 200 μ m.

appears mostly complementary, both in the developing cortex (Fig. 1*B, E*) and dorsal thalamus (Fig. 1*C, F*). Specifically, cells at the intermediate zone of the developing cortex appear to express *Robo2* (Fig. 1*E*), whereas neurons that begin to accumulate in the cortical plate primarily express *Robo1* (Fig. 1*B*). Conversely, dorsal thalamic neurons predominantly express *Robo1* as they first become postmitotic (Fig. 1*C*), but they mostly express *Robo2* once they start to differentiate into distinct nuclei of the dorsal thalamus (Fig. 1*F*).

Despite these apparent differences at the mRNA level, immunohistochemistry against Robo1 and Robo2 demonstrated that axons in both corticofugal and thalamocortical projections express both receptors (Fig. 1*G–L*). Moreover, both receptors are also expressed in corticospinal (Fig. 1*N, P*) (for simplicity, we use through the text the term “corticospinal” to refer to cortical layer 5 projections directed toward the mesencephalon, pons, and spinal cord) and callosal projections (Fig. 1*M, O*). In agreement with

these results, analysis of Slit binding sites using Slit1 and Slit2 probes fused to AP tags revealed that callosal, thalamocortical, corticothalamic, and corticospinal axons contain receptors that bind both Slit1 and Slit2 (Fig. 2*A–D*) (data not shown). Slit–AP binding was also detected in the absence of either one of the Robo receptors, reinforcing the notion that Robo1 and Robo2 are mostly coexpressed in these projections (Fig. 2*E, F*) (data not shown). In contrast, Slit2–AP probes did not stain callosal, thalamocortical, corticothalamic, or corticospinal axons in tissue obtained from *Robo1;Robo2* double mutants (Fig. 2*H*) (data not shown), whereas Slit1–AP probes revealed only slight staining in some of these fibers tracts (Fig. 2*G*) (data not shown).

In summary, the temporal and spatial pattern of Robo1 and Robo2 expression in cortical and dorsal thalamic axons suggest that these receptors may play a role in the guidance of the major forebrain axonal tracts, probably mediating the function of Slit proteins in this process.

Slit2 repels neocortical and dorsal thalamic axons *in vitro*

The previous results strongly suggest that cortical and thalamic axons respond to Slit proteins through both Robo1 and Robo2 receptors. In agreement with this view, it has been previously shown that cortical axons are repelled by Slit2 *in vitro* (Shu and Richards, 2001) (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). However, the effect of Slits on thalamic axons has not been tested. To examine the role of Slit proteins on thalamic axons, we cocultured E13.5 dTh explants with COS cells aggregates expressing *Slit2* in three-dimensional collagen gels (Fig. 3). After 4 d *in vitro*, axons extended radially from explants in control experiments (Fig. 3*A, D*) ($n = 19$). In contrast, axon length was significantly shorter on the side of explants facing COS cells aggregates expressing *Slit2* (Fig. 3*B, D*) ($n = 22$). Moreover, we observed many axons turning away from COS cells aggregates expressing *Slit2* (Fig. 3*B*, arrow). These results suggest that, as in the case of cortical axons, Slits proteins also repel the growth of dorsal thalamic axons.

Abnormal corticospinal and thalamocortical projections in *Robo2* but not *Robo1* mutants

The mostly complementary protein expression pattern of Robo1 and Robo2 in the developing forebrain axons suggests that these receptors may coordinate their activity in the guidance of cortical and thalamic projections. To directly address the role of individual Robo receptors in the guidance of these axonal tracts, we first examined the organization of these axons in mice carrying loss-of-function alleles of *Robo1* or *Robo2*. At E18.5, when most forebrain connections have been established, immunohistochemistry

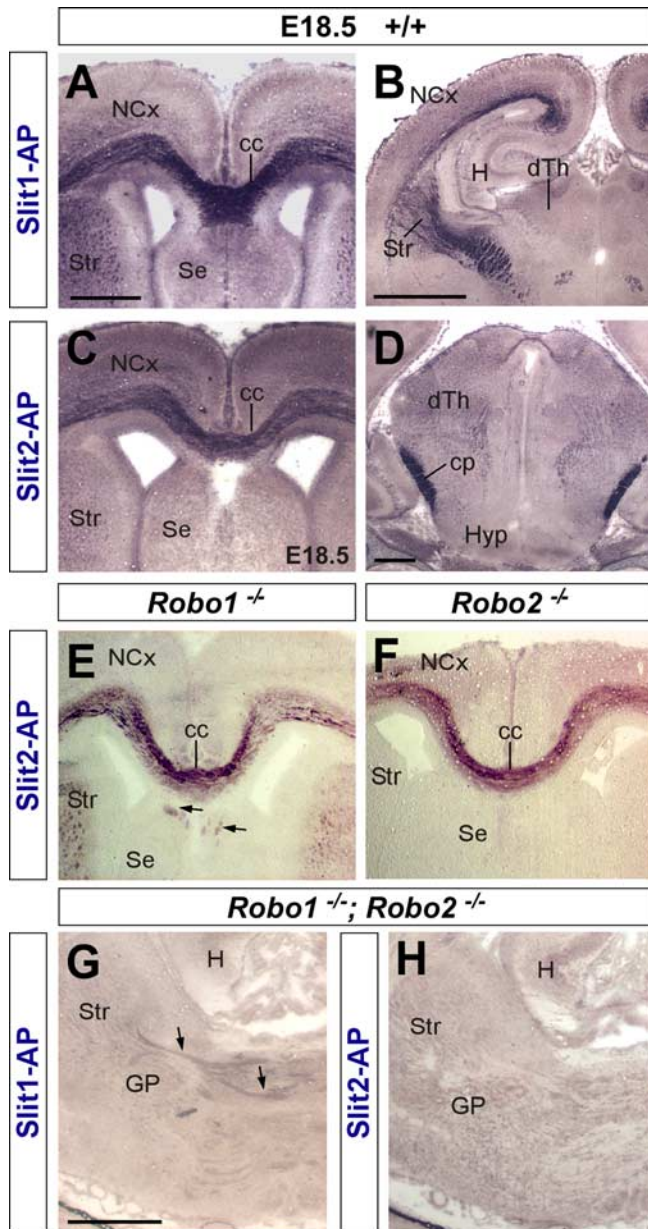


Figure 2. Coronal sections through the forebrain of E18.5 wild-type (**A–D**), *Robo1* (**E**), *Robo2* (**F**), and *Robo1;Robo2* double-mutant (**G, H**) fetuses showing Slit1–AP binding (**A, B, G**) and Slit2–AP binding (**E, F, H**). **A–D**, AP staining labels corticocortical axons at the corpus callosum (cc) (**A, C**), corticospinal axons at the cerebral peduncle (cp) (**D**), and thalamocortical/corticocortical projections (**B**). **E, F**, Slit2–AP staining identifies corticocortical callosal projections in *Robo1* (**E**) and *Robo2* (**F**) mutant brains. Some ectopic bundles are abnormally displaced at the corpus callosum (cc) of *Robo1* mutants (**E**, arrows). **G, H**, Slit–AP binding assays do not generally stain any axonal tract in the forebrain of *Robo1;Robo2* double mutants. Only in a few cases, very weakly stained fibers could be observed after Slit1–AP binding (**G**, arrows). H, Hippocampus; Str, striatum; NCx, neocortex; SE, septum; dTh, dorsal thalamus; GP, globus pallidus; Hyp, hypothalamus. Scale bars: **A, C, E, F**, 500 μ m; **B, G, H**, 1 mm; **D**, 200 μ m.

for the cell adhesion molecule L1 labels both corticothalamic and thalamocortical axons as they course through the internal capsule in the basal ganglia (Fig. 4A) (Jones et al., 2002; López-Bendito et al., 2002). The distribution of L1+ fibers in the telencephalon of *Robo1* or *Robo2* single mutants was mostly indistinguishable from control mice ($n = 8$ for each genotype) (Fig. 4A–C). Moreover, labeling of axons with DiI crystals placed in the neocortex of E18.5 *Robo1* or *Robo2* single mutants did not reveal major differences in the distribution of corticofugal axons as they course

through the internal capsule (Fig. 5A–C). In some *Robo2* mutants, however, a few corticofugal axons were found ventrally displaced, abnormally reaching the ventral midline at the level of the anterior commissure ($n = 4$ of 8 brains) (Fig. 5C').

Immunohistochemistry for NPY, a transient marker of corticothalamic projections (Bagri et al., 2002), did not reveal major differences in the distribution of corticothalamic axons in either *Robo1* or *Robo2* single mutants ($n = 4$ for each genotype) (Fig. 4D–F). Similar results were obtained from the analysis of corticothalamic axons after DiI placements in the neocortex ($n = 8$ for each genotype) (Fig. 5D, E) (data not shown). Occasionally, some abnormal bundles of cortical fibers were found in the dorsal thalamus of *Robo2* mutants ($n = 4$ of 8 brains) (Fig. 5F), suggesting the existence of targeting defects in a subset of mice lacking *Robo2* function.

Because the development of corticothalamic and thalamocortical axons is highly coordinated in time and space (for review, see López-Bendito and Molnár, 2003), we next analyzed thalamocortical projections in *Robo1* and *Robo2* single mutants. Analysis of thalamocortical projections using immunohistochemistry against calretinin, a marker of thalamic axons, revealed a normal distribution of thalamocortical axons in *Robo1* mutants compared with controls ($n = 4$) (Fig. 4G, H) (data not shown). In contrast, in *Robo2* mutants, some thalamocortical fibers were observed to fail reaching the telencephalon, and instead growing abnormally toward the ventral diencephalon, a region normally nonpermissive for thalamocortical axon outgrowth ($n = 4$) (Fig. 4I) (Braisted et al., 1999). DiI injections in the dorsal thalamus of control, *Robo1* and *Robo2* mutants confirmed that numerous thalamocortical axons failed to enter the telencephalon and instead invaded the hypothalamus in *Robo2* mutants (Fig. 5I), whereas no major defects were observed in the guidance of thalamocortical axons in *Robo1* mutants compared with wild-type control brains ($n = 4$) (Fig. 5G, H).

We next studied the organization of other corticofugal projections, such as those contributing to cerebral peduncle or the corpus callosum. Analysis of the cerebral peduncle at the level of the diencephalon demonstrated that corticospinal axons develop normally in the absence of *Robo1* function compared with wild-type controls ($n = 4$) (Figs. 4J, K, 5J, K). In contrast, the cerebral peduncle appears to be ventrally displaced in all *Robo2* mutants examined ($n = 4$) (Figs. 4L, 5L). Moreover, DiI-labeled corticofugal axons were observed to abnormally defasciculate from the cerebral peduncle in some *Robo2* mutants ($n = 3$ of 4 brains) (data not shown).

Previous studies have shown that Slit2 is required for the guidance of corticocortical projections at the corpus callosum (Bagri et al., 2002; Shu et al., 2003). However, analysis of Slit2–AP binding assays revealed only minor defects in the development of the corpus callosum in *Robo1* mutant embryos, and no apparent abnormalities in *Robo2* mutant embryos compared with controls ($n = 3$) (Fig. 2E, F). Immunohistochemistry against NPY ($n = 4$) (Fig. 4M–O) or DiI tracing from the neocortex ($n = 4$) (Fig. 5M–O) reinforced this view, because both methods failed to reveal major defects in the development of callosal projections in *Robo1* or *Robo2* single mutants.

Corticofugal axon guidance is severely disrupted in *Robo1; Robo2* double mutants

The mild defects seen in the single mutants suggested two possibilities: (1) Robo receptors do not mediate the function of Slit proteins during the development of forebrain connections, or (2) *Robo1* and *Robo2* receptors are mostly coexpressed and function

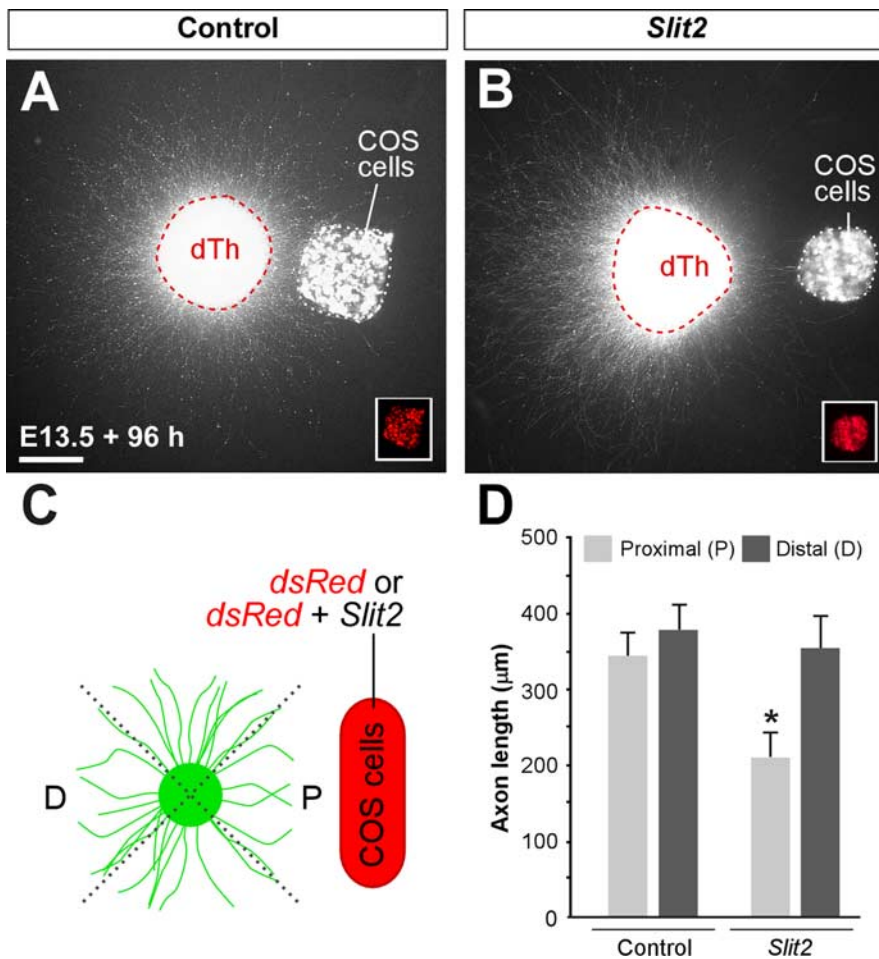


Figure 3. Dorsal thalamic explants from E13.5 GFP transgenic mice showing Slit2 repulsion to dorsal thalamic axons. **A, B**, Dorsal thalamic explants were cocultured in collagen for 4 d *in vitro* either with mock-transfected COS cells (**A**) or Slit2-transfected COS cells (**B**). **C**, Scoring scheme used to test the effect of Slit2 on dorsal thalamus (dTh) axons in the experiments presented in **A** and **B**. Explants were subdivided into four equal sectors. The two sectors used for quantification were designated as proximal (P) and distal (D) in relation to the COS cell aggregate. The length of the 13 longest axons in each sector was measured in every explant. **D**, Quantification of the axonal growth of dTh explants cultured in collagen with mock-transfected COS cells ($n = 19$) or Slit2-transfected COS cells ($n = 22$) show a repulsive activity of Slit2. Mean length of axons was as follows: proximal, $345.8 \pm 32.3 \mu\text{m}$; distal, $374.9 \pm 33.0 \mu\text{m}$ (average \pm SEM) in controls; and proximal, $210.4 \pm 29.4 \mu\text{m}$; distal, $356.1 \pm 43.5 \mu\text{m}$ (average \pm SEM) in experimental cases. Significant differences were observed among proximal sectors in the case of Slit2 compared with controls cases. $*p > 0.001$. Scale bar, $200 \mu\text{m}$.

cooperatively in corticofugal and thalamocortical axons. In the latter case, each Robo receptor may functionally compensate for the loss of the other one, providing a rational explanation to the absence of guidance defects found in either *Robo1* or the relatively minor abnormalities present in *Robo2* single mutants. To test this hypothesis, we next examined the organization of cortical and thalamic projections in *Robo1;Robo2* double mutants.

In contrast to *Robo1* and *Robo2* single mutants, a simple cytoarchitectural analysis of the telencephalon of *Robo1;Robo2* double mutants revealed the existence of large bundles of ectopic fibers crossing the ventral midline at E18.5 ($n = 5$) (Fig. 6A–C). This abnormal crossing of fiber tracts at the level of the anterior commissure was also observed on sections stained with antibodies against L1 ($n = 5$) (Fig. 6D–F). L1 and calbindin immunostaining on sagittal sections revealed even more clearly that, in addition to the anterior commissure, large bundles of axons aberrantly cross the midline in the basal telencephalon of *Robo1;Robo2* double mutants ($n = 3$) (Fig. 6G–L). Because of the presence of the ectopic commissural axons, the anterior commissure

is always displaced dorsally in *Robo1;Robo2* double mutants (Fig. 6K,L).

To determine the source of the ectopic commissural axons found in the basal telencephalon of *Robo1;Robo2* double mutants, we next traced the trajectory of cortical axons by placing crystals of DiI in the developing neocortex. At E18.5, DiI injections in the parietal cortex of wild-type mice revealed a thick bundle of labeled axons coursing through the internal capsule as they progress toward the diencephalon ($n = 10$) (Fig. 7A,B). In contrast, DiI placements in the neocortex of *Robo1;Robo2* double mutants showed that most corticofugal axons were diverted toward the midline, which they abnormally crossed ($n = 8$) (Fig. 7C,D,F). Interestingly, many cortical axons appear to return toward the midline after crossing it (Fig. 7D,F), because only a few axons were found to grow away from the midline toward the contralateral cortex (data not shown). DiI injections in the neocortex, in particular its caudal part, labeled some axons that did not decussate in the ventral telencephalon but followed their normal route toward the diencephalon (Fig. 7E) (data not shown). The abnormal trajectory of corticofugal axons was observed in embryos as early as E14.5 ($n = 3$) (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

The massive number of axons that abnormally cross the ventral telencephalon in *Robo1;Robo2* double mutants suggests that both corticothalamic (layer 6) and cerebral peduncle (layer 5) projections are affected in the absence of Robo function. Accordingly, immunohistochemistry for NPY as well as DiI tracing experiments from the parietal cortex revealed that only a few cortical axons reach the dorsal thalamus in *Robo1;Robo2* double mutants ($n = 8$) (Fig. 8A–D,G,H). Moreover, these

axons follow a more ventral trajectory than wild-type axons as they enter the diencephalon on their way to the dorsal thalamus (Fig. 8A,B,G,H).

Whereas some corticothalamic axons were consistently found in the absence of Robo1 and Robo2 function, DiI placements in the neocortex revealed that virtually no corticospinal axons reach the diencephalon through the cerebral peduncle in *Robo1;Robo2* double mutants ($n = 8$) (Fig. 8E–H). Thus, Robo1 and Robo2 appear essential for the normal development of layer 5 cortical projections.

Simultaneous loss of Robo1 and Robo2 perturbs corticocortical projections at the corpus callosum

We next analyzed whether the projections of corticocortical axons were also impaired in the absence of both receptors. At E18.5, Nissl staining revealed that the size of the corpus callosum was reduced in *Robo1;Robo2* double mutants compared with wild-type mice ($n = 5$) (Fig. 9A,B). In addition, two large ectopic bundles of fibers were also found on either side of the corpus

callosum of *Robo1;Robo2* double mutants, which resemble Probst bundles (Fig. 9B). These ectopic bundles were also observed when sections were stained for NPY ($n = 3$) (Fig. 9D). Moreover, DiI tracing experiments demonstrated that the ectopic axons were corticocortical axons that abnormally defasciculated from the corpus callosum and coursed ventrally into the septum ($n = 4$) (Fig. 9E–H). This defect was consistently observed after DiI placements in different cortical regions (data not shown).

Prominent thalamocortical axon guidance defects in *Robo1;Robo2* double mutants

We next investigated the consequences of the simultaneous loss of *Robo1* and *Robo2* receptors in the guidance of thalamocortical axons. At E18.5, immunohistochemistry against calretinin, which labels thalamocortical projections originating from medial thalamic nuclei, revealed that numerous thalamic axons abnormally invade the hypothalamus, failing to turn rostrally into the telencephalon ($n = 3$) (Fig. 10A–C, M, N). In agreement with this observation, DiI injections into the dorsal thalamus of E18.5 *Robo1;Robo2* double mutants showed that, compared with control mice, the vast majority of thalamocortical projections fail to enter the telencephalon and instead invade the hypothalamus ($n = 3$) (Fig. 10G–I, M, N), a phenotype that was observed already in E14.5 embryos ($n = 3$) (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

DiI injections in the dorsal thalamus revealed that only some thalamic axons enter the telencephalon in *Robo1;Robo2* double mutants. Once in the telencephalon, very few thalamocortical axons were found to grow through the internal capsule into the cerebral cortex ($n = 5$) (Fig. 10J–L, M, N). Instead, many of the thalamocortical fibers that succeeded in entering the telencephalon were abnormally diverted toward the midline, which they cross (Fig. 10D–F, M, N) (data not shown). In summary, thalamocortical projections are severely disrupted in the absence of *Robo1* and *Robo2* function, with many axons aberrantly projecting toward the hypothalamus or the telencephalic ventral midline.

Discussion

The functioning of the cerebral cortex relies on several stereotypical long-distance projections, such as the corticofugal, callosal, and thalamocortical connections.

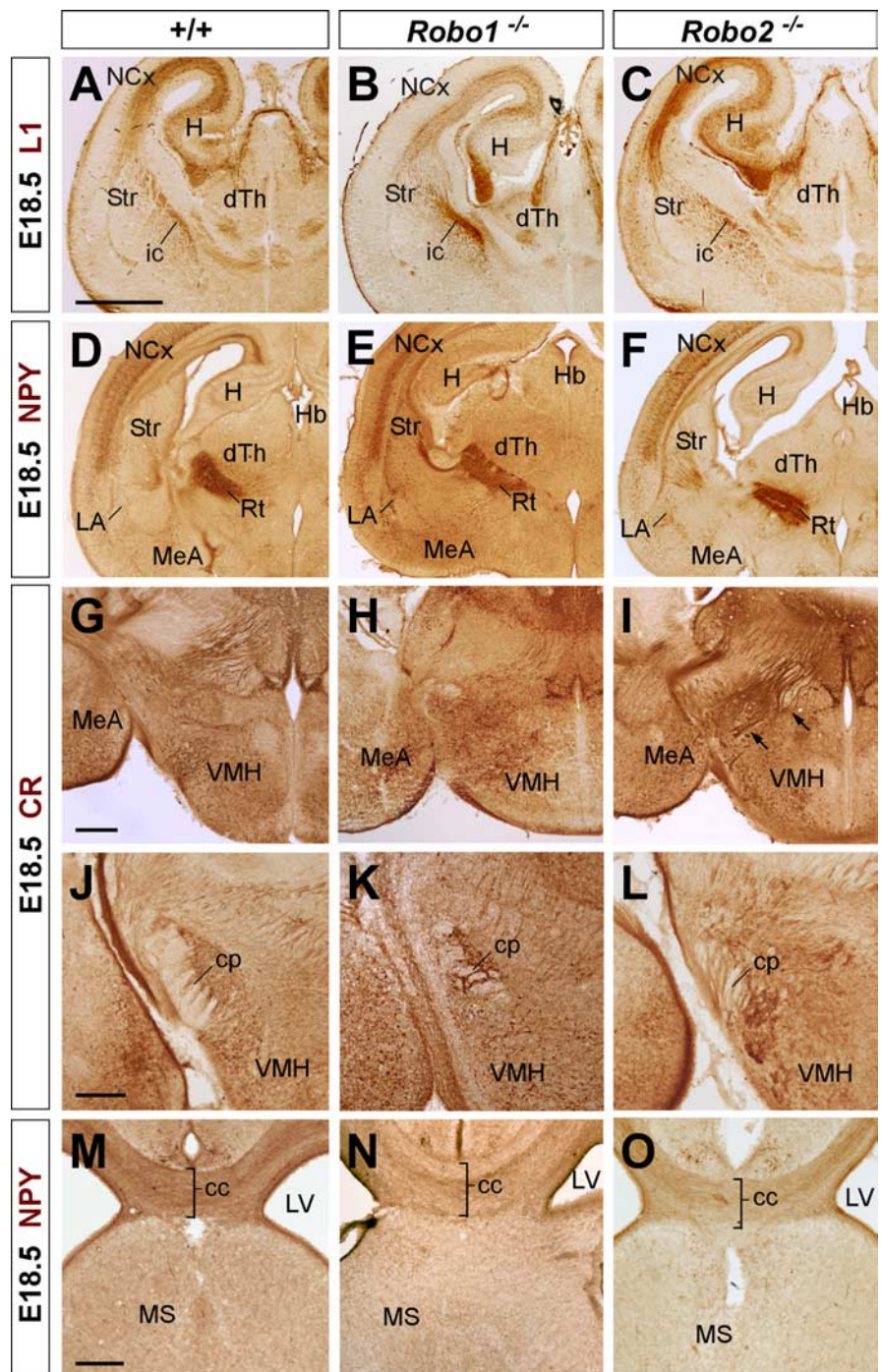


Figure 4. Abnormal axonal trajectories in the forebrain of *Robo1* and *Robo2* single-mutant mice. Coronal sections through the telencephalon of E18.5 embryos showing cell adhesion molecule L1 (L1) (A–C), NPY (D–F, M–O), and calretinin (CR) (G–I) immunohistochemistry in wild-type (A, D, G, J, M), *Robo1* (B, E, H, K, N), and *Robo2* (C, F, I, L, O) mutant mice. A–C, In wild-type embryos, L1+ axons are confined to the intermediate zone of the neocortex (NCx), striatum (Str), and dorsal thalamus (dTh). In *Robo1* and *Robo2* mutants, L1+ fascicles are observed at the NCx and Str in a similar pattern as in wild-type embryos. D–F, Immunohistochemistry for NPY demonstrates that corticothalamic axons reach the diencephalon in wild-type (D), and *Robo1* (E) and *Robo2* mutant (F) brains. G–I, Coronal sections at the level of the diencephalon showing the trajectory of thalamocortical axons by immunohistochemistry for calretinin (CR) in wild-type (G), and *Robo1* (H) and *Robo2* (I) mutant brains. At this level, CR+ thalamocortical axons normally turn rostrally to enter the telencephalon, thus leaving the plane of section as observed in wild-type (G) and *Robo1* mutants (H). In contrast, abnormal CR+ bundles were observed descending to the hypothalamus in *Robo2* mutants (I, arrows). J–L, Abnormal development of the cerebral peduncle (cp) in *Robo2* mutant brains (L), as revealed by calretinin immunostaining. M–O, Coronal sections at the level of the corpus callosum (cc) showing corticocortical fibers labeled by NPY immunohistochemistry in wild-type (M), and *Robo1* (N) and *Robo2* (O) mutant mice. ic, Internal capsule; H, hippocampus; Hb, habenula; Rt, reticular thalamic nucleus; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; MeA, medial amygdala; LA, lateral amygdala; MS, medial septum; LV, lateral ventricle. Scale bars: A–F, 1 mm; G–L, 100 μ m; M–O, 200 μ m.

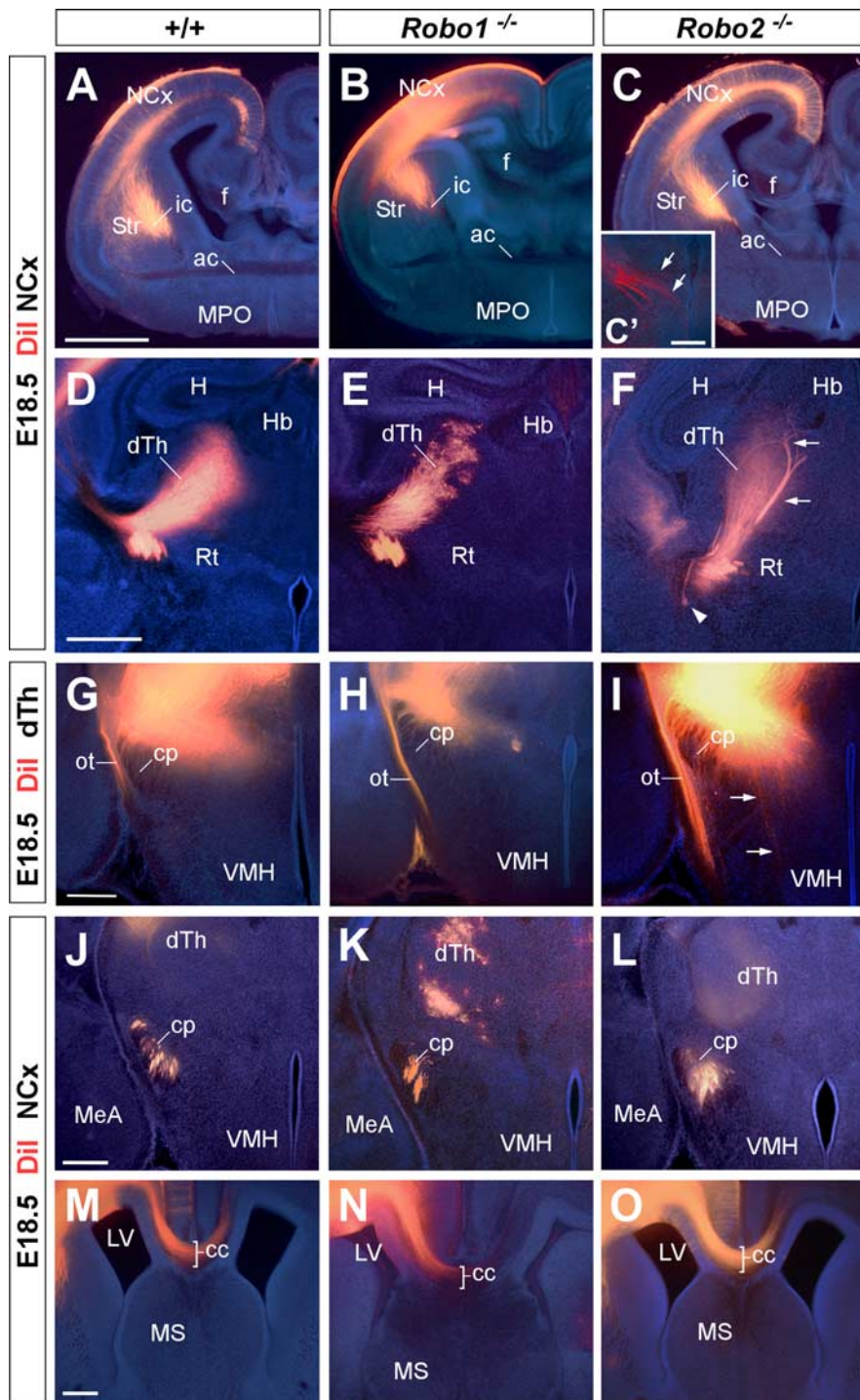


Figure 5. Axon guidance defects in the forebrain of *Robo2* single-mutant mice. Coronal sections through the telencephalon of E18.5 brains with Dil implanted in the neocortex (NCx) (**A–F, J–O**) or in the dorsal thalamus (dTh) (**G–I**) of wild-type (**A, D, G, J, M**), and *Robo1* (**B, E, H, K, N**) and *Robo2* (**C, F, I, L, O**) mutant mice, showing computer-generated overlays of Dil-labeled axons and Hoechst counterstain. **A–C'**, Coronal sections showing labeled Dil axons extending from the cortex into the internal capsule (ic) in wild-type (**A**), and *Robo1* (**B**) and *Robo2* (**C, C'**) mutant mice. **D–F**, Abnormal defasciculation (arrowhead) and targeting (arrows) of corticothalamic axons at the dorsal thalamus of *Robo2* mutant mice (**F**). In *Robo1* mutant mice, labeled axons extend from the cortex into the dorsal thalamus normally. **G–I**, Coronal sections through the caudal diencephalon showing dorsal thalamic fibers abnormally entering the hypothalamus in *Robo2* mutant mice (**I**). No guidance defects were observed in the thalamocortical axons in *Robo1* mutant mice (**H**) compared with wild type (**G**). **J–L**, Coronal sections showing corticospinal labeled axons at the cerebral peduncle (cp) of wild-type (**J**), and *Robo1* (**K**) and *Robo2* (**L**) mutant mice. Note the abnormal ventral position of the cerebral peduncle and the defasciculation of axons in *Robo2* mutant mice. **M–O**, Rostral coronal sections showing corticocortical axons at the corpus callosum (cc) of wild-type (**M**), and *Robo1* (**N**) and *Robo2* (**O**) mutant mice. No guidance defects were observed in either of the *Robo* single mutants. ac, Anterior commissure; Str, striatum; f, fimbria; MPO, medial preoptic area; H, hippocampus; Rt, reticular thalamic nucleus; Hb, habenula; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; MeA, medial amygdala nucleus; MS, medial septum; ot, optic tract; LV, lateral ventricle. Scale bars: **A–C**, 1 mm; **C'**, 200 μ m; **D–F**, 500 μ m; **G–O**, 300 μ m.

Several studies have examined the early development of these projections and have identified pioneering axonal populations as well as potential intermediate targets and choice points for these axons (McConnell et al., 1989; De Carlos and O'Leary, 1992; Métin and Godement, 1996; Molnár et al., 1998; Braisted et al., 1999; Tuttle et al., 1999; Auladell et al., 2000; López-Bendito et al., 2006). In addition, multiple molecules that participate in the guidance of these connections have been identified, providing a comprehensive frame in which to understand their development (Serafini et al., 1996; Métin et al., 1997; Richards et al., 1997; Braisted et al., 2000; Leighton et al., 2001; Bagri et al., 2002; López-Bendito et al., 2006). Thus, Slits play a fundamental role in the development of corticocortical callosal projections, layer 5 corticofugal projections toward the mesencephalon, pons, and spinal cord, and layer 6 corticothalamic projections (Bagri et al., 2002; Shu et al., 2003). Moreover, the development of the reciprocal thalamocortical projections also depends on Slit function (Bagri et al., 2002). Here, we demonstrate that the function of Slits in the guidance of these connections is mostly mediated by the coordinated activity of *Robo1* and *Robo2* receptors.

Robo1 and Robo2 have mostly redundant functions in forebrain axon guidance

Our previous analysis of *Slit1* and *Slit2* mutants led us to suggest that Slit proteins contribute in at least three different ways to the development of the mammalian forebrain: (1) the maintenance of the dorsoventral position of longitudinal axonal tracts by preventing axons from entering into ventral regions; (2) the prevention of axonal extension toward and across the midline; and (3) the channeling of axons into particular regions, such as commissures (Bagri et al., 2002). *Slit1* and *Slit2*, which are expressed in partially overlapping patterns in the forebrain, cooperate to fulfill these functions: *Slit2* is mostly responsible of preventing ventral invasion and axon channeling (1 and 3), whereas both *Slit1* and *Slit2* contribute to prevent midline crossing of ipsilateral tracts (2) (Fig. 11).

The finding that *Robo1* and *Robo2* proteins are expressed in developing forebrain axons at the time when these connections are formed, led us to hypothesize that these receptors may play an important role in their guidance. However, analysis of mouse mutants for *Robo1* or *Robo2*

revealed very few guidance errors in the absence of either one of these receptors. In the case of *Robo2* mutants, our analysis revealed only relatively moderate defects in the dorsoventral position of corticofugal, corticothalamic, and thalamocortical tracts, which enter ventral regions that they normally avoid (Fig. 11). In the case of *Robo1* mutants, we could detect only very minor defects in the development of some corticocortical callosal connections (Fig. 2E). In contrast to our findings, a recent analysis of a different mutant allele of *Robo1* showed a more severe phenotype, demonstrating that the function of this receptor is essential for the development of callosal projections, the absence of which cannot be compensated by the function of *Robo2* (Andrews et al., 2006). We do not know the source of the discrepancy; however, it is possible that, as previously observed with other genes (Zheng et al., 2003), differences in the genetic background of the two mutant strains could explain the different penetrance of the *Robo1* mutation. In addition, our *Robo1* allele is likely to be a severe hypomorph rather than a complete null (Long et al., 2004); this would be consistent with the observation of weak Slit1–AP binding in *Robo1;Robo2* double mutants (Fig. 2G). In any case, our *Robo1* allele only appears to behave as a hypomorph in the callosal projection [compared with the *Robo1* allele described by Andrews et al. (2006)], because the remaining defects observed in *Robo1;Robo2* double mice phenocopy those found in *Slit1;Slit2* double mutants.

The absence of severe axon guidance defects in *Robo1* and *Robo2* single mutants suggests that both receptors cooperate in the guidance of most forebrain projections. However, as described above for the callosal projections in *Robo1* mutants (this study; Andrews et al., 2006), there are defects in *Robo2* mutants that cannot be compensated by *Robo1* function, such as the ventrally projecting axons found in corticofugal and thalamocortical tracts. This suggests that that *Robo1* and *Robo2* functions may not be completely redundant. Interestingly, cortical and thalamic projections also overshoot ventrally in *Slit2*, but not in *Slit1* mutants, which led to the proposal that the range of Slit2 function includes regions more distant from the midline than Slit1 (Fig. 11) (Bagri et al., 2002). Why do axons overshoot ventrally in *Robo2* mutants? One possibility is that some cortical and thalamic neurons do not express significant levels of *Robo1* receptors. This is unlikely, however, because in the absence of both receptors axons abnormally cross the midline, and *Robo2* mutants do not have obvious midline crossing defects. Alternatively, Slit2 binding to *Robo2* may be more effective than it is to *Robo1*, which therefore may not be able to mediate the repulsion required to maintain growing axons at their normal dorsoventral position (Fig. 11). Consistent with this

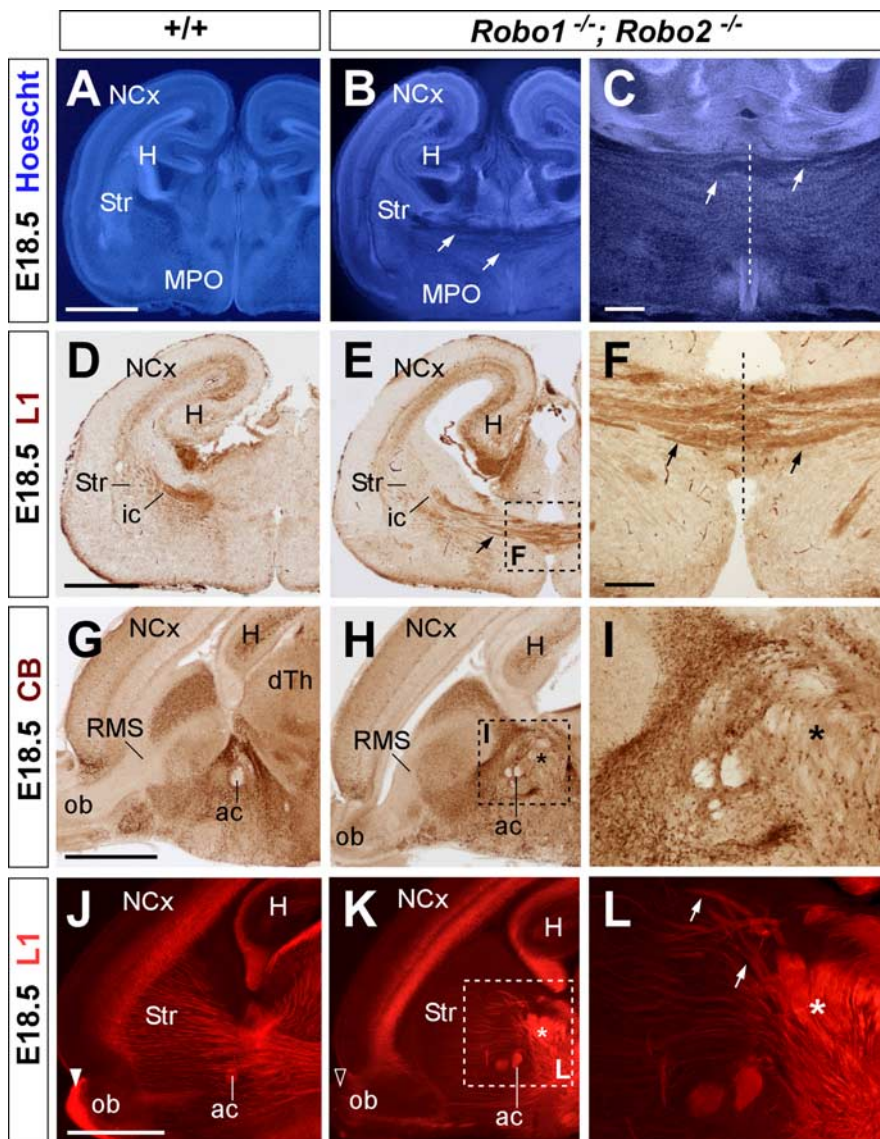


Figure 6. Abnormal axonal trajectories in the forebrain of *Robo1;Robo2* double-mutant mice. Coronal (**A–F**) and sagittal (**G–L**) sections through the telencephalon of E18.5 embryos showing Hoechst staining (**A–C**), cell adhesion molecule L1 (**D–F, J–L**), and calbindin (**G–I**) immunohistochemistry in wild-type (**A, D, G, J**) and *Robo1;Robo2* (**B, C, E, F, H, I, K, L**) mutant mice. **A–C**, Hoechst staining shows ectopic axonal bundles crossing the midline at the level of the medial preoptic region (MPO) (**B, C**, arrows). The anterior commissure (ac) is severely displaced dorsally. **D–F**, Immunostaining for L1 confirm that abnormal bundles of fibers cross the midline in *Robo1;Robo2* mutants (**E, F**, arrows). **G–I**, Immunohistochemistry for calbindin delineates the abnormal crossing of the midline by unstained fibers (**H, I**). **J–L**, Ectopic bundles of axons crossing the midline are very evident in sagittal sections. Very few thalamic L1+ axons extend through the striatum in *Robo1;Robo2* mutants because they accumulate in the midline (asterisk). The midline is indicated by a dotted line in **C** and **F**. NCx, Neocortex; ic, internal capsule; ob, olfactory bulb, RMS, rostral migratory stream; Str, striatum; H, hippocampus. Scale bars: **A, B, D, E, G, H, J, K**, 1 mm; **C**, 300 μ m; **F, I, L**, 200 μ m.

possibility, full-length Slit2 or its proteolytic N-terminal fragment bind more effectively to *Robo2* than to *Robo1* *in vitro* (Nguyen Ba-Charvet et al., 2001). Thus, it is conceivable that the interaction between Slit2 and *Robo2* constitutes the primary signaling system involved in maintaining the dorsoventral position of corticofugal and thalamocortical projections.

Similar forebrain guidance defects in *Robo1;Robo2* and *Slit1;Slit2* double mutants

The lack of prominent forebrain axon guidance defects in *Robo1* and *Robo2* mutants suggests that both receptors are indeed expressed by the same neurons and thereby may primarily compen-

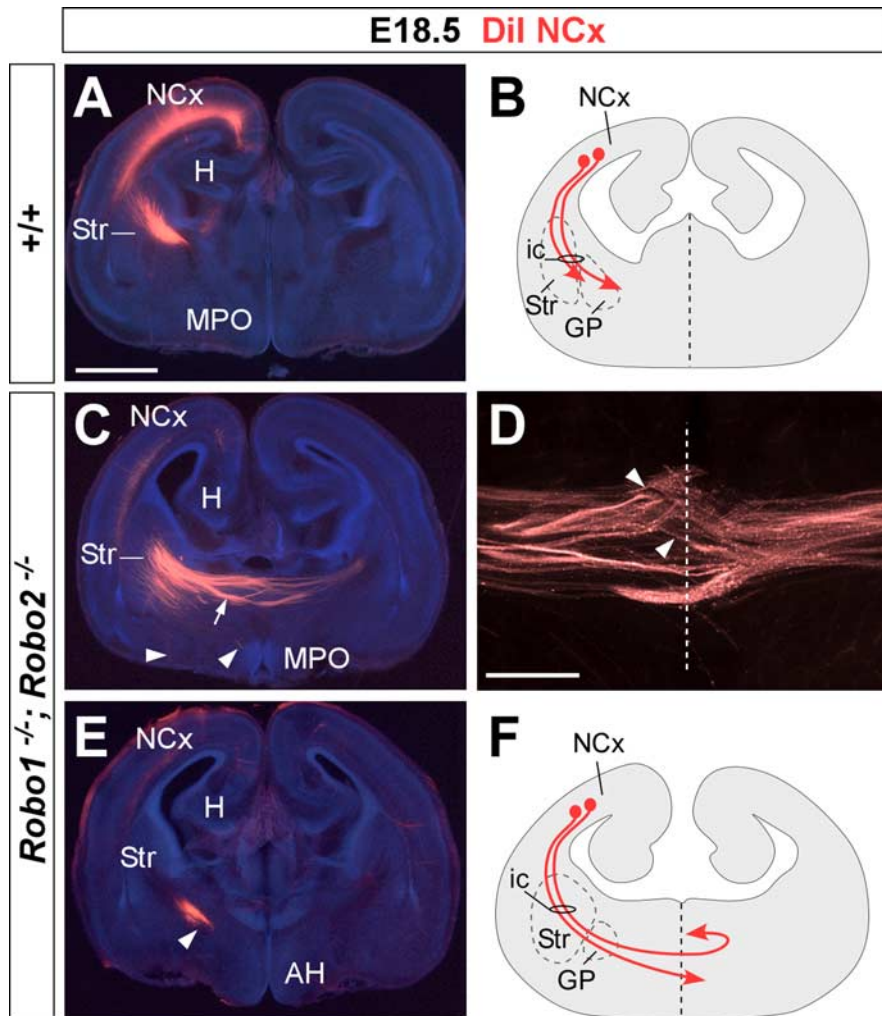


Figure 7. Corticofugal axons abnormally reach the telencephalic midline in *Robo1;Robo2* double-mutant mice. Coronal sections through the telencephalon of E18.5 brains with Dil implanted in the neocortex (NCx), showing computer-generated overlays of Dil-labeled corticofugal axons and Hoechst counterstaining from wild-type (**A**) and *Robo1;Robo2* mutants (**C–E**). The midline is indicated with a dotted line in **D**. The schemas summarize the results obtained in control (**B**) and *Robo1;Robo2* mutants (**F**). **A, B**, In wild-type mice, labeled axons extend from the cortex into the striatum (Str). **C–F**, In *Robo1;Robo2* mutants, labeled axons from the internal capsule (ic) abnormally approach the midline and cross it (**C**, arrow). A few axons that reach the midline course ventrally (arrowheads). Most of the axons that crossed the midline at more anterior levels were found in the contralateral side, where they either travel to the base of the telencephalon or extend toward the contralateral cortex (**C, D**). MPO, Medial preoptic area; H, hippocampus, AH, anterior hypothalamus. Scale bars: **A, C, E**, 1 mm; **D**, 300 μ m.

sate each other's function in the absence of one of the receptors. This compensation does not appear to be at the level of gene expression or protein localization, because Robo1 protein or mRNA levels do not change in the forebrain of *Robo2* mutant mice, and, conversely, Robo2 protein or mRNA levels do not vary in *Robo1* mutants (supplemental Figs. 3, 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Instead, it seems most likely that cortical and thalamic neurons normally contain functional levels of both receptors in growing axons. This hypothesis is in agreement with the analysis of *Robo1;Robo2* double mutants, which mostly recapitulate the phenotypes observed in *Slit1;Slit2* double mutants (Bagri et al., 2002) (Fig. 11).

In *Slit1;Slit2* double mutants, most corticofugal and corticothalamic axons fail to reach the diencephalon, because they massively cross the midline in the ventral telencephalon (Bagri et al., 2002). Thalamocortical axons also make prominent guidance errors in *Slit1;Slit2* double mutants; many run into the hypothalamic region, and the few that enter the telencephalon also turn

aberrantly toward the midline. Thus, in the simultaneous absence of Slit1 and Slit2 or Robo1 and Robo2, cortical and thalamic ipsilateral projections fail to maintain their ipsilateral condition and instead abnormally invade the midline. Because these prominent defects are not present in either *Robo1* or *Robo2* single mutants (this study; Andrews et al., 2006), it seems clear that Slit1 and Slit2 prevent midline crossing of ipsilateral projections in the mammalian forebrain through both Robo1 and Robo2 receptors.

In the spinal cord, commissural axons upregulate Robo1 and Robo2 once they have crossed the midline, thereby contributing to their navigation beyond the floor plate (Long et al., 2004). In contrast, the only population of commissural axons examined in this study, the corticocortical callosal axons, is sensitive to Slit proteins before midline crossing. In this region, two glial populations adjacent to the midline, the glial wedge and the indusium griseum, express *Slit2* and form a narrow pathway through which callosal axons extend (Shu et al., 2003). It has been recently suggested that Robo1 might be the unique mediator of Slit2 function in the formation of the corpus callosum (Andrews et al., 2006). Our results, however, strongly suggest that Robo2 also contributes to the formation of this commissure, because we observed very prominent defects in *Robo1;Robo2* double mutants but no abnormalities in either *Robo1* or *Robo2* single mutants. Even assuming that the *Robo1* allele analyzed here is only a severe hypomorph, our genetic analysis strongly suggests that Robo2 signaling contributes along with Robo1 in the formation of the corpus callosum.

Interaction of Slit/Robo signaling with other molecules

It has been previously shown that molecules such as cell surface heparan sulfates may modulate the interaction of Slits and Robo receptors. Thus, biochemical experiments have shown that Slits bind the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 (Liang et al., 1999; Ronca et al., 2001). Heparan sulfate enhances the affinity of Slit2 for Robo1 receptors *in vitro*, and removal of cell surface heparan sulfate by heparinase III treatment or addition of saturating amounts of heparan sulfate abolishes the repulsive activity of Slit2 toward olfactory bulb axons in explant cultures (Hu, 2001). Moreover, nervous system-specific conditional mutants for EXT1, a glycosyltransferase enzyme required for the synthesis of heparan sulfate, display guidance defects at the optic chiasm that are similar to those found in *Slit1;Slit2* double mutants (Plump et al., 2002; Inatani et al., 2003). Furthermore, reduction of one *Ext1* allele in *Slit2*^{-/-} mice, which otherwise have a relatively normal optic chiasm, cause profound retinal axon misguidance similar to those found in conditional *Ext1* mutants and *Slit1;Slit2* double mutants. Similarly, zebrafish mutants for both

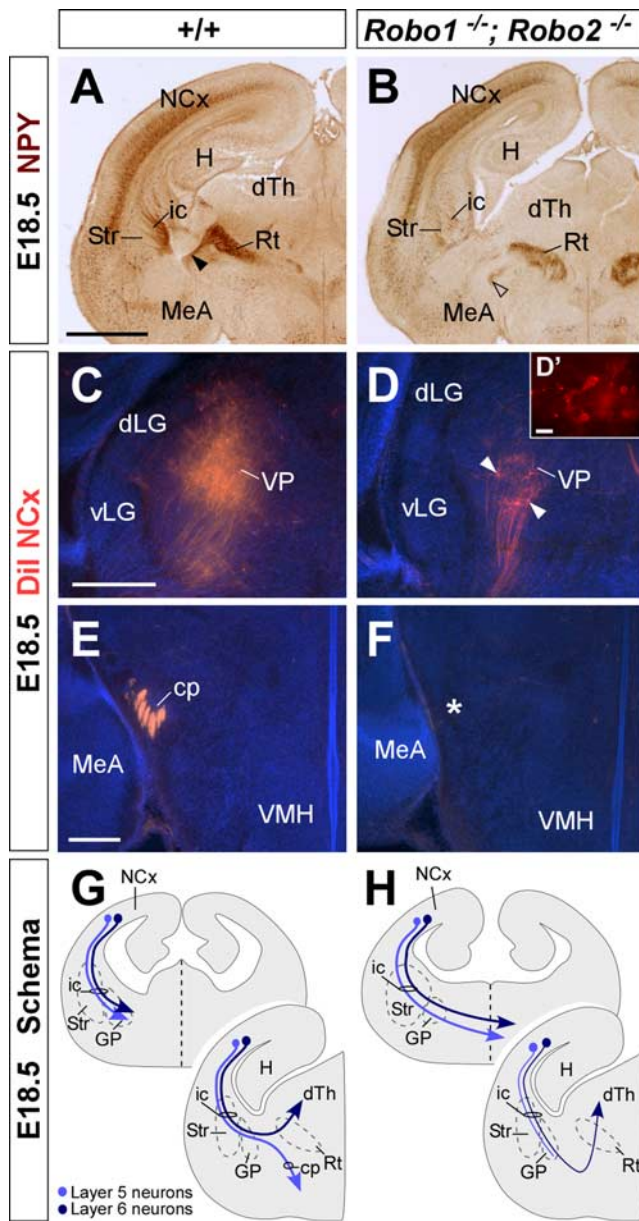


Figure 8. Corticothalamic and corticospinal projections are severely defective in *Robo1*; *Robo2* double-mutant mice. **A, B**, Coronal sections through the telencephalon of E18.5 brains showing NPY immunohistochemistry in wild-type (**A**) and *Robo1*; *Robo2* (**B**) mutant mice. NPY immunohistochemistry demonstrates that some cortical axons reach the dorsal thalamus (dTh) in *Robo1*; *Robo2* mutants, although through an abnormally ventral path (open arrowhead). **C, D**, Coronal sections through the dTh of E18.5 embryos with Dii implanted in the neocortex (NCx), showing computer-generated overlays of Dii retrogradely labeled cells and Hoechst counterstain from wild-type (**C**) and *Robo1*; *Robo2* mutants (**D**). The number of retrogradely labeled cells found in the dTh is greatly reduced in *Robo1*; *Robo2* mutants (**D**, arrowheads). **E, F**, The cerebral peduncle (cp) is absent in *Robo1*; *Robo2* mutants (**F**), as revealed by the lack of Dii-labeled corticospinal fibers in the structure. The majority of these fibers cross abnormally the midline at more rostral levels. **G, H**, The schemas summarize the pathway followed by corticothalamic (layer 6; dark blue) and corticospinal (layer 5; light blue) axons in wild-type (**G**), and *Robo1*; *Robo2* (**H**) mutant mice. Str, Striatum; Rt, reticular thalamic nucleus; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; MeA, medial amygdala; VP, ventroposterior nucleus; dLG, dorsal lateral geniculate nucleus; vLG, ventrolateral geniculate nucleus; ic, internal capsule; GP, globus pallidus; H, hippocampus. Scale bars: **A, B**, 1 mm; **C, D**, 300 μ m; **D'**, 10 μ m; **E, F**, 200 μ m.

ext2 (*dackel*, *dak*) and *extl3* (*boxer*, *box*), two additional glycosyltransferases implicated in heparan sulfate biosynthesis, show retinal axon guidance defects that phenocopy *robo2* mutants (Hutson and Chien, 2002; Lee et al., 2004). Together, these results

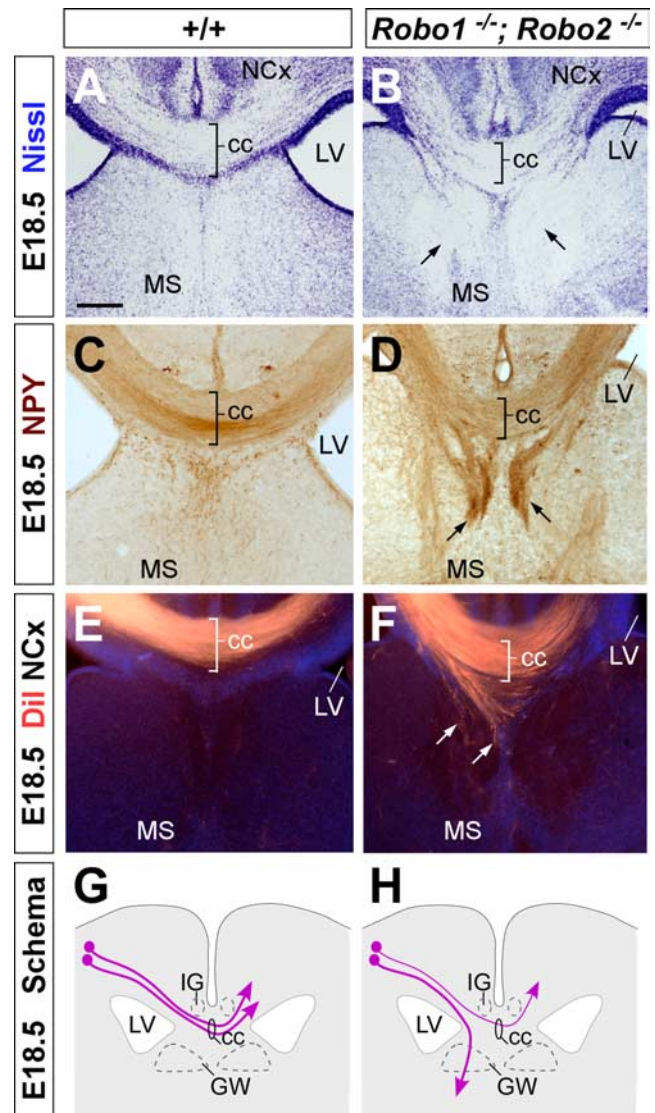


Figure 9. Abnormal development of the corpus callosum in *Robo1*; *Robo2* double-mutant mice. Coronal sections through the telencephalon of E18.5 fetuses showing Nissl stain (**A, B**) and NPY (**C, D**) immunohistochemistry in wild-type (**A, C**) and *Robo1*; *Robo2* double-mutant mice (**B, D**). **A–D**, Nissl staining and NPY immunohistochemistry demonstrates that *Robo1*; *Robo2* double-mutant mice have a small corpus callosum (cc) and that large ectopic bundles of axons form on either side of it (**B, D**, arrows). **E, F**, Coronal sections through the telencephalon of E18.5 fetuses with Dii implanted in the neocortex (NCx), showing Dii-labeled corticocortical axons extending through the corpus callosum in wild-type (**E**) and *Robo1*; *Robo2* double-mutant (**F**) mice. Note that many axons are abnormally directed ventrally before they reach the midline (**F**, arrows). **G, H**, The schemas summarize the pathways followed by corticocortical axons through the corpus callosum in wild-type (**G**) and *Robo1*; *Robo2* double-mutant (**H**) mice. MS, Medial septum; LV, lateral ventricle; GW, glial wedge; IG, indusium griseum. Scale bars: **A–F**, 200 μ m.

suggest that heparan sulfate plays a physiologically essential role in Slit/Robo-mediated retinal axon guidance at the optic chiasm.

Although heparan sulfate may function in the extracellular environment, some evidence suggests that it may also or instead function on the surface of Robo-expressing, Slit responding cells, where it may contribute to concentrate Slit protein and promote its binding to Robo receptors. In the telencephalon, thalamic neurons express the heparan sulfate proteoglycan N-syndecan (Kinnunen et al., 1999), and both corticofugal and thalamocortical axons are labeled with antibodies against heparan sulfate (J. A. Sánchez and O. Marín, unpublished observations). Thus, it

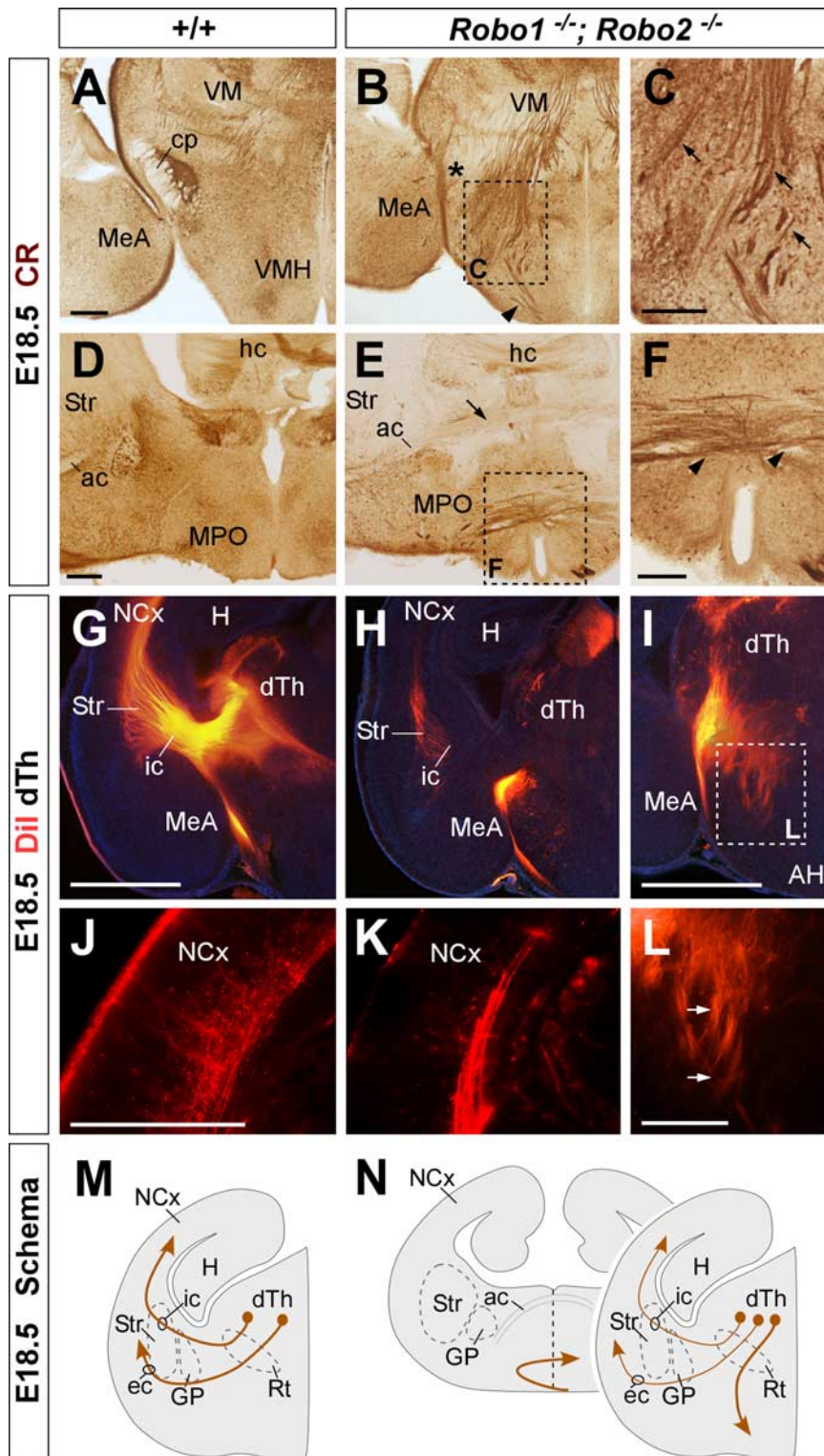


Figure 10. Thalamocortical axons follow abnormal paths in *Robo1;Robo2* double-mutant mice. **A–F**, Coronal sections through the diencephalon of E18.5 fetuses showing calretinin immunohistochemistry in wild-type (**A, D**) and *Robo1;Robo2* double-mutant mice (**B, C, E, F**). Note the abnormal invasion of thalamocortical fibers into the hypothalamus (**C**, arrows). At more rostral levels, thalamocortical axons cross the ventral midline (**F**, arrowheads) below the additional abnormal cross of corticofugal fibers (**E**, arrow). **G–I, L**, Coronal sections through the diencephalon of E18.5 embryos with Dil implanted in the dorsal thalamus (dTh), showing Dil axons abnormally entering the hypothalamus in *Robo1;Robo2* double-mutant mice (**H, I**). **J, K**, Very few thalamic axons reach the cortex in *Robo1;Robo2* double-mutant mice. **M, N**, The schemas summarize the pathways followed by thalamocortical axons in wild-type (**M**) and *Robo1;Robo2* double-mutant mice (**N**). Str, Striatum; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus; MeA, medial amygdala; cp, cerebral peduncle; ac, anterior commissure; ic, internal capsule; ec, external capsule; GP, globus pallidus; Rt, reticular thalamic nucleus; MPO, medial preoptic area; hc, hippocampal commissure; H, hippocampus; AH, anterior hypothalamus; VM, ventromedial nucleus. Scale bars: **A, B, D, E**, 300 μ m; **C, F**, 200 μ m; **G–I**, 1 mm; **J–L**, 200 μ m.

is conceivable that heparan sulfate may also contribute along with Slit/Robo signaling to the guidance of these major forebrain projections.

Concluding remarks

The present results, along with our previous work on the analysis of *Slit* mutants (Bagri et al., 2002), demonstrate that Slit/Robo interactions play a crucial role in the guidance of some of the most prominent axonal tracts in the mammalian forebrain. Through a mechanism that involves the repulsion of growing axons (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Li et al., 1999), Slits intervene in multiple aspects in the development of major connections in the mammalian forebrain. These functions appear to be mediated mostly or exclusively by Robo1 and Robo2, because the forebrain phenotype of *Robo1;Robo2* double mutants looks highly similar, and possibly identical to the *Slit1;Slit2* double-mutant phenotype. Furthermore, Robo1 and Robo2 have mostly redundant roles in this process. Future studies will aim to reveal how Robo1 and Robo2 receptors are specifically regulated in distinct forebrain axonal tracts and how these receptors may interact with other guidance cues to control their final targeting.

References

- Andrews W, Liapi A, Plachez C, Camurri L, Zhang J, Mori S, Murakami F, Parnavelas JG, Sundaresan V, Richards LJ (2006) Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. *Development* 133:2243–2252.
- Auladell C, Pérez-Sust P, Supèr H, Soriano E (2000) The early development of thalamocortical and corticothalamic projections in the mouse. *Anat Embryol* 201:169–179.
- Bagri A, Marín O, Plump AS, Mak J, Pleasure SJ, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M (2002) Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33:233–248.
- Braisted JE, Tuttle R, O'Leary DD (1999) Thalamocortical axons are influenced by chemorepellent and chemoattractant activities localized to decision points along their path. *Dev Biol* 208:430–440.
- Braisted JE, Catalano SM, Stimac R, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Shatz CJ, O'Leary DD (2000) Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J Neurosci* 20:5792–5801.
- 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.
- De Carlos JA, O'Leary DD (1992) Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J Neurosci* 12:1194–1211.

Wild-type

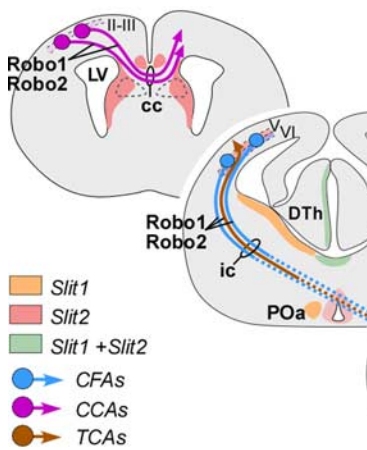
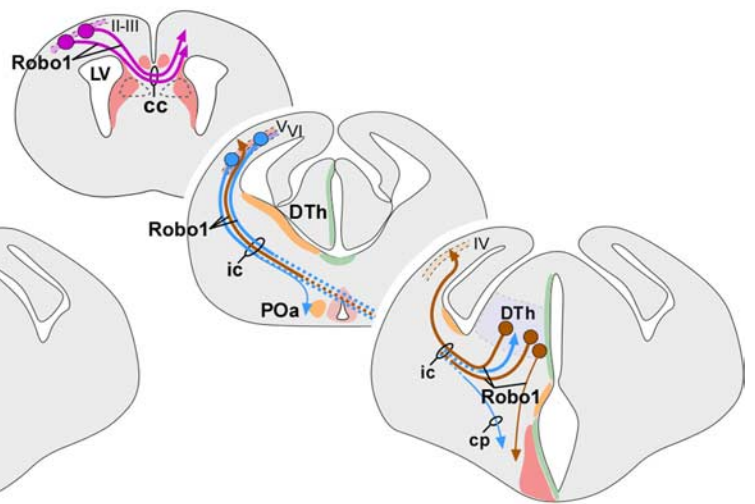
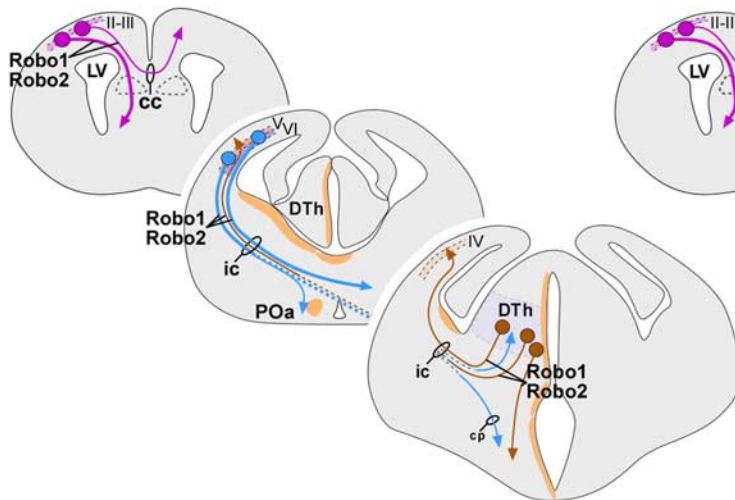
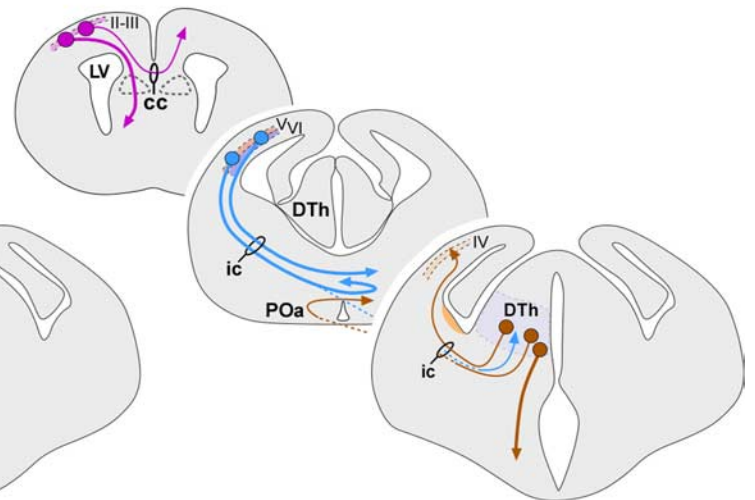
*Robo2*^{-/-}*Slit2*^{-/-}*Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{-/-} or *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-}

Figure 11. Schematic summarizing axonal defects in the Slit and Robo mutants in relation to regions of Slit action and Robo expression. Slit2 acts in ventral and ventrolateral domains, and Slit1 action is limited to medial areas. In wild-type animals, Slit2 prevents Robo-expressing axons from entering ventral regions and also prevents the axons from coursing medially. Loss of Slit1 does not have an impact on the axonal trajectories because of the continued presence of Slit2. However, loss of Slit2 allows the axons to project ventrally and medially, potentially in response to positive cues from these areas. Mice lacking Robo2 have a less severe phenotype than the one observed in *Slit2*^{-/-} because of the presence of Robo1 in those axonal tracts. Only a few corticofugal axons are misrouted from their normal route at the ventral telencephalon. Loss of Robo1 and Robo2 mimics the phenotype observed in mice lacking both Slit1 and Slit2, and allows axons to travel ventrally and medially and to approach and cross the midline. LV, Lateral ventricle; cc, corpus callosum; DTh, dorsal thalamus; ic, internal capsule; cp, cortical plate; POa, anterior preoptic area; II–VI, cortical layers.

- Dufour A, Seibt J, Passante L, Depaape V, Ciossek T, Frisen J, Kullander K, Flanagan JG, Polleux F, Vanderhaeghen P (2003) Area specificity and topography of thalamocortical projections are controlled by ephrin/Eph genes. *Neuron* 39:453–465.
- Griehammer U, Le M, Plump AS, Wang F, Tessier-Lavigne M, Martin GR (2004) SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 6:709–717.
- Hao JC, Yu TW, Fujisawa K, Culotti JG, Gengyo-Ando K, Mitani S, Moulder G, Barstead R, Tessier-Lavigne M, Bargmann CI (2001) *C. elegans* slit acts in midline, dorsal-ventral, and anterior-posterior guidance via the SAX-3/Robo receptor. *Neuron* 32:25–38.
- Hu H (2001) Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nat Neurosci* 4:695–701.
- Hutson LD, Chien CB (2002) Pathfinding and error correction by retinal axons: the role of astray/robo2. *Neuron* 33:205–217.
- Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y (2003) Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science* 302:1044–1046.

- Jones L, López-Bendito G, Gruss P, Stoykova A, Molnar Z (2002) Pax6 is required for the normal development of the forebrain axonal connections. *Development* 129:5041–5052.
- Kidd T, Bland KS, Goodman CS (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96:785–794.
- Kinnunen A, Niemi M, Kinnunen T, Kaksonen M, Nolo R, Rauvala H (1999) Heparan sulphate and HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) in the development of the thalamocortical pathway of rat brain. *Eur J Neurosci* 11:491–502.
- Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD (1997) Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90:753–762.
- Lee JS, von der Hardt S, Rusch MA, Stringer SE, Stickney HL, Talbot WS, Geisler R, Nusslein-Volhard C, Selleck SB, Chien CB, Roehl H (2004) Axon sorting in the optic tract requires HSPG synthesis by ext2 (dackel) and extl3 (boxer). *Neuron* 44:947–960.
- Leighton PA, Mitchell KJ, Goodrich LV, Lu X, Pinson K, Scherz P, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (2001) Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature* 410:174–179.

- Li HS, Chen JH, Wu W, Fagaly T, Zhou L, Yuan W, Dupuis S, Jiang ZH, Nash W, Gick C, Ornitz DM, Wu JY, Rao Y (1999) Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* 96:807–818.
- Liang Y, Annan RS, Carr SA, Popp S, Mevissen M, Margolis RK, Margolis RU (1999) Mammalian homologues of the *Drosophila* slit protein are ligands of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in brain. *J Biol Chem* 274:17885–17892.
- Long H, Sabatier C, Ma L, Plump A, Yuan W, Ornitz DM, Tamada A, Murakami F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M (2004) Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42:213–223.
- López-Bendito G, Molnár Z (2003) Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat Rev Neurosci* 4:276–289.
- López-Bendito G, Chan CH, Mallamaci A, Parnavelas J, Molnar Z (2002) Role of Emx2 in the development of the reciprocal connectivity between cortex and thalamus. *J Comp Neurol* 451:153–169.
- López-Bendito G, Cautinat A, Sánchez JA, Bielle F, Flames N, Garratt AN, Talmage DA, Role L, Charnay P, Marín O, Garel S (2006) Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for Neuregulin-1 on thalamocortical axon navigation. *Cell* 125:127–142.
- Marillat V, Cases O, Nguyen Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chédotal A (2001) Spatio-temporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* 442:130–155.
- McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1989) Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245:978–982.
- Molnár Z, Adams R, Goffinet AM, Blakemore C (1998) The role of the first postmitotic cortical cells in the development of thalamocortical innervation in the reeler mouse. *J Neurosci* 18:5746–5765.
- Métin C, Godement P (1996) The ganglionic eminence may be an intermediate target for corticofugal and thalamocortical axons. *J Neurosci* 16:3219–3235.
- Métin C, Deléglise D, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M (1997) A role for netrin-1 in the guidance of cortical efferents. *Development* 124:5063–5074.
- Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Ma L, Wang KH, Marillat V, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chédotal A (2001) Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *J Neurosci* 21:4281–4289.
- Nguyen Ba-Charvet KT, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Chédotal A (2002) Slit1 and slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* 22:5473–5480.
- Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, Mason CA, Tessier-Lavigne M (2002) Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33:219–232.
- Price DJ, Kennedy H, Dehay C, Zhou L, Mercier M, Jossin Y, Goffinet AM, Tissir F, Blakey D, Molnar Z (2006) The development of cortical connections. *Eur J Neurosci* 23:910–920.
- Rajagopalan S, Nicolas E, Vivancos V, Berger J, Dickson BJ (2000) Crossing the midline: roles and regulation of Robo receptors. *Neuron* 28:767–777.
- Richards LJ, Koester SE, Tuttle R, O'Leary DD (1997) Directed growth of early cortical axons is influenced by a chemoattractant released from an intermediate target. *J Neurosci* 17:2445–2458.
- Richards LJ, Plachez C, Ren T (2004) Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin Genet* 66:276–289.
- Ronca F, Andersen JS, Paech V, Margolis RU (2001) Characterization of Slit protein interactions with glypican-1. *J Biol Chem* 276:29141–29147.
- 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.
- Schaeren-Wiemers N, Gerfin-Moser A (1993) A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* 100:431–440.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001–1014.
- Shu T, Richards LJ (2001) Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum. *J Neurosci* 21:2749–2758.
- Shu T, Sundaresan V, McCarthy MM, Richards LJ (2003) Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline *in vivo*. *J Neurosci* 23:8176–8184.
- Simpson JH, Bland KS, Fetter RD, Goodman CS (2000) Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* 103:1019–1032.
- Sundaresan V, Mambetisaeva E, Andrews W, Annan A, Knoll B, Tear G, Bannister L (2004) Dynamic expression patterns of Robo (Robo1 and Robo2) in the developing murine central nervous system. *J Comp Neurol* 468:467–481.
- Torii M, Levitt P (2005) Dissociation of corticothalamic and thalamocortical axon targeting by an EphA7-mediated mechanism. *Neuron* 48:563–575.
- Tuttle R, Nakagawa Y, Johnson JE, O'Leary DD (1999) Defects in thalamocortical axon pathfinding correlate with altered cell domains in Mash-1-deficient mice. *Development* 126:1903–1916.
- Whitford K, Marillat V, Stein E, Goodman C, Tessier-Lavigne M, Chédotal A, Ghosh A (2002) Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron* 33:47–61.
- Yuan W, Zhou L, Chen JH, Wu JY, Rao Y, Ornitz DM (1999) The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol* 212:290–306.
- Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O, Tessier-Lavigne M (2003) Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 38:213–224.

Article 3 : La signalisation Slit/Robo dirige la migration des neurones du pont sous le contrôle des gènes *Hox*s

Les neurones formant les noyaux propres du pont constituent la principale source de fibres moussues innervant le cervelet. Au cours de leur migration tangentielle depuis les lèvres rhombiques, ces neurones se déplacent alternativement sur les axes antero-postérieur et dorso-ventral. Les mécanismes de guidage contrôlant ces choix d'orientations restent méconnus. Nous montrons ici que les facteurs de transcription à homéodomaine *Hoxa2* et *Hoxb2* participent au contrôle de l'orientation de la migration longitudinale des neurones du pont. La fonction de *Hoxa2* pourrait s'expliquer par une régulation de l'activité du système Slit/Robo :

- Nous avons décrit précisément la trajectoire des neurones du pont en montrant que ces neurones migrent en trois étapes vers la ligne médiane. Générés au niveau des lèvres rhombiques des rhombomères 6 à 8, ces neurones quittent cette région en une première phase courte de migration ventrale. Ils tournent ensuite antérieurement et progressent parallèlement à la ligne médiane en passant dorsalement par rapport au noyau du nerf facial (VII), ce jusqu'à qu'ils atteignent la racine du nerf trijumeau (V). A l'issue de cette deuxième phase de migration antero-postérieure, les neurones du pont vont à nouveau changer de direction pour entamer, dans le rhombomère 4, une dernière phase de migration dorso-ventrale vers la ligne médiane.
- Les neurones du pont en migration expriment spécifiquement une combinaison de gènes *Hox*s spécifique de leur origine axiale dans les lèvres rhombiques, dont les gènes *Hoxa2* et *Hoxb2*.
- Modifier ce « code Hox » en inactivant la fonction de *Hoxa2* et/ou *Hoxb2* affecte la migration des neurones du pont. Ces gènes semblent requis pour que ces neurones puissent se maintenir dans leur voie de migration longitudinale. En effet, chez le double mutant *Hoxa2*^{-/-} ; *Hoxb2*^{-/-}, les neurones du pont tournent prématurément vers la ligne médiane et se positionnent de part et d'autre de celle-ci dans les régions postérieures à R4.
- La délétion conditionnelle de *Hoxa2* dans les neurones du pont cause des défauts de migration similaires. Cependant, ce phénotype reste moins prononcé que chez les souris *Hoxa2*^{-/-}. Ceci suggère que *Hoxa2* est à la fois requis de façon intrinsèque et extrinsèque pour la migration de ces neurones.
- Les neurones du pont expriment Robo1 et Robo2 au cours de leur migration. Le noyau du nerf facial exprime spécifiquement Slit2 et Slit3, qui sont comme Slit1 retrouvés dans la

plaque du plancher et les lèvres rhombiques.

- En l'absence du facteur de transcription *Hoxa2*, le niveau d'expression du messager de *Robo2* diminue fortement dans les neurones du pont. Par des expériences d'immunoprécipitation sur chromatine, nous avons pu confirmer que ce facteur de transcription possède la capacité de se lier directement au promoteur du gène *robo2*. Par ailleurs, l'expression des messagers de *Slit2* et *Slit3* est affaiblie dans les neurones du nerf facial chez les souris *Hoxa2*^{-/-}. Les défauts de migration observés peuvent donc être la conséquence d'une perturbation de l'activité du système *Slit/Robo in vivo*.
- L'analyse des souris déficientes *Slit1/Slit2* et *Robo1/Robo2* montre que ces partenaires sont bien essentiels au maintien de la migration longitudinale des neurones du pont. Ces mutants présentent en effet des défauts de guidage similaires à ceux qui sont observés chez les souris *Hoxa2*^{-/-} et *Hoxa2*^{-/-} ; *Hoxb2*^{-/-}. En revanche, ces neurones migrent normalement lors de la délétion d'un des gènes *slit1*, *slit2*, *robo1* ou *robo2*.
- Enfin, l'absence du nerf facial chez les souris déficientes en *Phox2b* entraîne un phénotype comparable, ce qui vient confirmer l'importance de ce noyau lors du guidage des neurones du pont en migration.

Cette étude dévoile donc une nouvelle fonction tardive des gènes *Hoxs*, en révélant qu'ils interviennent dans le guidage de la migration neuronale en régulant l'expression des gènes *slits* et *robos*.

***Hox* paralogue group 2 genes control the migration of mouse pontine neurons
through Slit-Robo signaling**

**Marc J. Geisen^{1*}, Thomas Di Meglio^{2*}, Massimo Pasqualetti^{1,#}, Sebastien Ducret¹, Jean-
François Brunet³, Alain Chedotal², and Filippo M. Rijli^{1£}**

** These authors have equally contributed to this work*

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, UMR
7104, BP 10142, CU de Strasbourg, 67404 Illkirch Cedex, France

² CNRS UMR 7102 Université Paris 6, Batiment B, Case 12, 9 Quai Saint Bernard, 75005 Paris
France

³ CNRS UMR8542, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France

[#]Present address : Unità di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Pisa, Via G.
Carducci 13, Pisa, Italy

Running title: *Hox* dependent neuronal migration via Slit-Robo signaling

£ To whom correspondence should be addressed : rijli@igbmc.fr

Abstract

The pontine neurons (PN) represent a major source of mossy fiber projections to the cerebellum. During mouse hindbrain development, PN migrate tangentially and sequentially along both the anteroposterior (AP) and dorsoventral (DV) axes. Unlike DV migration, little is known about the molecular mechanisms guiding PN migration along the AP axis. Here, we show that *Hoxa2* and *Hoxb2* are required both intrinsically and extrinsically to maintain normal AP migration of PN, by preventing their premature DV migration. Moreover, the migration defects observed in *Hoxa2* and *Hoxb2* mutant mice are phenocopied in compound *Robo1/Robo2*, *Slit1/Slit2*, and *Robo2/Slit2* knockout animals, indicating that these guidance molecules may act downstream of *Hox* genes to control PN migration. Indeed, using chromatin immunoprecipitation assays we further demonstrate that *Robo2* is a direct target of *Hoxa2* *in vivo* and that maintenance of *Robo* and *Slit* expression is impaired in *Hoxa2* mutant mice. Lastly, the analysis of *Phox2b* deficient mice indicates that the facial motor nucleus is a major *Slit* signaling source required to prevent premature ventral migration of PN. These findings provide novel insights into the intrinsic and extrinsic molecular determinants controlling neuronal migration along the AP axis.

Introduction

In the developing central nervous system (CNS), neurons migrate sometimes over long distances from their birthplace to the sites of their final location, where they condense in specific nuclei. As neuronal function depends upon precise connectivity with their targets, the final positioning of migrating neurons is critical to the building of ordered connectivity between pre- and post-synaptic partners. In many brain regions neurons migrate in a tangential direction, orthogonal to the radial axis and independently of radial glia, resulting in mixing of cells originated from

distinct ventricular regions (Marin and Rubenstein 2003). Mounting evidence suggests that tangentially migrating neurons are guided during their journey by the same set of attractive and repulsive guidance cues that regulate axonal pathfinding and topographical mapping (Wong et al. 2002). However, little is still known about how exposure of migrating neurons to several simultaneous extrinsic inputs along the orthogonal axes of the brain may be integrated at the transcriptional level and in turn translated into directional migratory responses specific for each neuronal population.

In the mouse hindbrain, the precerebellar system is a suitable model to study the molecular mechanisms controlling long distance tangential migration (Hatten 1999). Precerebellar nuclei are essential for coordinated motor activity and provide the principal input to the cerebellum (Sotelo 2004). They convey information to the cerebellum through the climbing and mossy fiber projection systems. While the only source of climbing fibers is the inferior olivary nucleus (ION), mossy fibers have multiple origins such as the lateral reticular (LRN) and external cuneate (ECN) nuclei in the posterior hindbrain, and the pontine gray (PGN) and reticulotegmental (RTN) nuclei, collectively referred thereafter as pontine neurons (PN), in the anteroventral hindbrain (Altman and Bayer 1997).

The early patterning of the mouse hindbrain along the AP axis is characterised by a transient segmentation process into distinct morphological segments called rhombomeres, resulting in spatial segregation of the neuroepithelium contributing to each segment (Lumsden and Krumlauf 1996). Distinct precerebellar neuronal populations are contributed by rhombomeric portions of the rhombic lip (rl), a stripe of neuroepithelium that arises dorsally at the interface with the roof plate and runs throughout the rostrocaudal extent of the hindbrain, giving rise to spatiotemporally defined sequences of migratory populations (Marin and Puelles 1995; Wingate and Hatten 1999; Rodriguez and Dymecki 2000; Wingate 2001; Machold and Fishell 2005;

Wang et al. 2005; Farago et al. 2006). Indeed, r1 rhombic lip derivatives specifically contribute to the external granular layer (EGL) of the cerebellum (Wingate and Hatten 1999), whereas a recent fate mapping study subdivided the mouse r2-r8 rhombic lip into two distinct domains: the auditory lip, extending from r2 to r5 and giving rise to the brainstem cochlear nuclear complex; and the precerebellar lip, that generates the precerebellar nuclei, posteriorly to r5 (Farago et al. 2006). Mossy fiber projection neurons migrate along two distinct subpial streams: the posterior extramural stream, whose neurons contribute to the LRN and the ECN, and the anterior extramural stream that is formed by the PN contributing to the PGN and the RTN (Altman and Bayer 1997). The latter undergo a long distance rostral migration through several inter-rhombomeric domains before turning ventrally to reach a stereotypic anteroventral position in the mature brain stem. The ventral pathway of PN migration was shown to involve Dcc/Netrin-1-mediated chemoattraction (Serafini et al. 1996; Fazeli et al. 1997; Yee et al. 1999) and the Slit receptor Robo3 (Marillat et al. 2004).

Here, we studied the intrinsic and extrinsic molecular mechanisms regulating the directionality of migration of PN along the rostral pathway. During embryo development, the transcriptional readout of AP positional information is provided by the *Hox* gene family of transcription factors (Lumsden and Krumlauf 1996). In the developing hindbrain, *Hox* genes have been involved in providing segmental identity to rhombomeres and rostrocaudal patterning information to developing neurons (Lumsden and Krumlauf 1996; Rijli et al. 1998). More recently, it has been shown that *Hox* gene expression is maintained up to late stages of development in specific neuronal sub-populations in the hindbrain and spinal cord where they may be important for the establishment of topographically organised sensory and motor circuits (Davenne et al. 1999; Arenkiel et al. 2004; Gaufo et al. 2004; Dasen et al. 2005; Oury et al. 2006). However, the potential role of *Hox* genes in orienting directional neuronal migration

through regulation of guidance molecules remains largely unknown.

Herein, we found that the paralogue group 2 (PG2) *Hox* genes, *Hoxa2* and *Hoxb2*, are required to maintain normal migration of PN along the rostral pathway. In *Hoxa2* and *Hoxb2* mutants, PN prematurely migrated ventrally settling at ectopic posterior locations. Interestingly, the PN migratory defects observed in PG2 *Hox* mutants phenocopied those found in *Robo1;Robo2*, *Slit1;Slit2*, and *Robo2;Slit2* compound mutants. Furthermore, in PG2 *Hox* mutants the expression levels of *Robo2* and *Slit2* were decreased and chromatin immunoprecipitation assays demonstrated the direct binding of *Hoxa2* on the *Robo2* locus. In addition, we identified the facial motor nucleus (FMN), that is located in the ventral posterior hindbrain, as an important source of Slit ligands for Robo receptor expressing PN. This is supported by the finding that in the *Phox2b* knockout mice, that completely lack the FMN, the PN undergo the same ectopic and premature ventral migratory defects as observed in *Hox* PG2, *Robo1;Robo2*, *Slit1;Slit2*, or *Robo2;Slit2* compound mutants. Altogether, our data provide important novel insights into the intrinsic and extrinsic molecular determinants involved in migration of PN neurons along the AP axis.

Results

Inter-rhombomeric migration and Hox gene expression of migrating pontine neurons

Tangentially migrating PN originate in the posterior rhombic lip between E13.5 and E17.5 (Wang et al. 2005). They undertake a ventrorostral migration until they reach a final position ventrally in the anterior brain stem (Farago et al. 2006). During their migration, PN navigate across distinct rhombomere derived territories and express several molecular markers (Morales and Hatten 2006), including the homeobox containing gene *Barhl1* (Li et al. 2004). The migratory pathway

of *Barhl1*⁺ PN neurons can be divided into three distinct phases (Fig. 1A,B,D). Firstly, PN undertake a short ventral migration upon leaving the r6-r8 rhombic lip (phase 1). In the next step (phase 2), PN turn rostrally parallel to the AP axis and travel through r5, then pass in between the vestibulocochlear (VIIIth, dorsally) and the facial (VIIth, ventrally) nerve roots (Nichols and Bruce 2006), and continue migrating until they reach the caudal aspect of the trigeminal (Vth) nerve root. There, PN make an abrupt change of direction and undertake a final ventral migration (phase 3) fanning out within the r4 derived domain and abutting the r3- and r5-derived territories until they settle near the floor plate (Farago et al. 2006).

Such a stereotyped rostral migratory pathway suggested that, in addition to DV positional cues, PN may express and/or respond to molecular cues along the AP axis, such as the *Hox* gene products. Indeed, in situ hybridisation analysis using specific *Hox* antisense probes revealed that migrating PN expressed a *Hox* program characteristic of an r6-r8 axial origin, namely PG2-5 *Hox* genes. Specifically, transcripts for *Hoxa2*, *Hoxb2*, *Hoxa3*, *Hoxb3*, *Hoxb4*, *Hoxd4*, and *Hoxb5* were expressed in PN throughout their migration and in the settling pontine nuclei (Fig. 1E-N; and data not shown; see below). Such expression patterns suggested that PN may be endowed with molecular information as to their origin and relative position along the AP axis throughout their migration.

Hoxa2 and Hoxb2 are required for pontine neuron migration along the anteroposterior axis

To address the potential involvement of *Hox* genes in PN rostral migration, we focused on the paralogue group 2 genes, *Hoxa2* and *Hoxb2*. These genes perform important roles in rostral hindbrain patterning (Barrow and Capecchi 1996; Gavalas et al. 1997; Davenne et al. 1999; Barrow et al. 2000; Gavalas et al. 2003; Oury et al. 2006), and their expression is maintained throughout migration, nucleogenesis, and establishment of connectivity to cerebellum of PN

(both RTN and PGN) up to postnatal stages (Fig. 1F-G',M-N; and data not shown).

In *Hoxa2* heterozygous mutants (Rijli et al. 1993), PN displayed a normal migratory behaviour as assessed by whole mount in situ hybridisation on E14.5 and E15.5 hindbrains with antisense probes for known markers of migrating PN such as *Barhl1* (Li et al. 2004), *Pax6* and *Tag1* (Engelkamp et al. 1999; Backer et al. 2002). In contrast, in *Hoxa2*^{-/-} homozygous mutant mice we observed defects of PN navigation along the rostral pathway (Fig. 2D-I). While migratory abnormalities could be observed in all *Hoxa2*^{-/-} mutants (n=15), they were variably penetrant. In some cases (n=10), small cohorts of neurons left prematurely the stream and migrated ventrally towards the midline (Fig. 2D-F). Ectopic neurons expressed *Barhl1*, *Pax6*, and *Tag1* and often condensed in small ectopic nuclear formations close to the midline, posterior to the normal location of pontine nuclei (Fig. 2D,E; and data not shown). In these mutants, only a subset of PN migrated ectopically whereas the bulk of the stream maintained a caudorostral migratory path. However, in a number of mutant fetuses (n=5) we observed more severe defects in which the majority of PN undertook a premature ventral migration (Fig. 2G,H; and data not shown). It is also noteworthy that the abnormal migratory phenotypes were often asymmetrically distributed among the two sides (Fig. 2H,I; and data not shown), indicating stochastic compensation for the loss of *Hoxa2* along the AP migratory path of PN. This may be resulting from partial functional redundancy with other *Hox* genes expressed in migrating PN (Fig. 1). Indeed, premature ventral migrations of PN could also be observed in some *Hoxb2*^{-/-} mutant specimen (Fig. 2J-L; n=2 out of 6), indicating some degree of functional redundancy among *Hox* PG2 genes.

In summary, these results indicated that *Hoxa2*, and to a lesser extent *Hoxb2*, may regulate the response of PN to environmental cues to precisely maintain their rostral migratory

route from r6-r8 towards r4, thus ultimately controlling the final location of pontine nuclei along the AP axis.

Autonomous and non-autonomous roles of Hoxa2 in regulating rostral migration of pontine neurons

Hox PG2 may be intrinsically required in PN throughout migration. Alternatively, or in addition, they may be required non-autonomously to pattern the environment through which PN migrate and to which PN respond in order to direct their rostral migration.

To address this question, we focused on *Hoxa2* function. To achieve *Hoxa2* inactivation in PN, we mated a mouse carrying a *Hoxa2* floxed allele, *Hoxa2^{fllox}* (Ren et al. 2002) with the *Wnt1::Cre* transgenic mouse line that allows Cre-mediated deletion in rhombic lip progenitors (Danielian et al. 1998; Rodriguez and Dymecki 2000; Farago et al. 2006; Nichols and Bruce 2006). In whole mount brains from E14.5 *Wnt1::Cre;Hoxa2^{fllox/fllox}* fetuses we found scattered ectopic neurons that appeared to migrate prematurely from the PN stream (Fig. 3E-H). At E15.5, the ectopic neurons had reached the ventral midline as assessed by *Tag1* expression (Fig. 3G). These results supported an intrinsic requirement of *Hoxa2* expression in PN to maintain rostral migration (see also below). However, the phenotype was less pronounced than in *Hoxa2* null mutants (compare Fig. 3E-H with 2D-I; and data not shown). Such a difference may not be explained by an incomplete deletion of *Hoxa2* in PN precursors, as we have previously shown that the *Wnt1::Cre* driver is able to induce a complete excision of *Hoxa2* (Santagati et al. 2005). Thus, these results may rather indicate that *Hoxa2* is required both in a cell autonomous and non-autonomous manner to regulate the response of PN to guidance cues during their rostral migration (see below; see also Fig. 4).

Hoxa2 dependent maintenance of Robo2 and Slit2 expression during PN migration

We next determined if the PN migration defects detected in *Hoxa2*^{-/-} mutants could be explained by a perturbed expression of ligands or receptors known to control their migration. Chemoattraction of tangentially migrating PN along the DV axis involves the Netrin-1 ligand/Dcc receptor guidance system (Serafini et al. 1996; Fazeli et al. 1997; Yee et al. 1999; Alcantara et al. 2000). Netrin-1 is secreted by the floor plate whereas its receptor Dcc is expressed in PN throughout their migration (Fig. 4A; and data not shown). In *Hoxa2*^{-/-} mutant brains, we found that *Netrin-1* expression in the floor plate was unaffected (data not shown). *Dcc* was also normally detected both in the PN stream and the ectopically migrating neurons, as shown both by in situ hybridisation and antibody staining (Fig. 4E,S; and data not shown).

It is noteworthy that PN are not immediately attracted towards the floor plate, but undertake their long rostral migration before finally turning ventrally towards the floor plate. This suggests that, in wild type mice, the Netrin-1/Dcc attractive signalling system may be antagonized during the rostral phase of PN migration (phase 2; Fig. 1D). The chemotropic molecules of the Slit family and their Robo receptors are major repellents for developing neurons and have been shown to antagonize Netrin-1 activity on axonal growth in a dose-dependent manner (Stein and Tessier-Lavigne 2001; Causeret et al. 2002). Thus, we first investigated the spatial distribution of the *Robo1-3* receptors and *Slit1-3* ligands during PN migration. In addition to *Robo3/Rig1*, thereafter referred to as *Robo3*, (Marillat et al. 2004), *Robo1* and *Robo2* were also found to be expressed during PN migration as shown by *Robo2* in situ hybridisation and by anti-*Robo1* whole-mount immunostaining on E14.5 hindbrains (Fig. 4K,Q; Fig. S1A,B). The presence of Robo receptors in migrating PN was further supported by the binding on whole mount hindbrains of a Slit2 fragment genetically fused to alkaline phosphatase (AP) (Fouquet et al. 2007) (Fig. S1C). *Slit1-3* were all expressed in the floor plate and rhombic lip, though not in PN

(Fig. 4C,D,U; Fig. S1D,E; and data not shown). Interestingly, from E13 *Slit2* and *Slit3*, but not *Slit1*, were also expressed in neurons of the facial motor nucleus (FMN) (Fig. 4C,U; Fig. S1D; and data not shown; see below).

We next asked whether *Hoxa2* may regulate *Robo* and/or *Slit* expression during PN migration. In E14.5 *Hoxa2*^{-/-} fetuses, *Robo3* and *Dcc* were expressed at normal levels in migrating PN (Fig. 4E,F,S; and data not shown). In contrast, *Robo2* transcript levels were significantly lower in migrating PN of *Hoxa2*^{-/-} single and *Hoxa2*^{-/-};*Hoxb2*^{-/-} compound null mutants than in control mice (Fig. 4N,T). Interestingly, downregulation of *Robo2* expression was particularly evident in ventrally migrating ectopic cells which nonetheless maintained normal expression of *Dcc*, *Robo3*, and *Barhl1* as assessed by in situ hybridisation on adjacent sections in both single *Hoxa2*^{-/-} and compound *Hoxa2*^{-/-};*Hoxb2*^{-/-} null mutants (compare Fig. 4L,M,N and 4R,S,T). Moreover, we found a notable downregulation of *Slit2* expression in the FMN of *Hoxa2*^{-/-} mutants (n=6), whereas normal *Slit2* expression levels were detected in rhombic lip and floor plate (compare Fig. 4C,D with 4G,H; and data not shown).

Thus, the PN migratory defects observed in the absence of PG2 *Hox* function may be mediated, at least partially, through decreased Slit-Robo signalling due to defective maintenance of *Robo2* and *Slit2* sustained expression during PN migration along the AP axis.

Slit-Robo mediated signalling is required to maintain normal rostral PN migration

In *Robo3* deficient mice, PN can still migrate along the rostral pathway (phase 2) but are unable to undergo their final ventral migration (phase 3) to reach the floor plate (Fig. S2I; Marillat et al. 2004). To address the potential involvement of *Robo1-2* and their ligand *Slit1-2* in PN migration, we next analysed single and compound knockout mice. None of the single or compound heterozygous mutants showed significant PN migratory abnormalities (Fig. 5A,B; Fig. S2A-E).

In contrast, similar migration defects of PN were observed at E15.5 in all *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (n=19) and *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* (n=18) compound mutant mice, following whole-mount labelling with antisense *Barhl1* or *Robo3* riboprobes or immunostaining with anti-Robo3 (Fig. 5E,F,I,J; Fig. S2F,G; and data not shown). Although PN normally left the rhombic lip (phase 1), during phase 2 cohorts of PN left the stream and prematurely migrated ventrally, condensing in small ectopic clusters adjacent to the midline. The leading processes of *Robo3* expressing PN neurons were still oriented toward the floor plate and crossed it normally (data not shown). Moreover, DiI tracing performed on E18-P0 mutants showed that PN axon projections to the cerebellum was normal (data not shown), thereby suggesting that migration, but not axon guidance, was selectively affected in these mutants. The ectopic nuclei expressed PN markers including *Barhl1*, *Pax6*, *Robo3*, and *Tag1* and were observed at least until E17.5 (Fig. 5E,F,I,J; Fig. S2F,G; and data not shown), as double knockouts were not viable and died a few hours after birth. The ectopic neurons were also immunoreactive for *Dcc* (data not shown). However, many PN still reached a normal location in ventral r4 (Fig. 5E,I,J). Such phenotypes were fully penetrant although the size and position of the ectopic PN clusters varied between mutant embryos, and brain stem side (Fig. 5; Fig. S2F,G). Such PN migratory defects strikingly phenocopied the abnormalities observed in *Hox* PG2 knockout animals (compare Fig. 5E,F,I,J with Fig. 2D,E,G,H). Interestingly, ectopic PN neurons were also observed in compound *Robo2^{-/-};Slit2^{-/-}* fetuses (data not shown), providing genetic evidence supporting their interaction in migrating PN neurons. This latter result further supports the idea that the abnormal neuronal migration observed in *Hoxa2* knockout mice may be at least partly due to the simultaneous reduction of both Robo2 and Slit2 levels (Fig. 4), further supporting the intrinsic and extrinsic requirements of *Hoxa2* in regulating rostral PN migration.

In summary, Robo1-2 and Slit1-2 molecules control in a redundant manner the horizontal, rostrally oriented, migration of PN (phase 2), similar to *Hox* PG2 genes (summary in Fig. 5M).

However, as Slits are expressed in the floor plate throughout the AP extent of the hindbrain the lack of expression at this location was unlikely to explain the rostrocaudal specificity of the migration defects.

The facial motor nucleus prevents premature ventral PN migration

The facial motor nucleus (FMN), which is located in ventral r6, expresses high levels of *Slit2*, and to a lesser extent of *Slit3* (Fig. 4C, Fig. S1D). Double immunostaining for Islet-1 and Robo3 (Fig. 4V) further revealed that the rostral turn between phase 1 and 2 of PN migration coincides with the AP level of the FMN, and that PN initiate their final movement toward the floor plate (phase 3) only after they have migrated over the FMN (Fig. 4U-W). These observations, together with the results of the Slit knockouts and the reduced expression of *Slit2* in the FMN of *Hoxa2* deficient mice, strongly suggested that the FMN may play a major role in maintaining normal horizontal migration of PN through expression of Slits.

To further support the potential involvement of the FMN in PN horizontal migration, we analysed a mouse mutant devoid of cranial branchiomotor nuclei. The paired homeodomain containing *Phox2b* gene is required for the generation of all branchiomotor neurons (Pattyn et al. 2000). *Phox2b* inactivation resulted in the lack of all cranial branchiomotor nuclei, including the absence of the FMN as confirmed by the lack of *Islet1* and *Slit2* staining on whole-mount E14.5 *Phox2b*^{-/-} specimen (Fig. 5L; Pattyn et al. 2000; and data not shown). In contrast, *Slit2* was normally expressed in the rhombic lip and floor plate of *Phox2b*^{-/-} mutants (Fig. 5L; and data not shown). In E14.5 *Phox2b*^{-/-} embryos, cohorts of PN prematurely migrated ventrally and generated small supernumerary nuclei in ectopic posterior locations (Fig. 5G,H; Fig. S2H; n=4) as in *Hox* PG2, *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-} and *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{-/-} mutant mice (compare Figs. 2,5).

Overall, these results strongly indicated that the FMN is an important extrinsic source of

Slit signaling for rostrally migrating PN to prevent their premature ventral migration (summary model in Fig. 5N).

Robo2 is a direct target of Hoxa2

In *Drosophila* embryo, *Robo2* expression in the mesoderm is likely to be controlled by Hox cofactor genes such as *homothorax* (Kraut and Zinn 2004). In addition, a putative *Hox* binding site has been described in the *Drosophila Robo2* locus although evidence of direct regulation is lacking (Kraut and Zinn 2004). To investigate whether Hox PG2 factors may directly regulate some aspects of the Slit-Robo signalling system in the mouse, we tested the ability of *Hoxa2* to bind the *Robo2* regulatory genomic region *in vivo*. As Hox proteins preferentially bind their target genes through heterodimerisation with Pbx cofactors (Samad et al. 2004; Pearson et al. 2005), we screened *in silico* about 500 kb of genomic sequence containing the entire *Robo2* locus for the presence of potential NGATNNATNN Pbx/Hox consensus binding sites (Popperl et al. 1995; Jacobs et al. 1999; Ferretti et al. 2000; Tumpel et al. 2007). We only considered potential sites that were embedded within DNA stretches, ranging from 150 to 500 base pairs, displaying more than 90% nucleotide conservation in mammals and other vertebrates (Fig. 6B; and data not shown). By applying such constraints, we selected four putative Pbx/Hox binding sites located within 10 kb upstream the *Robo2* transcription start site, as well as within the first and second introns (Fig. 6A,B; and data not shown).

To test the potential of *Hoxa2* to bind *Robo2 in vivo*, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis (Orlando et al. 1997) on these four selected sites from P19 teratocarcinoma cells, a suitable cell culture system to study Hox regulated targets (e.g. Samad et al. 2004). Indeed, P19 cells expressed significant levels of *Robo2* and *Hoxa2*, as detected by RT-PCR (Fig. 6C,D). To perform ChIP on putative *Hoxa2* binding sites we generated a specific

polyclonal antibody raised against a unique peptide of the *Hoxa2* protein (see experimental procedures). Non-quantitative PCR amplification of DNA fragments containing the four putative binding sites was carried out on anti-*Hoxa2* immunoprecipitated chromatin. As shown in Fig. 6F, the immunoprecipitated chromatin showed a substantial enrichment selectively for the sequence including the site located in the second intron. No enrichment was detected for the remaining sites, as well as for the control *Gapdh* gene (Fig. 6H; and data not shown). To further support these data, we carried out real-time quantitative PCR (qPCR) assays on immunoprecipitated chromatin with the anti-*Hoxa2* antibody (see experimental procedures). A strong enrichment of the fragment containing the putative Pbx/Hox binding site in the second intron was confirmed, as compared to controls (Fig. 6G).

Altogether, these results demonstrated that *Hoxa2* can directly bind *Robo2* genomic sequences *in vivo* and, together with the results in knockout animals, strongly suggested that *Hoxa2* may directly regulate sustained *Robo2* expression during PN migration.

Discussion

Hox dependent control of pontine neuron migration along the AP axis

The LRN, ECN, RTN, and PGN constitute the major sources of cerebellar mossy fibers (reviewed in Sotelo 2004). These nuclei originate from the same stripe of rhombic lip neuroepithelium in the posterior hindbrain and their generation periods partially overlap (Pierce 1966; de Diego et al. 2002; Wang et al. 2005). Neurons of these nuclei also express a similar set of transcription factors before leaving the rhombic lip, including *Wnt1*, *Pax6*, and *Math1* (Landsberg et al. 2005), and during their migration and settling, such as *Pax6* and *Barhl1*

(Engelkamp et al. 1999; Li et al. 2004). Expression of such transcription factors may provide cells with information about their specification as mossy-fiber precerebellar neurons and/or to acquire a general migratory behaviour upon exiting the rhombic lip. Accordingly, precerebellar neurons migrate abnormally in *Pax6* and *Barhl1* knockout mice (Engelkamp et al. 1999; Li et al. 2004). Yet, neurons contributing to distinct nuclei migrate following specific pathways and settle at stereotypic AP and DV positional coordinates in the brain stem. Thus, other sets of transcription factors must regulate the responsiveness of migrating precerebellar neurons to environmental guidance cues and drive their distinct migratory routes.

Hox genes are prime candidates to regulate the directionality of cell migration along the AP axis, although so far little evidence has been available in the mammalian central nervous system. We found that PN contributing to RTN and PGN expressed PG2-5 *Hox* genes throughout their AP migration and settling, thus expressing a code characteristic of their axial origin posterior to r5. Segmental specification and the *Hox* expression program of precerebellar neurons may select which migratory direction to take upon leaving the rhombic lip. In *C. elegans*, the rostral or caudal migratory choices of the QR or QL neuroblasts are regulated by the expression of the *lin-39* and *mab-5* *Hox* genes, respectively (Harris et al. 1996). In the chick embryo, overexpression of *Hoxa2* in the r1 rhombic lip, normally devoid of *Hox* expression, induced neuronal derivatives to migrate ventrally instead of rostrally, thereby adopting a migratory route reminiscent of more posterior rhombic lip derivatives (Eddison et al. 2004). Here, we show that mouse PG2 *Hox* genes are involved in the maintenance of the rostral migration of PN by preventing premature ventral migration and settling of PN at posterior locations. Similarly, specific *Hox* programs might control the directionality of migration of other precerebellar nuclei along the AP axis. Analysis of the *Hox* specific codes of all precerebellar nuclei will be required to support such an hypothesis.

An interesting finding is the variability in the penetrance and/or severity of the migratory phenotypes in *Hoxa2* or *Hoxb2* mutants. In *Hoxa2* mutants, the fraction of PN displaying migration errors varied both in spatial distribution and number among individuals, while the bulk of PN followed a normal rostral migration pathway (Fig. 2). We also often observed asymmetric phenotypes between the two sides of the same brain stem. Furthermore, in *Hoxb2* mutants only one third of the specimen displayed an abnormal phenotype. On the one hand, such differences in phenotypes indicate locally random variations of threshold levels of guidance cues and/or of responses of PN in mutants. On the other hand, the limited extent of the abnormal migratory phenotype indicates that such a molecular guidance system is quite robust and buffered against a certain degree of variation, such as loss of function of one or two *Hox* genes. In fact, in both single and double PG2 *Hox* mutants the bulk of PN migrated normally. Thus, the loss of PG2 *Hox* function may be stochastically compensated by other members of the *Hox* family during PN migration through inter-rhombomeric domains.

In a strict interpretation of the ‘posterior prevalence’ model of Hox function (Duboule and Morata 1994), only the most ‘posterior’ (i.e. 5’ located in the cluster) PG *Hox* gene expressed, i.e. PG5, would be expected to select the migratory behaviour of PN. The results of PG2 *Hox* gene inactivations indicated that such a strict model is unlikely to be operating in migrating PN. Rather, a partially quantitative aspect may be added, in which local guidance responses of PN may also rely on overall Hox protein distribution and/or levels. Alternatively, a ‘dynamic’ posterior prevalence model might be at work in which the preponderant role of PG5 to PG2 may be sequentially switched while PN are progressing rostrally across inter-rhombomeric domains. The program of *Hox* gene expression in migrating neurons may continuously integrate extrinsic segment-specific cues with intrinsic regulation of relevant target gene expression, instructing guidance information to PN about the progression of their positional coordinates along the AP

axis. Discriminating between such possibilities will need to await for the analysis of PN migration in single and compound knockouts for PG3-5 *Hox* genes.

Loss of Hox paralogue group 2 gene function does not result in a homeotic change of pontine neuron identity

It is unlikely that the migratory phenotype observed in *Hoxa2* or *Hoxb2* mutants could result from a homeotic change of PN identity towards neuronal identities normally generated at other axial levels of the rhombic lip. In single and compound PG2 *Hox* deficient mice, we did not find any change of the molecular signature of the posterior rhombic lip neuroepithelium including expression of *Wnt1*, *Pax6*, and *Math1* (data not shown). In addition, in *Hox* PG2 mutants PN were always normally starting their rostral migration, further suggesting that they have been initially correctly specified as pontine neuron precursors. Moreover, based on their pattern of tangential migration, behavior at the midline, and final position along the DV axis it is unlikely that the ectopic neurons observed in PG2 *Hox* mutants may have acquired ectopic cochlear, LRN, ECN, or IO neuronal identities (Fig. 2; and data not shown). An alternative possibility is that the loss of PG2 *Hox* function might result in partial r5-r6 to r4 transformation, so that ectopic PN would shorten their rostral migration and ‘normally’ settle in an ectopic r4-like territory. However, no molecular or morphological evidence from the present or previous studies of *Hoxa2* and/or *Hoxb2* mutant mice may support such an interpretation (Barrow and Capecchi 1996; Gavalas et al. 1997; Davenne et al. 1999; Barrow et al. 2000; Oury et al. 2006).

Autonomous and non-autonomous requirements of PG2 Hox genes to regulate responsiveness of migrating pontine neurons to guidance cues

We show that the integrity of the *Hox* expression program of PN during migration is required to

regulate their responsiveness to guidance cues and that PG2 *Hox* genes are important components of such a molecular guidance system. Specifically, the analysis of *Hoxa2* knockout animals supported that *Hoxa2* is required both intrinsically in PN and extrinsically, to define a local environment permissive to their rostral migration. This assumption is based on the following observations: i) *Hoxa2* is expressed throughout migration and settling of PN (Fig. 1); ii) in *Hoxa2* mutants, early steps in migration appear unaffected; this suggests that migration itself, rather than an early event such as the generation of precursors fated to form the pontine nucleus, is being affected; iii) the inactivation of *Hoxa2* in *Wnt1*⁺ precerebellar precursors resulted in migration errors of PN (Fig. 3), although at a lower penetrance and severity than in the null mutants, suggesting that *Hoxa2* may be additionally required to pattern the environment through which PN migrate; and iv) in *Hoxa2* mutants the expression of *Robo2* in migrating PN and *Slit2* in FMN are downregulated and knockout studies showed that expression of such molecules is required for PN guidance (Figs. 4,5) (see below).

Thus, the PN migratory phenotype observed in *Hoxa2*^{-/-} mutants is likely to result from an impairment of *Hoxa2* function both in migrating neurons and in the local environment through which PN migrate.

Maintenance of PN migration along the AP pathway requires Slit-Robo signaling

Little is known about how signaling mediated by distinct guidance molecules distributed along the DV and AP axis is integrated in PN during their tangential migration. Our data suggest that specific molecules control PN migration behavior at precisely defined choice points and that Slit/Robo signaling plays a key role in this process.

Although numerous studies have involved Slit-Robo ligand-receptor interaction in axon guidance and branching (Shu and Richards 2001; Bagri et al. 2002; Plump et al. 2002; Wong et

al. 2002; Long et al. 2004; Nguyen-Ba-Charvet et al. 2004; Fouquet et al. 2007; Lopez-Bendito et al. 2007; Ma and Tessier-Lavigne 2007), much less is known about their involvement in neuronal migration, in particular *in vivo* (Marin et al. 2003; Nguyen-Ba-Charvet et al. 2004; Andrews et al. 2007; Guan et al. 2007). For instance, it was previously shown in mice that the Robo3 receptor is required for the last phase of ventral PN migration (Fig. S2; Marillat et al. 2004). In mice lacking *Robo3*, PN still leave the rhombic lip and migrate rostrally, but are unable to turn towards the ventral midline in r4, despite normal expression of *Netrin-1* and *Dcc* (Fig. S2; Marillat et al. 2004; and data not shown). Robo3 was proposed to function as a negative regulator of Slit responsiveness, somehow repressing Slit repulsive activity from the floor plate and thus interfering with Robo1/Robo2 receptor activation (Sabatier et al. 2004). *Robo3* is co-expressed with *Robo1* and *Robo2* during PN migration until they reach the floor plate (Fig. 4B; Fig. S1), when *Robo3* expression is downregulated. Thus, one possibility is that in *Robo3*-deficient mice, Robo1/Robo2 repulsive activity would be activated too early, unmasking Slit repulsive activity from the floor plate, and forcing PN to remain in the dorsal hindbrain. According to this model, midline-derived Slit would be the main repulsive source for PN neurons (but see below).

In addition to the floor plate source, Slits are expressed at the rhombic lip. Although migrants from the rhombic lip have been shown to be repelled by exogenous sources of Slit2 in co-culture (Gilthorpe et al. 2002), our present data indicated that Slit-mediated repulsion may not control the phase 1 of PN migration from the rhombic lip, as PN still leave the rhombic lip in compound *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}*, *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}*, and *Slit2^{-/-};Robo2^{-/-}* deficient mice. However, *Slit3* might still compensate for the loss of *Slit1/Slit2* expression at the rhombic lip. Instead, our analysis revealed a major role for Slit1/Slit2 and Robo1/Robo2 during the phase 2 of PN migration along the AP axis and identified the facial motor nucleus as another important source of Slits for migrating PN, in addition to the floor plate (see also below). Impaired Slit/Robo

signaling resulted in strands of PN migrating out from the stream along the DV pathway in ectopic posterior positions above the FMN (Fig. 5). Thus, Slit2 mediated signaling from the FMN and Slit1/Slit2 from the floor plate are among the main driving forces that prevent PN from reaching the ventral midline upon leaving the rhombic lip, forcing them to migrate rostrally towards r4. The fact that in compound Slit1/Slit2 and Robo1/Robo2 mutants, the leading process of PN neurons still cross the floor plate and then project into the cerebellum strongly suggest that in this system Slit/Robo signaling primarily control cell migration and not axon guidance.

The dorsoventral PN migration requires floor plate derived Netrin-1 and its receptor Dcc (Serafini et al. 1996; Yee et al. 1999). However, even in the absence of *Netrin-1* or *Dcc*, PN manage to undertake phase 1 and phase 2 of migration, leaving the rhombic lip and navigating rostrally before aggregating in an ectopic dorsal position (Yee et al. 1999). Thus, attraction by Netrin-1 towards the midline appears to be essential only during phase 3 of migration, once PN turn ventrally towards the floor plate in the r4 derived territory. As a corollary, PN must be partially insensitive to the Netrin-1/Dcc attraction before reaching r4, despite their continued expression of Dcc (Fig. 4A) and the presence of Netrin-1 all along the floor plate (Yee et al. 1999).

Our results show that in the absence of Slit1-2/Robo1-2 mediated signaling, many PN migrate prematurely towards the midline. This suggests that Slit repulsive activity may counterbalance and prevail over Netrin-1 mediated attraction. Slit-Robo signaling may negatively regulate the responsiveness of PN to Netrin-1/Dcc through several possible mechanism(s). For instance, the activation of Robo1/Robo2 receptors in migrating PN by secreted Slit ligands might lead to dimerization of the intracellular domains of Robo and Dcc, resulting in a partial silencing of Netrin-1 attraction on PN, as described in *Xenopus* spinal axons (Stein and Tessier-Lavigne 2001). Thus, in such a scenario the activity of Slit-activated Robo receptors would be required to

inhibit Dcc activity in target neurons. However, Slit/Robo and Netrin-1/Dcc guidance systems could also be acting independently and PN migratory behavior could result from a balanced integration of attractive and repulsive responses within target neurons. Such possibilities are not mutually exclusive and remain speculative at this point.

It is noteworthy that single *Robo1*, *Robo2*, *Slit1*, or *Slit2* homozygous mutant mice did not show PN migration defects (Fig. S2). This argues for redundant functional roles among Robo receptors or Slit ligands. However, the PN migratory defects in compound *Robo1;Robo2* mutants exactly phenocopied those of compound *Slit1;Slit2* mutant mice, showing that both Robos and Slits are required for PN migration. This strongly favours a direct Slit/Robo interaction in migrating PN. Moreover, from the results of *Slit1;Slit2* compound mutants and the analysis of *Phox2b* knockout mice lacking the FMN (Fig. 5), it can be inferred that the Slit2 source diffusing from the FMN is necessary to maintain the normal rostral migration of PN neurons (models in Figs. 5N and 7A). At r4 level, PN neurons may turn ventrally because Slits diffusing from the FMN in ventral r6 may become limiting and fall below a threshold level. Notably, it is also at this axial level that Robo3 function becomes preponderant and interferes with Slit repulsive activity.

Finally, our results indicate that neither Robos nor Slits are essential for the anterior progression towards r4 of PN, but that they rather prevent migrating neurons from entering the wrong territories. Additional signals must be involved in attracting PN anteriorly and/or repelling them from the posterior brain stem. Attractive signals from trigeminal branchiomotor neurons (MN) can be ruled out as PN still migrate in *Phox2b* knockout animals, which lack all branchiomotor nuclei including trigeminal MN (Fig. 5G,H). Another possibility is that PN might use the adjacent trigeminal nerve tract as a migration substrate to orientate themselves. Neurons from the posterior migratory stream have been shown to adopt such an axonophilic migration (Kyriakopoulou et al. 2002). Chemoattraction of PN could also be provided by the meninges that

overlay the migrating stream. Signaling from the meninges has been implicated in the tangential migration of cortical hem-derived Cajal-Retzius cells in the cerebral cortex. The meninges secrete the chemokine CXCL12 and enhance the migration of CXCR4 expressing Cajal-Retzius cells (Borrell and Marin 2006). Interestingly, migrating PN express CXCR4 and their migration is disrupted in CXCR4-deficient animals (Vilz et al. 2005). Moreover, CXCR4/CXCL12 signalling can be modulated by Slit upon Robo binding to CXCR4 (Wu et al. 1999). Lastly, the meninges over the migrating pontine neurons have been shown to be a localised source of retinoic acid and treatment of the fetus with exogenous sources of retinoic acid has been shown to result in migratory abnormalities of precerebellar neurons (Zhang et al. 2003).

The role of the facial motor nucleus in pontine neuron migration

Our data indicate a novel role for the FMN in maintaining the rostral migration of PN. In mammals, facial motor neurons migrate tangentially from the ventricular region of r4 across r5 to colonize r6, where they undergo a radial migration to finally condense into the FMN, next to the pial side in ventral r6 (Studer et al. 1996; Garel et al. 2000; Schwarz et al. 2004). Such a stereotyped migration takes place between E10.0 and E14.0, at which stage most of the facial motor neurons have reached their final destination in ventral r6 (Schwarz et al. 2004). In addition to PN, the r6-r8 rhombic lip neuroepithelium generates the ECN and LRN neurons that undertake a ventrally oriented extramural pathway to finally settle in the caudal brain stem. ECN/LRN start migrating earlier than PN approximately between E13.0 – E15.0, while PN migration occurs between approximately E13.5 – E17.5 (Pierce 1966; Wang et al. 2005). PN and ECN/LRN neurons express similar molecular markers, including Robo2 and Dcc receptors, yet they display distinct migratory pathways and final locations (Alcantara et al. 2000; Rodriguez and Dymecki 2000; de Diego et al. 2002; Landsberg et al. 2005; Wang et al. 2005). There is a temporal

correlation between the end of the posterior FMN migration and the beginning of the PN rostral migration (phase 2). Thus, one possible mechanism to maintain the distinct migratory behaviour of these populations could depend on the timing of Slit repulsive signalling from the FMN. Specifically, by the time most of the facial motor neurons have reached their final location in ventral r6, i.e. around E14.0, the amount of Slit secreted from the FMN could become quantitatively sufficient to antagonize the Netrin-1/Dcc mediated attraction. This may prevent further ventral progression of neurons along the ECN/LRN pathway and allow later born neurons, at least those closer to the source, to maintain a rostral PN pathway. An additional role might be played by the Slit expressing facial motor axons exiting the hindbrain at the level of r4. Indeed, the PN stream has to navigate in a ‘corridor’ delimited dorsally by the VIIIth and ventrally by the VIIth nerve roots (Nichols and Bruce 2006; and data not shown). Thus decrease of Slit mediated repulsion at the level of the VIIth nerve root might also contribute to the PN navigation errors observed in the various mutants.

Notably, the migratory behaviour of the FMN varies in different vertebrate species due to specific signalling cues in r5 and r6 (Studer 2001). Sharks, lizards, or salamanders have similar organisation and location of FMN to mammals, whereas in zebrafish facial motor neurons migrate into r6 and r7 (Chandrasekhar et al. 1997). Chick embryos are peculiar in that facial motor neurons migrate dorsally within r4, similarly to trigeminal branchiomotor neurons in r2. Interestingly, rhombomere contributions and migratory pathways of pontine nuclei also vary among vertebrates (Marin and Puelles 1995). Thus, one possibility is that the distinct migratory behaviour of the FMN in different vertebrates may in turn contribute to explain distinct species-specific migratory routes of PN.

Finally, based on our results, it is likely that structure(s) other than the FMN is (are) involved in signaling to PN. Indeed, in *Phox2b* mutants the migration errors induced by the lack

of FMN are only partial, whereas the bulk of PN follow their normal pathway of migration (Fig. 5G,H), thus indicating the influence of additional structure(s). Also, in compound *Slit1;Slit2* mutant mice the expression of Slit3 in FMN is not sufficient to rescue the absence of Slit2, also resulting in a partially penetrant migration phenotype similar to the *Phox2b* mutant phenotype (Fig. 5I,J). Hence, while our analysis does not allow to determine the exact location of the Slit1 source, a combinatorial activity of Slit molecules from the FMN and other sources such as the floor plate appears necessary to maintain the rostral migration of PN.

Hoxa2 controls pontine neuron migration through direct regulation of Robo2

To date, only a handful of direct targets of *Hox* genes have been identified in vertebrates (Samad et al. 2004; for review Pearson et al. 2005). In particular, despite the increasing evidence for *Hox* gene expression during late phases of mammalian nervous system development (e.g. Oury et al. 2006), the nature of *Hox* direct targets remains largely elusive. Thus, it is unclear how *Hox* genes may contribute to the molecular regulation of complex aspects of neural circuit assembly, such as neuronal migration and/or topographic axon pathfinding.

In the case of PG2 *Hox* genes, we show that their main role is to maintain the migration of the PN along a defined AP pathway. Interestingly, this is not achieved by direct negative regulation of Netrin-1/Dcc but via the local modulation of Slit-Robo signaling levels while PN migrate through distinct rhombomeric territories. Another important finding is that the regulation of genes encoding for transcription factors involved in general aspects of pontine neuron differentiation or migration such as *Barhl1* or *Pax6* was not affected by the lack of PG2 *Hox* genes, indicating that regulation of PN directional migration by *Hox* genes act in parallel or downstream such transcription factor activities (Fig. 2; and data not shown).

As for *Hoxa2*, our ChIP assays in P19 cells and in situ hybridisation data on mutant fetuses

strongly support direct regulation of *Robo2* expression levels in migrating pontine neurons, whereas regulation of *Slit2* expression in the FMN appears to be indirect. In fact, at the time when *Slit2* downregulation is observed *Hoxa2* is not expressed in facial branchiomotor neurons (data not shown). Generation, migration, and initial differentiation of facial branchiomotor neurons appear to take place normally in *Hoxa2* mutants (data not shown), although an early patterning defect of r4 and/or r5 derived motor neurons cannot be formally ruled out. Downregulation of *Slit2* in the absence of *Hoxa2* might be more likely due to abnormalities in r4 neural crest-derived glia resulting in a late impairment of FMN maintenance and connectivity. Indeed, lack of *Hoxb1* in r4 neural crest-derived glia resulted in late FMN defects similarly to *Hoxa2* knockout animals (Arenkiel et al. 2004). In addition, in *Hoxa2*^{-/-} mutants the identity of second branchial arch derived muscles targeted by the facial nerve is altered, potentially resulting in a late degeneration of the FMN (Rijli et al. 1993).

Conclusions

In conclusion, we provide for the first time evidence for the implication of PG2 *Hox* genes in tangential migration of PN and identify the guidance receptor *Robo2* as a direct target gene of *Hoxa2*. We further show that the Slit-Robo signaling and the facial branchiomotor nucleus are key components of the molecular guidance system controlling PN migration. Our data provide a conceptual framework to begin understanding how PN exposure to multiple guidance cues along the AP and DV axes is regulated at the transcriptional level and in turn translated into coherent neuronal migratory responses (see model in Fig. 7).

Materials and methods

Mouse line generation and genotyping

Slit and *Robo* deficient mice were previously described and genotyped by PCR (Plump et al. 2002; Long et al. 2004; Fouquet et al. 2007). *Hoxa2* null and *Hoxa2^{fllox}* lines were previously described and genotyped by PCR (Rijli et al. 1993; Ren et al. 2002). The day of the vaginal plug was counted as embryonic day 0.5 (E0.5). All animal procedures were carried out in accordance to institutional guidelines.

*Rescue of *Phox2b*^{-/-} embryo lethality*

Phox2b^{-/-} homozygous mutant embryos die at embryonic day E10.5 – E13.5 (Pattyn et al. 2000). However, treatment with noradrenergic agonists allows the rescue of embryo lethality through later stages. To obtain *Phox2b*^{-/-} fetuses, drinking water of pregnant *Phox2b*^{+/-} females was supplemented with 1mg/ml of L-phenylephrine, 1mg/ml of isoproterenol, and 2mg/ml of ascorbic acid, from E8.5 onwards. Mutant fetuses were genotyped as described (Pattyn et al. 2000).

Binding with LRR2-hSlit2-AP

To generate the human Leucine Rich Repeat (LRR) Slit2-alkaline phosphatase (AP) fusion protein (LRR2-hSlit2-AP), the second LRR of Slit2 (amino acids 341-505) was amplified by PCR and cloned between the XhoI and XbaI sites of AP-Tag5 vector (Genhunter, Nashville, Te). Binding was performed as described in Fouquet et al. (2007).

Immunocytochemistry

After dissection brains were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer, pH 7.4 (PFA). Brains were blocked in 0.2% gelatin in PBS containing 0.25% Triton-X100, and incubated overnight at room temperature with goat anti-rat Robo1 (R&D Systems),

goat anti-human DCC (Santa Cruz Biotechnology), goat anti-human ROBO3 (R&D Systems) and rabbit anti-Islet 1 (Abcam) followed by species-specific biotin-coupled secondary antibodies (Jackson Laboratories) or fluorochrome-coupled secondary antibodies donkey anti-goat CY3 (Jackson Laboratories) and donkey anti-goat A488 (Invitrogen). Detection was performed using Vectastain[®] *Elite* ABC Kit following manufacturer instructions.

In situ hybridisation

In situ hybridisation were performed as described in (Marillat et al. 2004). Briefly, brains were dissected fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight, cryoprotected in 20% sucrose and embedded in Shandon Cryomatrix (Thermo Electron Corporation) before freezing at -80°C . 20 μm cryostat sections were cut in a coronal plane. For whole mount stainings, brains were fixed 4% PFA overnight dehydrated and stored at -20°C in 100% methanol. For double in situ hybridisations, antisense riboprobes labeled with fluorescein-11-d-UTP were additionally used.

Whole-mount hindbrains were processed as for single in situ hybridisation (Marillat et al. 2004) but the two antisense riboprobes labeled with digoxigenin-11-d-UTP (*Barhl1*) or fluorescein-11-d-UTP (*Slit2*) were mixed (200ng/ml) in the hybridisation buffer. The Dig-UTP probes recognized by an anti-DIG antibody conjugated to alkaline phosphatase, was detected first by NBT-BCIP reaction. Next, hindbrains were rinsed in a solution of Glycine (0.1M, pH 2.2) during 15min and extensively washed with MABT pH7,5 (NaOH 200mM, maleate 100mM, NaCl 150mM, Tween 20 0.1%). They were blocked in a solution of Tris pH7.6 100mM, NaCl 150mM, tween 0.1%, complemented with 20% normal goat serum (NGS), for 1hr at room temperature. Hindbrains were incubated overnight at 4°C with anti-fluorescein antibody conjugated to alkaline phosphatase (1/5000; Roche Diagnostics). After several washes, the alkaline phosphatase activity was detected using INT (2,48 mg/ml ; 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium

chloride) and BCIP (2,48 mg/ml ; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt in DMSO) (Roche Dagnostics) diluted in a solution of Tris pH9.5 100mM, NaCl100mM, MgCl₂ 50mM, tween 0.1%, levamisole 2mM. Whole mount hindbrains were fixed overnight in 4% PFA and stored at 4°C in PBS/70% glycerol.

RT-PCR

Total RNA from P19 cells was collected using Trizol reagent following manufacturer protocol (GibcoBRL). cDNA synthesis was performed using SuperScriptII Reverse Transcriptase (GibcoBRL) following the manufacturer's instructions. Primers: *Hoxa2* : PCR1 : 5'-TCGACGCTTTCACACTCGACACTGAT-3' (forward) and 5'-CCGGTTCTGAAACCACACTT-3' (reverse). PCR2 (nested) : 5'-AGTCACCCTCGCCACGGCGCT-3' (forward) and 5'-TCTGCAAAGGTACTTGTTGA-3' (reverse). *Robo2*: 5'-ATATCTGATACTGGCACTTATAC-3' (forward) and 5'-CTGAAAGCCTCAATGATATACGC-3' (reverse).

Anti Hoxa2 antibody generation

An anti-Hoxa2 rabbit polyclonal antibody was raised by immunization against the following peptide: KFKNLESDKVEEDEEEKSLC encompassing aminoacids 209 – 228 of the Hoxa2 murine protein. Such a unique peptide was chosen to avoid potential cross-reactivity of the antibody with other Hox proteins. Before injection, the peptide was coupled to activated ovalbumin according to manufacturer protocol (Pierce). Antibody specificity was tested on Western blot from extracts of COS cells transfected with Hoxa2 or other Hox proteins (data not shown).

Chromatin Immunoprecipitation assays

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed using the Upstate EZ ChIP™ Chromatin immunoprecipitation Kit, following the manufacturer protocol. P19 cells were cultured to confluence, fixed in 1% formaldehyde and sonicated 24 times for 10 seconds in 50 second intervals, using a Fischer Bioblock Scientific Sonicator (Vibracell). Sonicated DNA was immunoprecipitated using the generated polyclonal anti-Hoxa2 antibody and control antibodies. The immunoprecipitated *Robo2*, *Gapdh* and *Hprt* sequences were first amplified and detected by non-quantitative PCR (31 cycles) followed by visualisation on agarose gel. In addition, real-time quantitative PCR (qPCR) was carried out using the Quantitech SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) with a Roche LightCycler. The ChIP primers for non-quantitative PCR are: *Robo2*: 5'-CTATGGGTTTTGCTTTATCTGTCCC-3' (forward) and 5'-GGTAGCTGAGCATGTTATTGTCC-3' (reverse); *Gapdh* : 5'-TCTGCGCCCTTGAGCTAGGACTGG-3' (forward) and 5'-TTCGCACCAGCATCCCTAGACC-3' (reverse). For real-time qPCR the following oligonucleotide primers were used: *Robo2* : 5'-TGATAAGTTGACCAGTCAGTG-3' (forward) and 5'-TGTGTTATGAGTCCTCAGATG-3' (reverse); *Hprt* : 5'-TTATCTGGGAATCCTCTGGG-3' (forward) and 5'-AAAGGCAGTTCGGAACTCT-3' (reverse).

Acknowledgements

We wish to thank M. Wassef and R. Wingate for critical reading of the manuscript. We would like to acknowledge the following colleagues for the generous gift of plasmids or mouse lines: M. Tessier-Lavigne (*Robo* and *Slit* knockouts and *Dcc* cDNA), F. Qiu (*Barhl1*), P. Dollé (*Hoxa3*,

Hoxb3, Hoxb4, Hoxd4, Hoxb5), A. McMahon (*Wnt1::Cre* line). We thank C. Laumonnerie for help with in situ hybridisation, X. Lampe for in silico analysis, and M. Poulet for excellent technical assistance. M.J.G. was supported by La Ligue Nationale Contre Le Cancer and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), and the Luxembourg Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. A. C. was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Fondation pour la Recherche Médicale (programme équipe FRM). Work in F.M.R. laboratory was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR), the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM), the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Ministère pour la Recherche (ACI program), and by institutional funds from CNRS and INSERM.

References

- Alcantara, S., M. Ruiz, F. De Castro, E. Soriano, and C. Sotelo. 2000. Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* **127**: 1359-72.
- Altman, J., and Bayer, S. (1997). *Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure, and Functions*, P. Petralia, ed. (Boca Raton, FL: CRC Press).
- Andrews, W.D., M. Barber, and J.G. Parnavelas. 2007. Slit-Robo interactions during cortical development. *J Anat.*
- Arenkiel, B.R., P. Tvrdik, G.O. Gaufo, and M.R. Capecchi. 2004. Hoxb1 functions in both motoneurons and in tissues of the periphery to establish and maintain the proper neuronal circuitry. *Genes Dev* **18**: 1539-52.
- Backer, S., T. Sakurai, M. Grumet, C. Sotelo, and E. Bloch-Gallego. 2002. Nr-CAM and TAG-1 are expressed in distinct populations of developing precerebellar and cerebellar neurons. *Neuroscience* **113**: 743-8.
- Bagri, A., O. Marin, A.S. Plump, J. Mak, S.J. Pleasure, J.L. Rubenstein, and M. Tessier-Lavigne. 2002. Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* **33**: 233-48.
- Barrow, J.R. and M.R. Capecchi. 1996. Targeted disruption of the Hoxb-2 locus in mice interferes with expression of Hoxb-1 and Hoxb-4. *Development* **122**: 3817-28.
- Barrow, J.R., H.S. Stadler, and M.R. Capecchi. 2000. Roles of Hoxa1 and Hoxa2 in patterning the early hindbrain of the mouse. *Development* **127**: 933-44.
- Borrell, V. and O. Marin. 2006. Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat Neurosci* **9**: 1284-93.
- Causeret, F., F. Danne, F. Ezan, C. Sotelo, and E. Bloch-Gallego. 2002. Slit antagonizes netrin-1 attractive effects during the migration of inferior olivary neurons. *Dev Biol* **246**: 429-40.
- Chandrasekhar, A., C.B. Moens, J.T. Warren, Jr., C.B. Kimmel, and J.Y. Kuwada. 1997. Development of branchiomotor neurons in zebrafish. *Development* **124**: 2633-44.
- Danielian, P.S., D. Muccino, D.H. Rowitch, S.K. Michael, and A.P. McMahon. 1998. Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* **8**: 1323-6.
- Dasen, J.S., B.C. Tice, S. Brenner-Morton, and T.M. Jessell. 2005. A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell* **123**: 477-91.
- Davenne, M., M.K. Maconochie, R. Neun, A. Pattyn, P. Chambon, R. Krumlauf, and F.M. Rijli. 1999. Hoxa2 and Hoxb2 control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* **22**: 677-91.
- de Diego, I., K. Kyriakopoulou, D. Karagogeos, and M. Wassef. 2002. Multiple influences on the migration of precerebellar neurons in the caudal medulla. *Development* **129**: 297-306.
- Duboule, D. and G. Morata. 1994. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* **10**: 358-64.
- Eddison, M., L. Toole, E. Bell, and R.J. Wingate. 2004. Segmental identity and cerebellar granule cell induction in rhombomere 1. *BMC Biol* **2**: 14.
- Engelkamp, D., P. Rashbass, A. Seawright, and V. van Heyningen. 1999. Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* **126**: 3585-96.
- Farago, A.F., R.B. Awatramani, and S.M. Dymecki. 2006. Assembly of the brainstem cochlear nuclear complex is revealed by intersectional and subtractive genetic fate maps. *Neuron* **50**: 205-18.

- Fazeli, A., S.L. Dickinson, M.L. Hermiston, R.V. Tighe, R.G. Steen, C.G. Small, E.T. Stoeckli, K. Keino-Masu, M. Masu, H. Rayburn, J. Simons, R.T. Bronson, J.I. Gordon, M. Tessier-Lavigne, and R.A. Weinberg. 1997. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* **386**: 796-804.
- Ferretti, E., H. Marshall, H. Popperl, M. Maconochie, R. Krumlauf, and F. Blasi. 2000. Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development* **127**: 155-66.
- Fouquet, C., T. Di Meglio, L. Ma, T. Kawasaki, H. Long, T. Hirata, M. Tessier-Lavigne, A. Chedotal, and K.T. Nguyen-Ba-Charvet. 2007. Robo1 and robo2 control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* **27**: 3037-45.
- Garel, S., M. Garcia-Dominguez, and P. Charnay. 2000. Control of the migratory pathway of facial branchiomotor neurones. *Development* **127**: 5297-307.
- Gavalas, A., M. Davenne, A. Lumsden, P. Chambon, and F.M. Rijli. 1997. Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* **124**: 3693-702.
- Gaufo, G.O., S. Wu, and M.R. Capecchi. 2004. Contribution of Hox genes to the diversity of the hindbrain sensory system. *Development* **131**: 1259-66.
- Gavalas, A., C. Ruhrberg, J. Livet, C.E. Henderson, and R. Krumlauf. 2003. Neuronal defects in the hindbrain of Hoxa1, Hoxb1 and Hoxb2 mutants reflect regulatory interactions among these Hox genes. *Development* **130**: 5663-79.
- Gilthorpe, J.D., E.K. Papantoniou, A. Chedotal, A. Lumsden, and R.J. Wingate. 2002. The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Development* **129**: 4719-28.
- Guan, C.B., H.T. Xu, M. Jin, X.B. Yuan, and M.M. Poo. 2007. Long-range Ca²⁺ signaling from growth cone to soma mediates reversal of neuronal migration induced by slit-2. *Cell* **129**: 385-95.
- Harris, J., L. Honigberg, N. Robinson, and C. Kenyon. 1996. Neuronal cell migration in *C. elegans*: regulation of Hox gene expression and cell position. *Development* **122**: 3117-31.
- Hatten, M.E. 1999. Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* **22**: 511-39.
- Jacobs, Y., C.A. Schnabel, and M.L. Cleary. 1999. Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity. *Mol Cell Biol* **19**: 5134-42.
- Kraut, R. and K. Zinn. 2004. Roundabout 2 regulates migration of sensory neurons by signaling in trans. *Curr Biol* **14**: 1319-29.
- Kyriakopoulou, K., I. de Diego, M. Wassef, and D. Karageorgos. 2002. A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development* **129**: 287-96.
- Landsberg, R.L., R.B. Awatramani, N.L. Hunter, A.F. Farago, H.J. DiPietrantonio, C.I. Rodriguez, and S.M. Dymecki. 2005. Hindbrain rhombic lip is comprised of discrete progenitor cell populations allocated by Pax6. *Neuron* **48**: 933-47.
- Li, S., F. Qiu, A. Xu, S.M. Price, and M. Xiang. 2004. Barhl1 regulates migration and survival of cerebellar granule cells by controlling expression of the neurotrophin-3 gene. *J Neurosci* **24**: 3104-14.
- Long, H., C. Sabatier, L. Ma, A. Plump, W. Yuan, D.M. Ornitz, A. Tamada, F. Murakami, C.S. Goodman, and M. Tessier-Lavigne. 2004. Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* **42**: 213-23.
- Lopez-Bendito, G., N. Flames, L. Ma, C. Fouquet, T. Di Meglio, A. Chedotal, M. Tessier-Lavigne, and O. Marin. 2007. Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain. *J Neurosci* **27**: 3395-407.

- Lumsden, A. and R. Krumlauf. 1996. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**: 1109-15.
- Ma, L. and M. Tessier-Lavigne. 2007. Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *J Neurosci* **27**: 6843-51.
- Machold, R. and G. Fishell. 2005. Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron* **48**: 17-24.
- Marillat, V., C. Sabatier, V. Failli, E. Matsunaga, C. Sotelo, M. Tessier-Lavigne, and A. Chedotal. 2004. The slit receptor Rig-1/Robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. *Neuron* **43**: 69-79.
- Marin, F. and L. Puelles. 1995. Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur J Neurosci* **7**: 1714-38.
- Marin, O., A.S. Plump, N. Flames, C. Sanchez-Camacho, M. Tessier-Lavigne, and J.L. Rubenstein. 2003. Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* **130**: 1889-901.
- Marin, O. and J.L. Rubenstein. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* **26**: 441-83.
- Morales, D. and M.E. Hatten. 2006. Molecular markers of neuronal progenitors in the embryonic cerebellar anlage. *J Neurosci* **26**: 12226-36.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T., N. Picard-Riera, M. Tessier-Lavigne, A. Baron-Van Evercooren, C. Sotelo, and A. Chedotal. 2004. Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci* **24**: 1497-506.
- Nichols, D.H. and L.L. Bruce. 2006. Migratory routes and fates of cells transcribing the Wnt-1 gene in the murine hindbrain. *Dev Dyn* **235**: 285-300.
- Orlando, V., H. Strutt, and R. Paro. 1997. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**: 205-14.
- Oury, F., Y. Murakami, J.S. Renaud, M. Pasqualetti, P. Charnay, S.Y. Ren, and F.M. Rijli. 2006. Hoxa2- and rhombomere-dependent development of the mouse facial somatosensory map. *Science* **313**: 1408-13.
- Pattyn, A., M. Hirsch, C. Goridis, and J.F. Brunet. 2000. Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene Phox2b. *Development* **127**: 1349-58.
- Pearson, J.C., D. Lemons, and W. McGinnis. 2005. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet* **6**: 893-904.
- Pierce, E.T. 1966. Histogenesis of the nuclei griseum pontis, corporis pontobulbaris and reticularis tegmenti pontis (Bechterew) in the mouse. An autoradiographic study. *J Comp Neurol* **126**: 219-54.
- Plump, A.S., L. Erskine, C. Sabatier, K. Brose, C.J. Epstein, C.S. Goodman, C.A. Mason, and M. Tessier-Lavigne. 2002. Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* **33**: 219-32.
- Popperl, H., M. Bienz, M. Studer, S.K. Chan, S. Aparicio, S. Brenner, R.S. Mann, and R. Krumlauf. 1995. Segmental expression of Hoxb-1 is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon exd/pbx. *Cell* **81**: 1031-42.
- Ren, S.Y., M. Pasqualetti, A. Dierich, M. Le Meur, and F.M. Rijli. 2002. A Hoxa2 mutant conditional allele generated by Flp- and Cre-mediated recombination. *Genesis* **32**: 105-8.
- Rijli, F.M., A. Gavalas, and P. Chambon. 1998. Segmentation and specification in the branchial region of the head: the role of the Hox selector genes. *Int J Dev Biol* **42**: 393-401.

- Rijli, F.M., M. Mark, S. Lakkaraju, A. Dierich, P. Dolle, and P. Chambon. 1993. A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa-2*, which acts as a selector gene. *Cell* **75**: 1333-49.
- Rodriguez, C.I. and S.M. Dymecki. 2000. Origin of the precerebellar system. *Neuron* **27**: 475-86.
- Sabatier, C., A.S. Plump, M. Le, K. Brose, A. Tamada, F. Murakami, E.Y. Lee, and M. Tessier-Lavigne. 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**: 157-69.
- Samad, O.A., M.J. Geisen, G. Caronia, I. Varlet, V. Zappavigna, J. Ericson, C. Goridis, and F.M. Rijli. 2004. Integration of anteroposterior and dorsoventral regulation of *Phox2b* transcription in cranial motoneuron progenitors by homeodomain proteins. *Development* **131**: 4071-83.
- Santagati, F., M. Minoux, S.Y. Ren, and F.M. Rijli. 2005. Temporal requirement of *Hoxa2* in cranial neural crest skeletal morphogenesis. *Development* **132**: 4927-36.
- Schwarz, Q., C. Gu, H. Fujisawa, K. Sabelko, M. Gertsenstein, A. Nagy, M. Taniguchi, A.L. Kolodkin, D.D. Ginty, D.T. Shima, and C. Ruhrberg. 2004. Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with *Sema3A* to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes Dev* **18**: 2822-34.
- Serafini, T., S.A. Colamarino, E.D. Leonardo, H. Wang, R. Beddington, W.C. Skarnes, and M. Tessier-Lavigne. 1996. *Netrin-1* is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* **87**: 1001-14.
- Shu, T. and L.J. Richards. 2001. Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum. *J Neurosci* **21**: 2749-58.
- Sotelo, C. 2004. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol* **72**: 295-339.
- Stein, E. and M. Tessier-Lavigne. 2001. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**: 1928-38.
- Studer, M. 2001. Initiation of facial motoneurone migration is dependent on rhombomeres 5 and 6. *Development* **128**: 3707-16.
- Studer, M., A. Lumsden, L. Ariza-McNaughton, A. Bradley, and R. Krumlauf. 1996. Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking *Hoxb-1*. *Nature* **384**: 630-4.
- Tumpel, S., F. Cambronoero, E. Ferretti, F. Blasi, L.M. Wiedemann, and R. Krumlauf. 2007. Expression of *Hoxa2* in rhombomere 4 is regulated by a conserved cross-regulatory mechanism dependent upon *Hoxb1*. *Dev Biol* **302**: 646-60.
- Vilz, T.O., B. Moepps, J. Engele, S. Molly, D.R. Littman, and K. Schilling. 2005. The SDF-1/CXCR4 pathway and the development of the cerebellar system. *Eur J Neurosci* **22**: 1831-9.
- Wang, V.Y., M.F. Rose, and H.Y. Zoghbi. 2005. *Math1* expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron* **48**: 31-43.
- Wingate, R.J. 2001. The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 82-8.
- Wingate, R.J. and M.E. Hatten. 1999. The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development* **126**: 4395-404.
- Wong, K., H.T. Park, J.Y. Wu, and Y. Rao. 2002. Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 583-91.

- Wu, W., K. Wong, J. Chen, Z. Jiang, S. Dupuis, J.Y. Wu, and Y. Rao. 1999. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* **400**: 331-6.
- Yee, K.T., H.H. Simon, M. Tessier-Lavigne, and D.M. O'Leary. 1999. Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* **24**: 607-22.
- Zhang, J., D. Smith, M. Yamamoto, L. Ma, and P. McCaffery. 2003. The meninges is a source of retinoic acid for the late-developing hindbrain. *J Neurosci* **23**: 7610-20.

Figure Legends

Figure 1. Migratory pathway and *Hox* gene expression of pontine neurons. (A-C) Lateral (A) and ventral view (B) of a E14.5 whole-mount brain hybridised with a *Barhl1* antisense probe. *Barhl1*⁺ neurons stream from a dorsoposterior to an anteroventral location. In (B), pontine neurons (PN) finally settle in the rhombomere (r)4-derived territory, just abutting r3 and r5 derived domains. The migration is subdivided into three distinct phases (1–3) as indicated in (A) and in the summary diagram in (D). (C) Coronal cryostat section of a E14.5 brain hybridised with a *Barhl1* probe. The arrow indicates the *Barhl1*⁺ PN during step 2 of their migration. (E) The left diagram shows the distinct anteroposterior planes of section (X,X', dashed lines) used in (F-L). The middle and right panels show the diagrams of transverse sections at the X and X' levels, whereby the red boxes indicate the regions shown in (F-L) or (F'-L'), respectively. (F,F'-L,L') E14.5 cryostat hindbrain sections hybridised with *Hoxa2* (F,F'), *Hoxb2* (G,G'), *Hoxa3* (H,H'), *Hoxb3* (I,I'), *Hoxb4* (J,J'), *Hoxd4* (K,K'), and *Hoxb5* (L,L') probes. The arrows show expression in migrating PN. (M-N) Cryostat sections of P0 (M), and P4 (N) brains hybridised with *Hoxa2* probe. The section level is indicated by the red box in the left diagram. Arrows show *Hoxa2* expression in the pontine gray (PGN) and reticulotegmental (RTN) nuclei. nVIII: vestibulocochlear nerve; nV: trigeminal nerve.

Figure 2. Migration defects of pontine neurons in *Hoxa2* and *Hoxb2* mutant mice. (A-I) Lateral (A,D,G) and ventral (B,E,H) views of *Hoxa2*^{+/-} (A,B) and *Hoxa2*^{-/-} (D,E,G,H) whole-mount brains at E14.5 hybridised with a *Barhl1* probe to visualise migrating PN. In *Hoxa2*^{-/-} specimen (D,E,G,H), the black arrows show ectopic *Barhl1*⁺ cells prematurely migrating towards the midline. The white arrows indicate PN migrating along the normal pathway. Note that the

migration phenotype is asymmetrically and variably distributed when comparing distinct mutants or both sides of a given specimen (D,E,G,H). (C,F,I) Diagrams summarising the normal (C) and abnormal (F,I) PN migratory phenotypes shown in (A,B) and (D,E,G,H), respectively. (J-L) Lateral (J) and (K) ventral views of *Hoxb2*^{-/-} mutant brains hybridised with *Barhl1*. Similar to *Hoxa2*^{-/-} mutants, ectopic *Barhl1*⁺ cells leave the stream of PN and prematurely migrate ventrally (black arrows). (L) Summary diagram of the *Hoxb2* deficient phenotype. nVIII: vestibulocochlear nerve; nV: trigeminal nerve.

Figure 3. Intrinsic requirement for *Hoxa2* in PN migration. (A-H) Conditional inactivation of *Hoxa2* in *Wnt1*⁺ rhombic lip derived neurons. Lateral (A,E) and ventral (B,C,F,G) views of E15.5 *Wnt1::Cre;Hoxa2*^{flox/+} heterozygous (A-C) and *Wnt1::Cre;Hoxa2*^{flox/flox} homozygous (E-G) mutant whole-mount brains hybridised with a *Tag1* probe. In homozygous mutants (E-G), ectopic *Tag1*⁺ cells appear to prematurely migrate towards the midline (arrows in E,F). (C,G) Higher magnifications of ventral views shown in (B and F), respectively. (D,H) Summary of the PN migratory phenotypes in *Wnt1::Cre;Hoxa2*^{flox/+} (D) and *Wnt1::Cre;Hoxa2*^{flox/flox} (H) brains. nVIII: vestibulocochlear nerve; nV: trigeminal nerve.

Figure 4. *Hoxa2* dependent expression of guidance molecules during PN migration. (A,H) Analysis of *Dcc*, *Robo3*, and *Slit2* expression in WT (A-D) and *Hoxa2*^{-/-} (E-H) E14.5 whole-mount hindbrains. (A,E) Anti-DCC antibody immunohistochemistry on WT (A) and *Hoxa2*^{-/-} (E) hindbrains. *Dcc* expression is present both in normally and ectopically (arrow in E) migrating PN. (B,F) Lateral views of WT (B) and a *Hoxa2*^{-/-} (F) brains hybridised with a *Robo3* antisense probe. In (F), *Robo3* is expressed both in normally and ectopically (arrows) migrating PN. (C,D,G,H) Ventral (C,G) and dorsal (D,H) views of WT (C,D) and *Hoxa2*^{-/-} (G,H) brains

hybridised with a *Slit2* probe. *Slit2* is expressed in the facial motor nucleus (FMN) (arrows in C), floor plate (FP) and rhombic lip (RL) (white and black arrows in D, respectively). In *Hoxa2*^{-/-} mutants, *Slit2* is downregulated in the FMN (arrows in G), though not in FP and RL (white and black arrows in H, respectively). (I-N) Adjacent cryostat sections of WT (I-K) and *Hoxa2*^{-/-} (L-N) E14.5 hindbrains hybridised with *Barhl1* (I,L), *Robo3* (J,M), and *Robo2* (K,N) probes. Arrows on each panel show expression in migrating pontine neurons (PN). In *Hoxa2*^{-/-} mutants, *Barhl1* (L) and *Robo3* (M) expressions are unaffected, while *Robo2* (N) is downregulated (arrow; compare K and N). (O-T) Adjacent cryostat sections of E14.5 *Hoxa2*^{+/-};*Hoxb2*^{+/-} (O-Q) and *Hoxa2*^{-/-};*Hoxb2*^{-/-} (R-T) hindbrains hybridised with *Barhl1* (O,R), *Dcc* (P,S), and *Robo2* (Q,T) probes. In *Hoxa2*^{-/-};*Hoxb2*^{-/-} mutants, *Robo2* expression in the main PN stream is downregulated (arrow in T). Note also that ectopically migrating neurons do express *Barhl1* and *Dcc* (brackets in R and S), while no expression of *Robo2* is detected in the ectopic stream (bracket in T, compare with R, S adjacent sections). Summaries on the right show the distinct migratory phenotypes and planes of section shown in (I-K), (L-N), (O-Q), and (R-T). (U) Lateral view of a E14.5 WT whole-mount brain doubly hybridised with the *Barhl1* (orange) and *Slit2* (blue), showing the FMN position relative to the PN stream. (V) E15.5 WT hindbrain doubly immunostained using anti-*Robo3* (green) and anti-*Islet1* (red) antibodies. (W) Drawing summarising the expression of *Robo2* (green) in migrating PN and *Slit2* (brown) in the FMN and their relative positions in respect to one another. nV: trigeminal nerve; nVIII: vestibulocochlear nerve.

Figure 5. PN migration defects in *Robo1/2*, *Slit1/2*, and *Phox2b* mutants are similar and phenocopy *Hox PG2* knockout mice. (A-J) Analysis of PN migration defects by in situ hybridisation of whole-mount hindbrains with a *Barhl1* probe. Lateral (A,E,I,C,G) and ventral (B,F,J,D,H,) views of *Robo1*^{+/-};*Robo2*^{+/-} (A,B), *Phox2b*^{+/-} (C,D), *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} (E,F), *Phox2b*^{-/-}

^{-/-} (G,H), and *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* (I,J) E15.5 (A,B,E,F,I,J) and E14.5 (C,D,G,H) hindbrains. In single and compound heterozygous mutants (A-D), a normal PN migratory pathway is observed (arrows). In single and compound homozygous mutants (E-J), strands of ectopic *Barhl1⁺* cells migrate prematurely towards the midline and condense in small clusters at posterior locations (arrows). Such phenotypes are all similar, and phenocopy the PN migratory defects of *Hoxa2^{-/-}* mutant mice (compare E-J with Fig. 2D,E). (K and L) *Slit2* expression in *Phox2b^{+/-}* (K) and *Phox2b^{-/-}* (L) brains in ventral view. In (L), note the absence of *Slit2* expression at the level of the facial motor nucleus (FMN) due to the lack of the nucleus in *Phox2b^{-/-}* mutants, while expression at the level of the rhombic lip (RL) is unaffected (black arrows in (K) and (L)). (M) Summary of the migration phenotypes in compound *Robo1;Robo2* and *Slit1;Slit2* deficient mice. (N) Summary of the migratory defects observed in *Phox2b* deficient mice, due to the absence of signalling from the FMN (brown on the left, dashed circle on the right). FP, floor plate; nVIII, vestibulocochlear nerve; nV, trigeminal nerve.

Figure 6. *Robo2* is a direct target of *Hoxa2* (A) Schematic representation of the *Robo2* locus. Vertical and horizontal lines represent exons and introns, respectively. (B) A highly conserved 185 bp fragment, in the second intron 73,3kb downstream of the *Robo2* transcription start site (Chr. 16 : 74221061 – 74221245 UCSC Genome Browser), contains a putative Pbx/Hox binding site (red box). (C and D) Transcript detection from *Hoxa2* (C) and *Robo2* (D) coding regions by RT-PCR of total RNA retrotranscribed (cDNA) from P19 cells. The control (C) is carried out on non-retrotranscribed total RNA. (E) On top: consensus sequence used to screen the *Robo2* locus for Pbx/Hox binding sites. Below are aligned the identified Pbx/Hox site (red) in the *Robo2* locus with known Pbx/Hox binding sites present in other *Hox* target genes. Complete conservation of nucleotides among the different sites is shown in yellow. In blue are shown nucleotide positions

with high degree of conservation. (F-H) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay performed with a specific rabbit anti-Hoxa2 polyclonal antibody (Anti-Hoxa2) on total chromatin (Input) from P19 cells, as detailed in experimental procedures. In the experiment shown in (F), a specific PCR product spanning the identified Pbx/Hox site in *Robo2* is amplified from immunoprecipitated chromatin with the anti-Hoxa2 antibody, though not with the rabbit pre-immunised (PI) serum. (H) Control PCR showing the lack of specific amplification products from the same immunoprecipitated material as in (F) when using specific primers within the *Gapdh* locus. (G) Quantitative PCR (qPCR) from a ChIP assay independent from (F,H). The values from the LightCycler are expressed as percentage of the total input. A highly significant enrichment is observed for the fragment spanning the *Robo2* Pbx/Hox site (black bar) from the anti-Hoxa2 immunoprecipitated chromatin (left), as compared to an *Hprt* control genomic fragment (grey bar). To the right is shown the percentage of the input recovered using the control rabbit pre-immunized (PI) serum. The data are presented as the mean \pm S.E. and are from two independent amplifications, each performed in duplicate.

Figure 7. Summary model for the control of rostral PN migration by *Hox PG2* genes, guidance molecules, and the facial motor nucleus. (A) Migrating PN express PG2-5 *Hox* genes as well as Robo1-3 and Dcc receptors. The ligands Slit1-3 and Netrin-1 are expressed throughout the hindbrain floor plate (FP). Moreover, Slit2 and Slit3 are expressed in the facial motor nucleus (FMN) (brown). Based on this work, during the PN rostral phase of migration the Netrin1/Dcc mediated ventral attraction may be antagonized through Slit-Robo signalling, thereby preventing a premature ventral migration of PN. In addition, the FMN is an important signalling source required to maintain the caudorostral PN migratory pathway (red bar), partly through Slit2-3 expression. (B) In *Hox PG2* mutant mice, *Netrin-1* and *Slit1-3* expression at the FP level as well

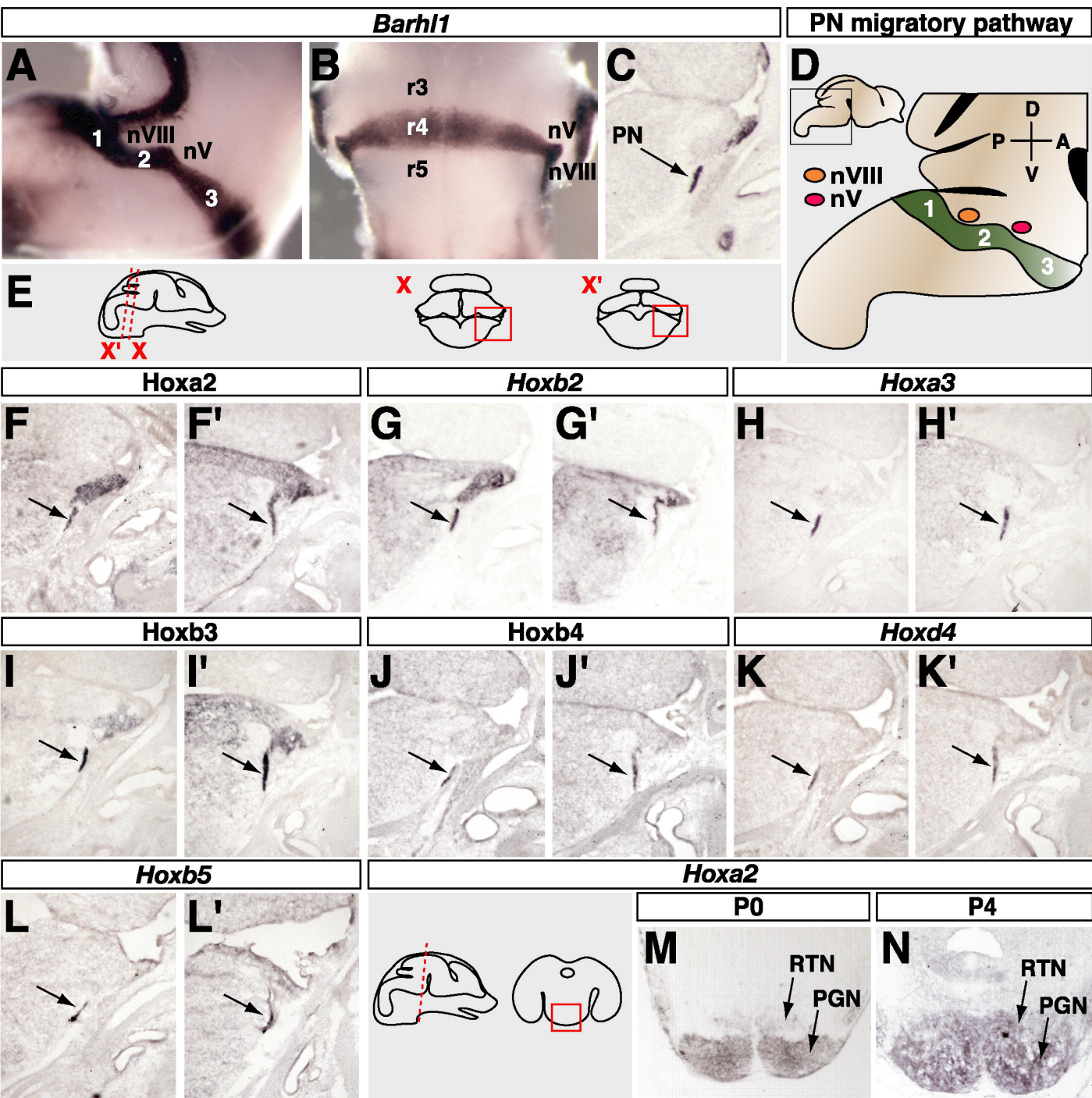
as *Dcc* expression within migrating PN are not affected. However, *Hoxa2* is required to maintain sustained *Robo2* expression within migrating PN, and normal *Slit2-3* expression within the FMN (dashed circle). Insufficient Slit-Robo signaling in turn lead to the inability of some PN to maintain their normal rostral pathway, resulting in ectopic neurons prematurely migrating ventrally at posterior locations. Such behavior of migrating PN is phenocopied in compound *Robo1;Robo2*, *Slit1;Slit2* deficient mice as well as in FMN-deficient *Phox2b* mutant mice.

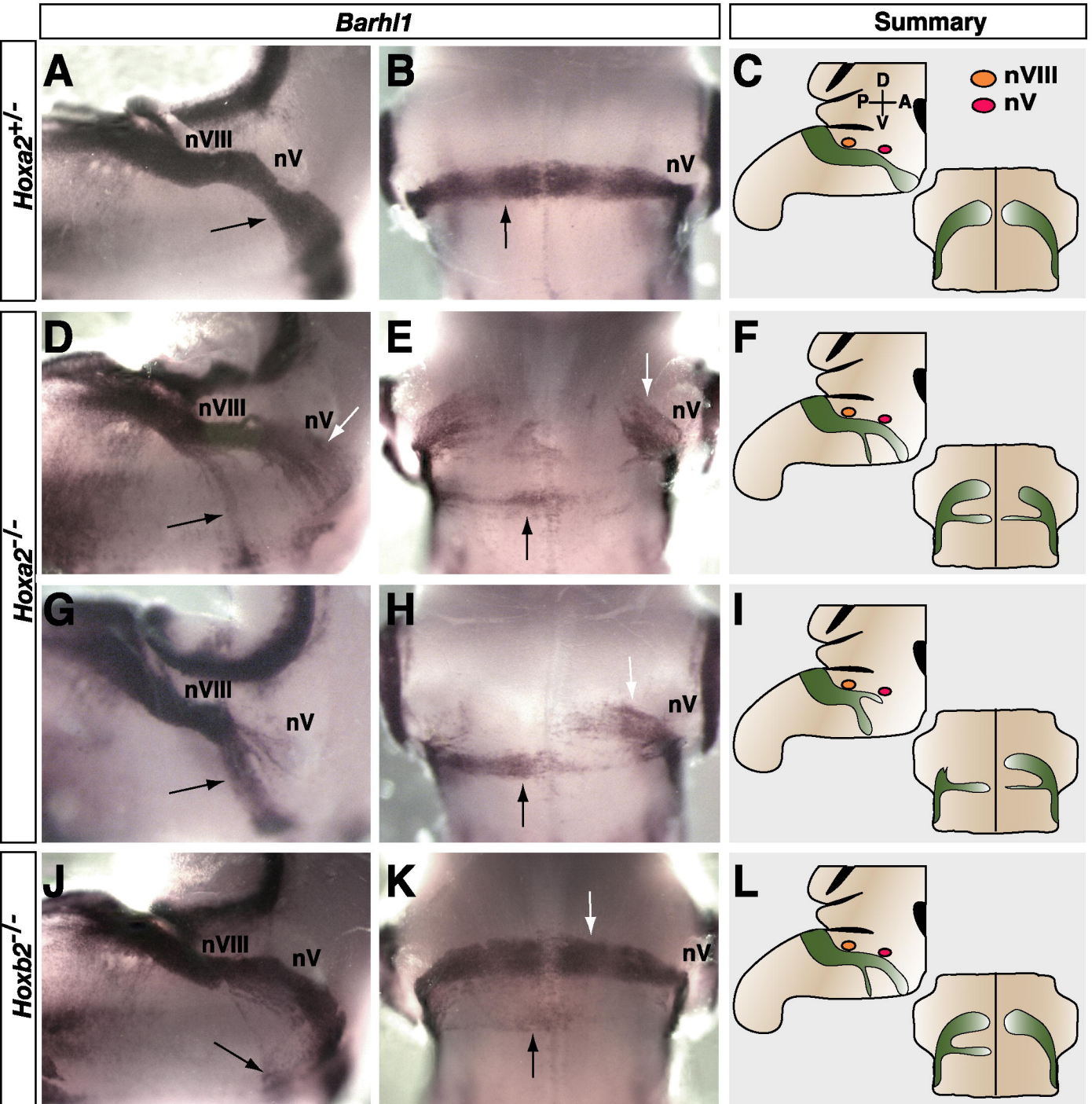
Supplemental Figures

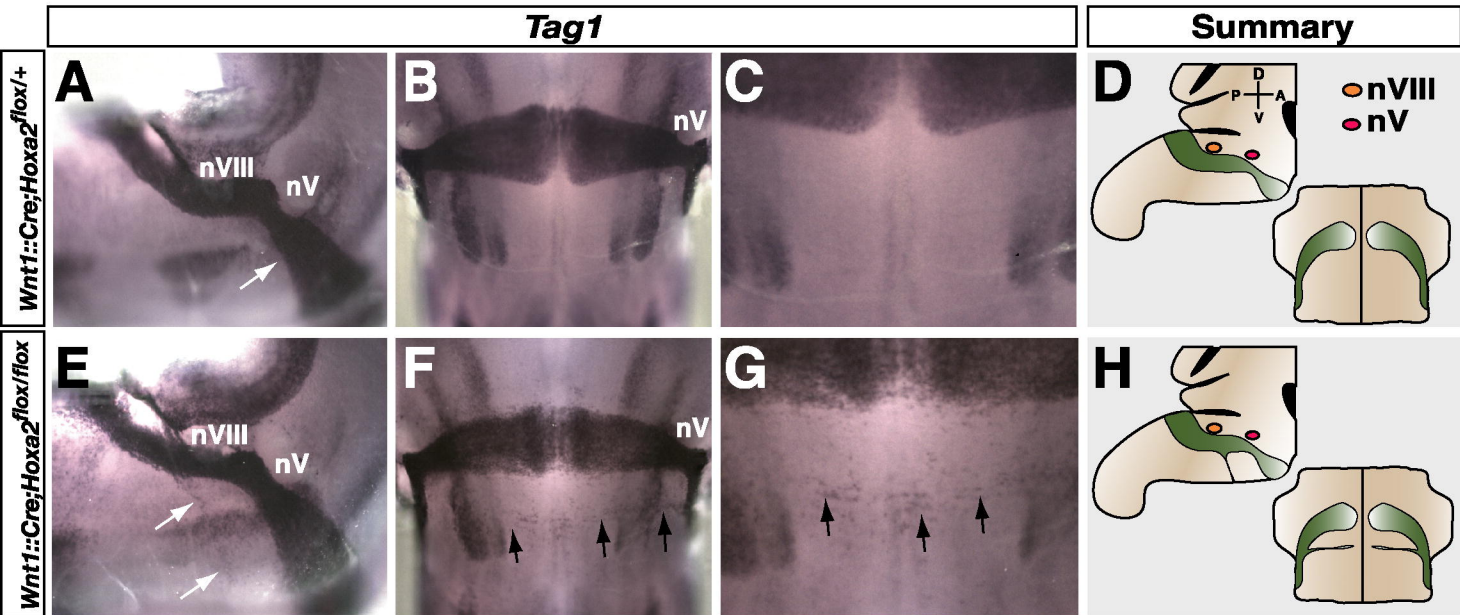
Figure S1. Expression patterns of *Robo1*, *Robo2*, and *Slit3*. (A) Lateral view of a E14.5 WT whole-mount brain, immunostained with anti-*Robo1* antibody. The black arrow shows the presence of *Robo1* in migrating PN. (B) Ventral view of a E15.5 WT whole-mount brain hybridised with a *Robo2* probe. *Robo2* is expressed within PN throughout their migration and maintained within the nascent pontine gray nucleus (red arrows). (C) LRR2-hSlit2-AP binding on a E14.5 WT whole-mount brain (lateral view). The arrow indicates the presence of Slit2 receptors in migrating PN. (D) Expression of *Slit3* in the FMN (white arrow) of a E14.5 whole-mount mouse brain. (E) Dorsal view of one side of the same brain shown in (D) (midline to the left, dorsal side to the right) showing *Slit3* expression in the rhombic lip (black arrow), as well as in the floor plate (white arrow). nV : trigeminal nerve; nVIII : vestibulocochlear nerve; FP : floor plate; RL : rhombic lip.

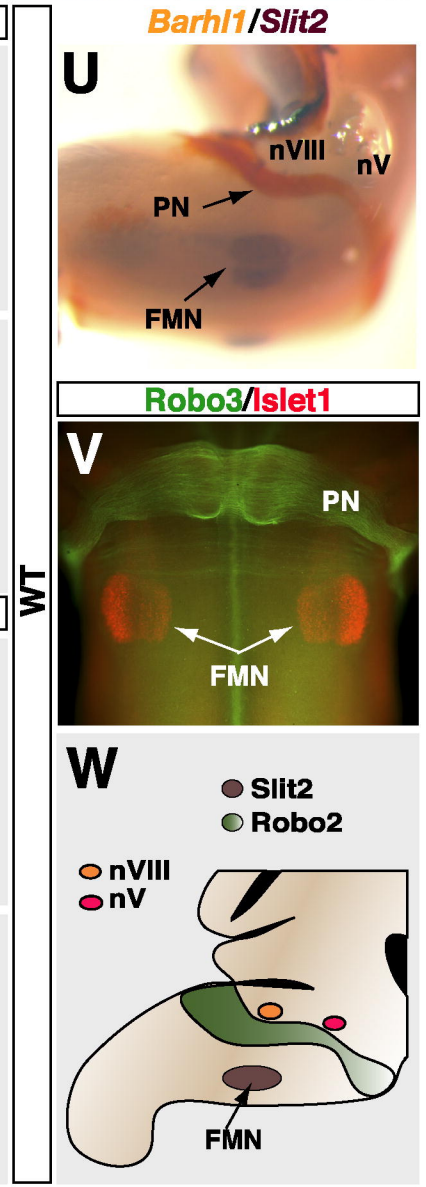
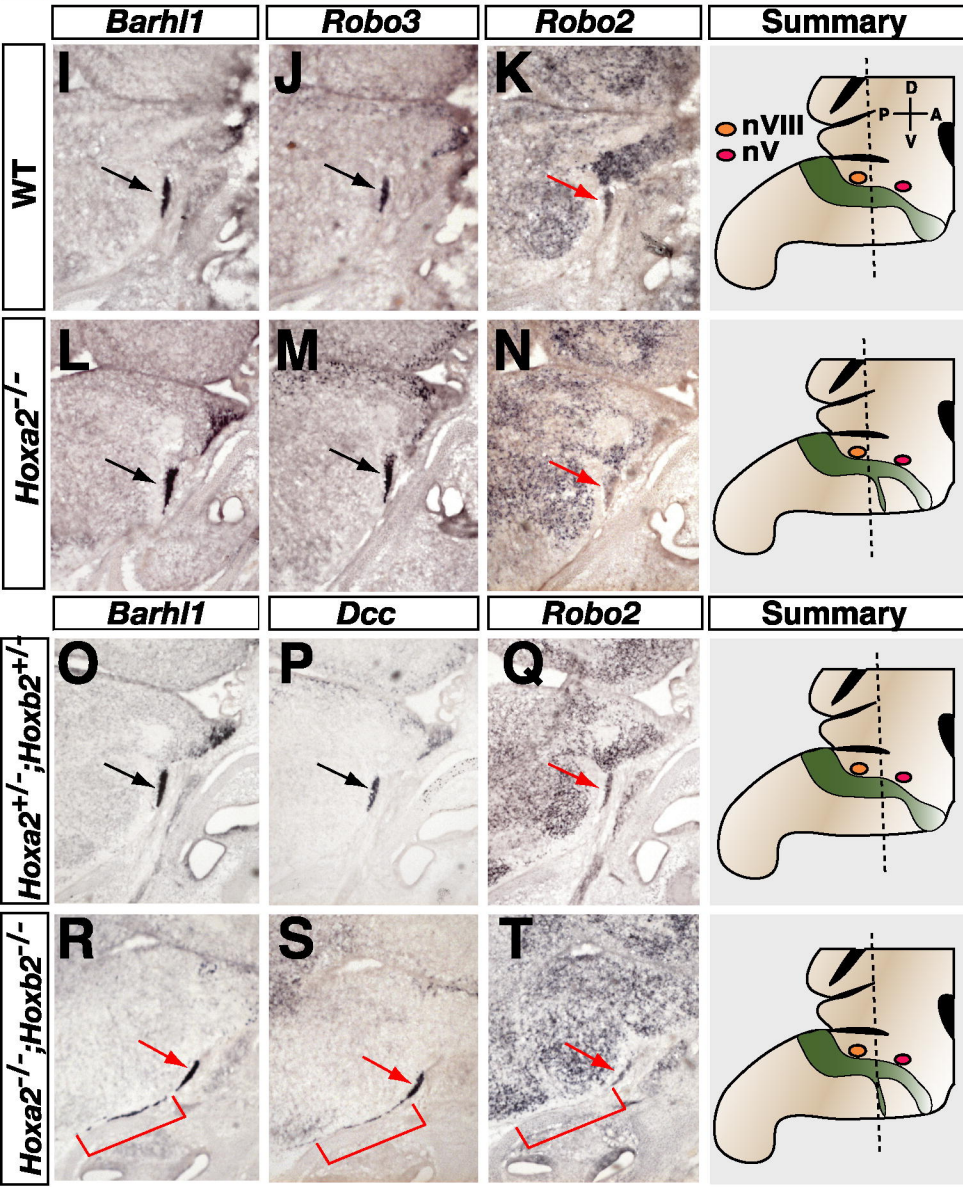
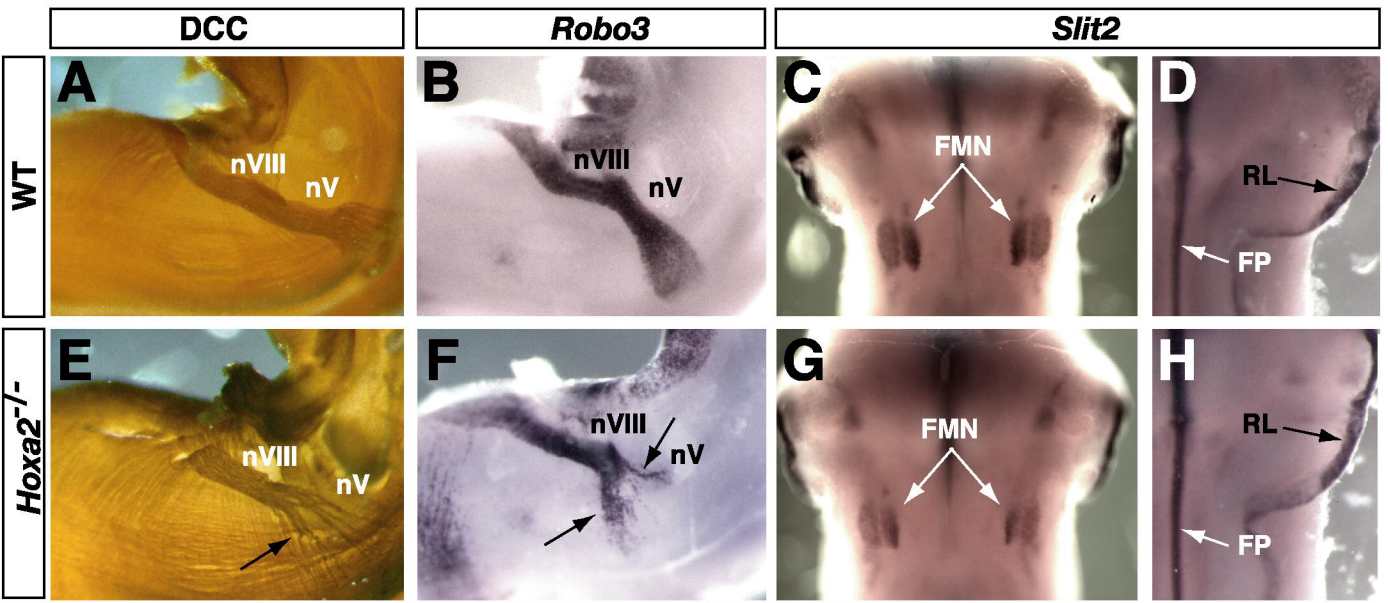
Figure S2. Pontine nuclei development in single and compound *Robo1-2*, *Robo3*, *Slit1-2*, and *Phox2b* mutant mice. (A-H) Ventral views of whole-mount brains at the level of pontine nuclei (PN) of E17.5 WT (A), *Slit1*^{-/-} (B); *Slit2*^{-/-} (C), *Robo1*^{-/-} (D), *Robo2*^{-/-} (E), *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} (F), *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} (G), and *Phox2b*^{-/-} (H), hybridised with a *Barhl1* probe. No abnormalities are observed in single Slit1-2 or Robo1-2 mutants (B-E), whereas ectopic *Barhl1*⁺ cells posterior to PN are similarly observed near the ventral midline of compound *Robo1*;*Robo2* (F) and *Slit1*;*Slit2* (G) mutant brains (arrows). Similar ectopias are observed in *Phox2b* mutants (arrows in H). (I) lateral (to the left), and ventral (to the right) views of E15.5 *Robo3*^{-/-} brain hybridised with the *Barhl1* probe. Note that the migrating stream of pontine neurons fail to undergo the final ventral migration but instead turn dorsally at the level of the trigeminal nerve (black arrow). In the ventral view, it is evident that pontine neurons fail to reach the ventral midline and form a

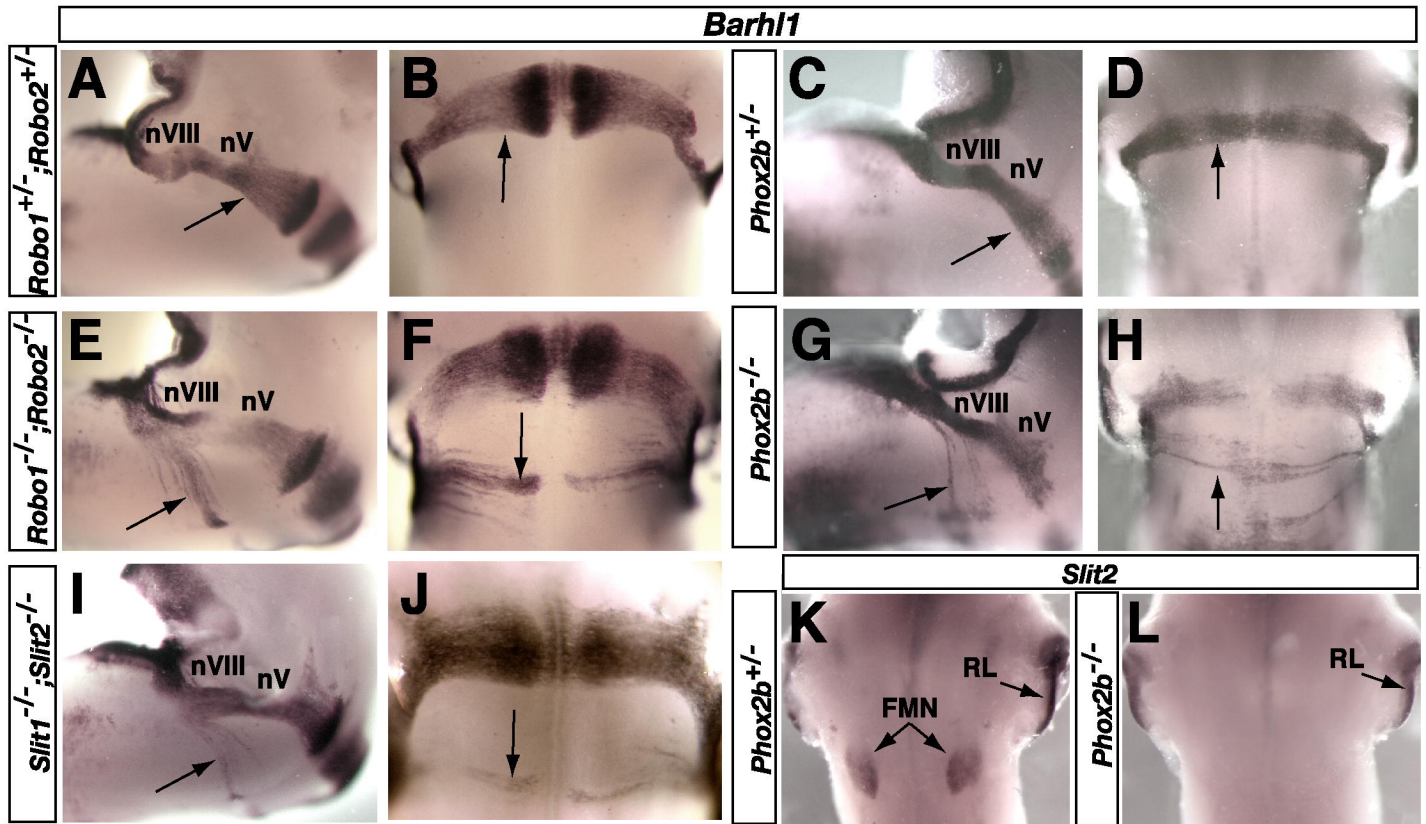
nucleus (see also Marillat et al., 2004). The arrows indicate the turning point of PN as indicated also by the arrow in (I).



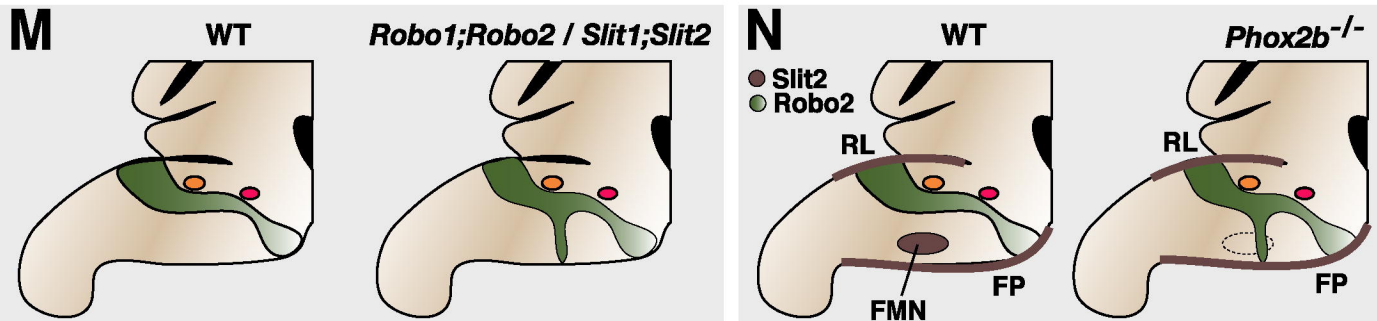


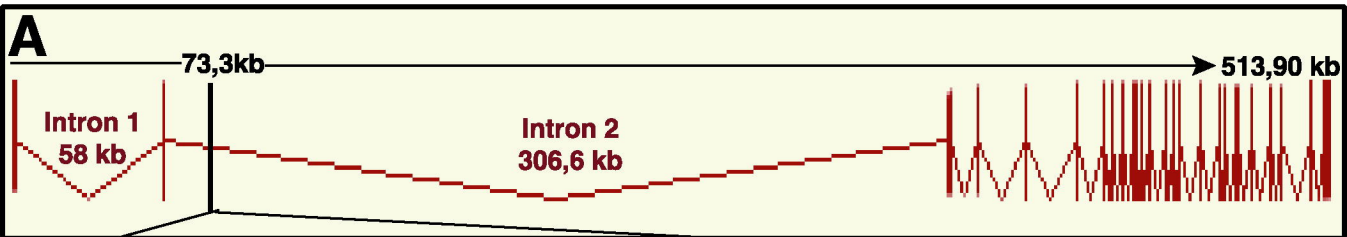






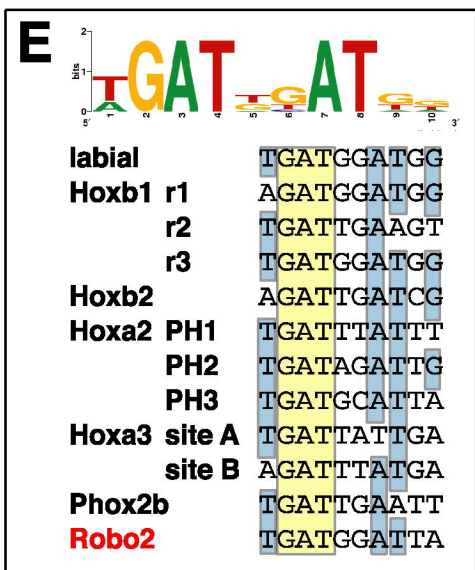
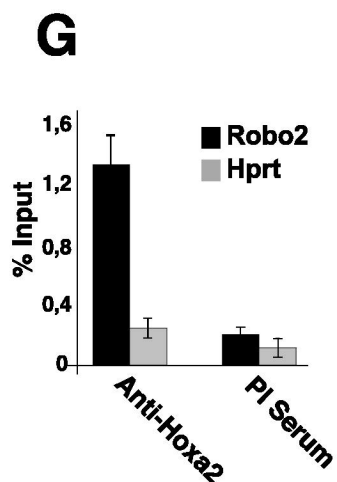
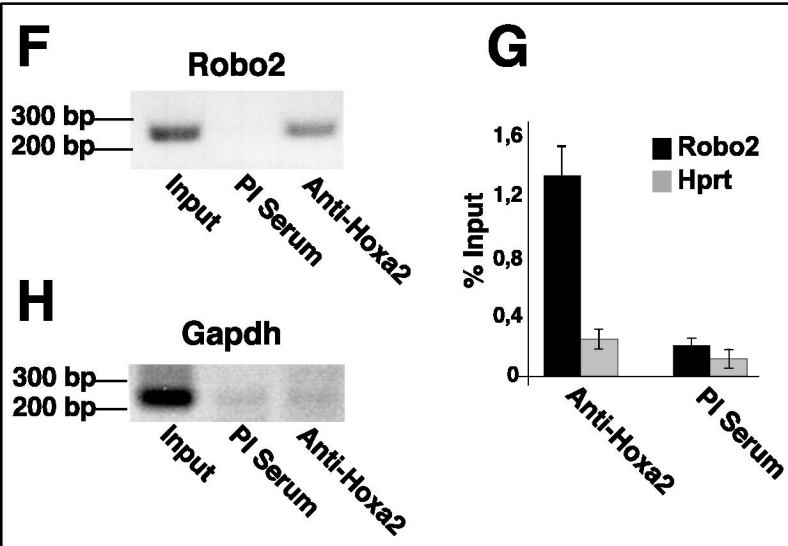
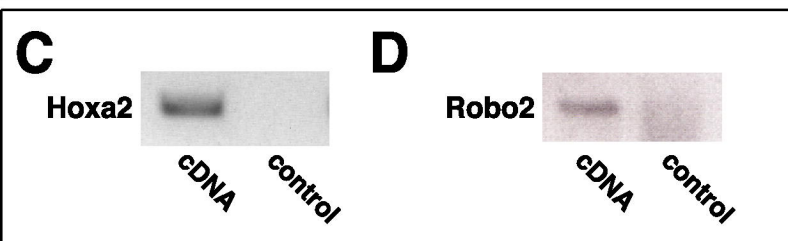
Summary



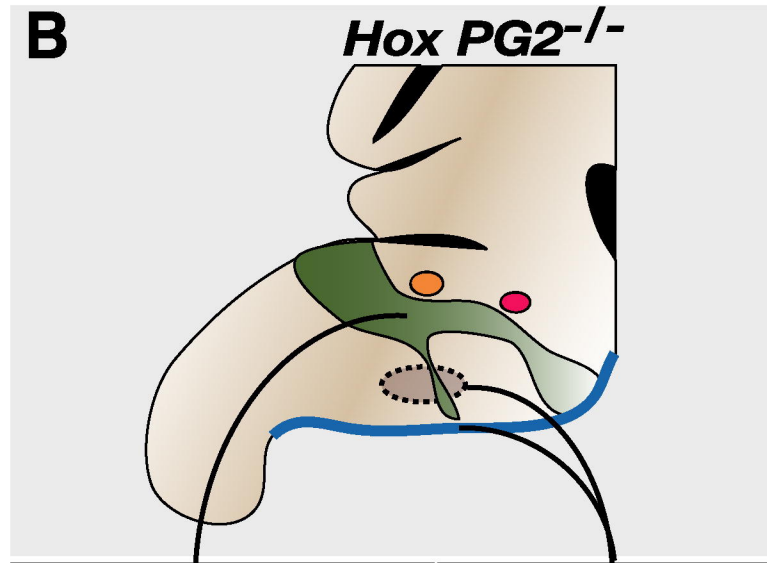
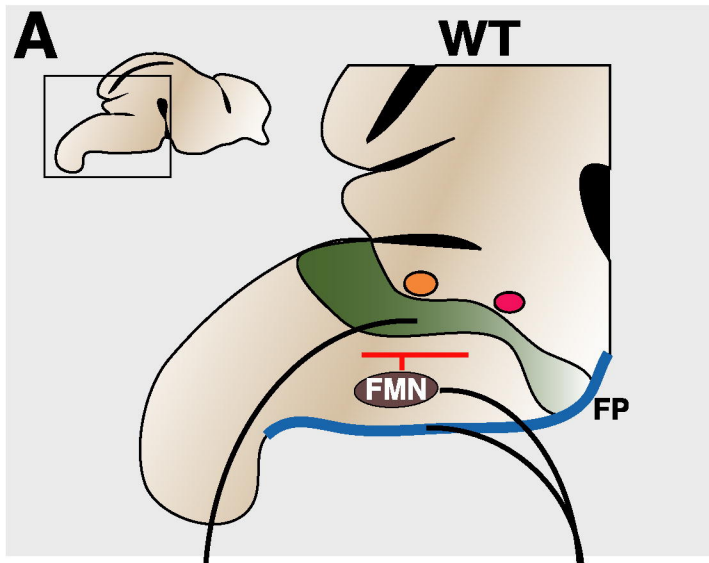


B

| | | |
|-------|---|-----|
| Mouse | AGTCAGTGATTAAACATATTTATTTAGTTCAATGGGTCAGAGCTATTGCGACAGATGGAA | 60 |
| Rat | AGTCAGTGATTAAACATATTTATTTAGTTCAATGGGTCAGAGCTATTGCGACAGATGGAA | 60 |
| Human | AGTCAGTGATTAAACATATTTATTTAGTTCAAGTGGGTCAGAGCTATTGCGACAGATAGAA | 60 |
| | Pbx/Hox | |
| Mouse | AATTACTGATGGATTATCAATTTCAAGTCCCTGTGACATCTGGCCTCCATGTAGTTCATCA | 120 |
| Rat | AATTACTGATGGATTATCAATTTCAAGTCCCTGTGACATCTGGCCTCCATGTAGTTCATCA | 120 |
| Human | AATTACTGATGGATTATCAATTTCAAGCACCTCTGACATCTGGCCTCAGTGTAGTCCATCA | 120 |
| Mouse | TCTGAGGACTCATAACACATTTGCCTGGACAATAACATGCTCAGCTACCTGTGAGATCAC | 180 |
| Rat | TCTGAGGACTCATAACACATTTGCCTGGACAATAACATGCTCAGCTACCTGTGAGATCAC | 180 |
| Human | TCTGAGGACTCATAACACATTTTCTTCAACAATAACATGCTCAGCTACCTGTGTGATCAC | 180 |
| Mouse | AGAGA | 185 |
| Rat | AGAGA | 185 |
| Human | ACAGC | 185 |



Summary Model

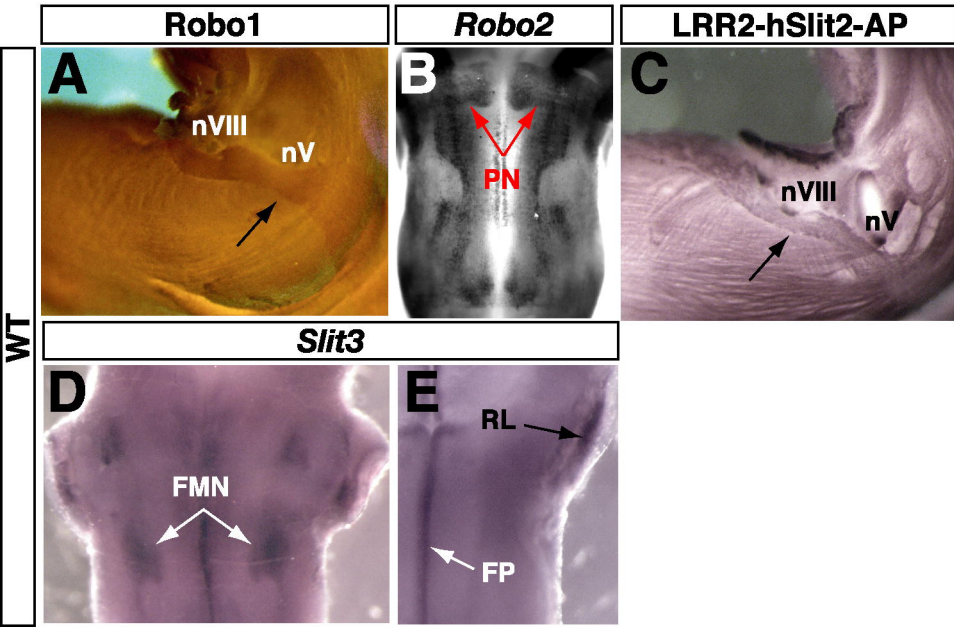


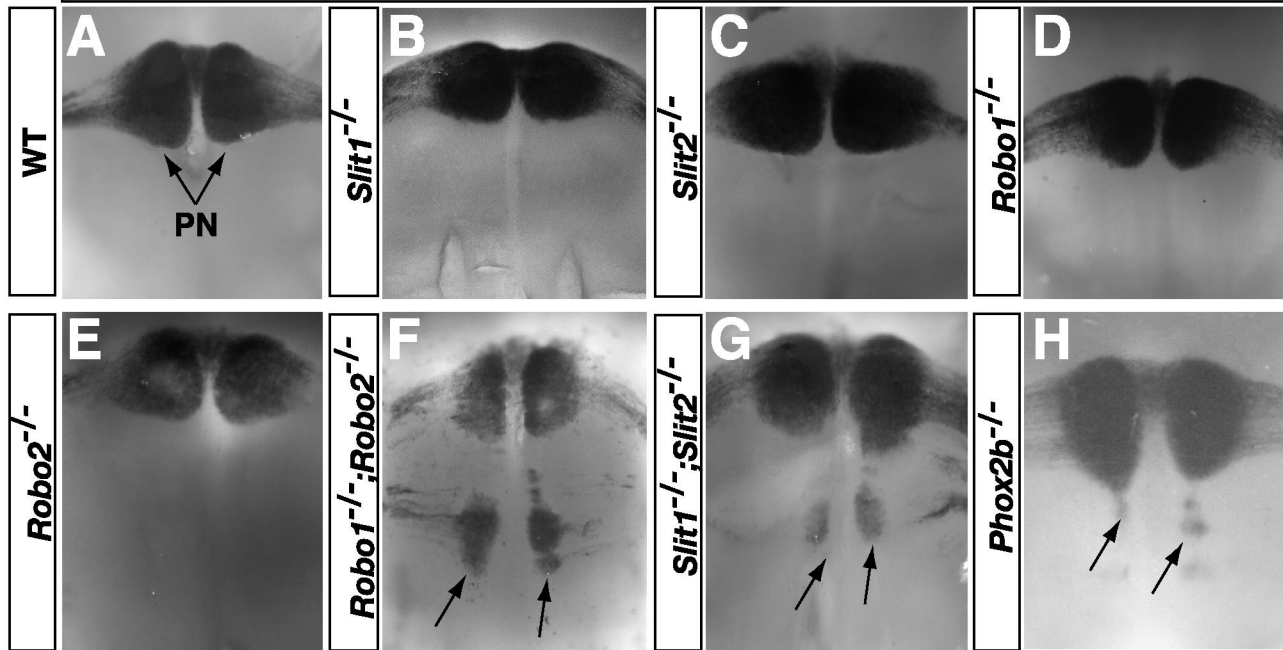
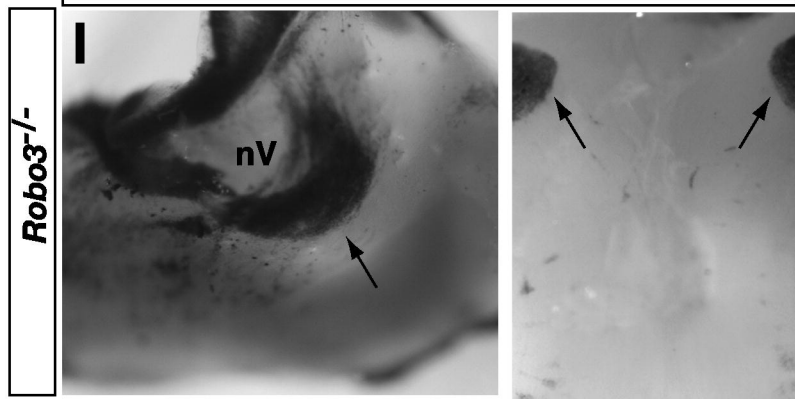
| Migrating PN | | Guidance Cues | |
|--------------|------------|---------------|-----------|
| Hox PG 2 | Robo2 | Floor Plate | Slit1/2/3 |
| Hox PG 3 | Robo1 | | Netrin1 |
| Hox PG 4 | Robo3/Rig1 | FMN | Slit2/3 |
| Hox PG 5 | DCC | | |

| Migrating PN | | Guidance Cues | |
|---------------------|------------------|---------------|--------------------|
| Hox PG 2 | low Robo2 | Floor Plate | Slit1/2/3 |
| Hox PG 3 | Robo1 | | Netrin1 |
| Hox PG 4 | Robo3/Rig1 | FMN | low Slit2/3 |
| Hox PG 5 | DCC | | |

No ventral attraction

Premature ventral attraction



Barhl1**E17.5****E15.5**

Article 4 : Mécanismes moléculaires contrôlant le croisement de la ligne médiane par les neurones précérébelleux en migration

Durant le développement, les neurones précérébelleux (NPC) médullaires migrent tangentiellement depuis les lèvres rhombiques jusqu'à la plaque du plancher. Leur comportement laisse alors supposer qu'ils réagissent différemment aux facteurs de guidage exprimés dans cette région médiane. Les neurones du noyau réticulaire latéral (NRL) et du noyau cuneatus externe (NCE), migrant au sein de la voie marginale postérieure, croisent entièrement la ligne médiane. Ils se distinguent des neurones de l'olive inférieure (OI) qui empruntent une voie de migration sous-marginale et dont seuls les axones croisent la ligne médiane. Leurs corps cellulaires s'arrêtent juste avant la plaque du plancher et s'organisent en plusieurs sous-unités au cours d'une étape de lamellation. L'analyse phénotypique des souris déficientes en Robo3 a révélé que ce récepteur est essentiel pour permettre à ces NPC (axones ou neurones) de franchir la ligne médiane. Il a alors été proposé que Robo3 agisse comme un modulateur négatif de l'activité répulsive des Slits, transmise par les autres récepteurs Robos présents (Marillat et coll., 2004). Cette étude décrit la fonction des récepteurs Robo1 et Robo2 et précise leurs interactions fonctionnelles avec Robo3 dans ce système neuronal. Nous apportons également des données génétiques suggérant que Robo3 coopère avec le système attractif Nétrine1/DCC pour guider les NPC vers la ligne médiane :

- Robo1 et Robo2 sont exprimés dans les neurones du NRL/NCE et de l'OI en migration. Les messagers de Slit1, Slit2 et Slit3 sont notamment détectés dans les cellules de la plaque du plancher et les lèvres rhombiques.
- En l'absence de Slit1/Slit2 ou Robo1/Robo2, certains neurones de l'OI croisent entièrement la plaque du plancher et se positionnent anormalement dans le territoire olivaire controlatéral. La projection vers le cervelet de ces neurones ectopiques est au final ipsilatérale. Les interactions répulsives entre ces partenaires contrôlent donc l'arrêt des corps cellulaires olivaires à la ligne médiane.
- La morphologie de l'OI est partiellement affectée par l'absence de Slit1/Slit2 ou Robo1/Robo2. Les neurones formant l'olive accessoire dorsale (DAO) et la lamelle ventrale de l'olive principale (PO) sont déplacés vers la ligne médiane.
- Chez les souris *robo1*^{-/-} ; *robo2*^{-/-} et *slit1*^{-/-} ; *slit2*^{-/-}, les neurones du NRL/NCE migrent normalement à travers la plaque du plancher. Néanmoins, les noyaux formés au sein du territoire controlatéral sont anormalement fragmentés et étalés.
- Aucun des défauts décrits n'a été observé chez les souris *slit1*^{-/-} et *robo1*^{-/-}. En revanche, les souris *slit2*^{-/-} et *robo2*^{-/-} présentent un phénotype intermédiaire qui reste moins accentué que chez les doubles mutants. L'absence de ces gènes n'est donc que

partiellement compensée par Slit1 ou Robo1. Par ailleurs, les défauts observés chez les souris *robo1^{-/-}* ; *robo2^{-/-}* sont plus importants que chez les souris *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}*. Ceci peut s'expliquer par une action compensatrice de Slit3.

- Dans les neurones de l'OI, les défauts liés à l'absence de Robo3 ne sont pas compensés par la délétion de Robo1 et Robo2. En effet, chez les souris *robo1^{-/-}* ; *robo2^{-/-}* ; *robo1^{-/-}*, la projection des neurones olivaires est entièrement ipsilatérale comme chez les souris *robo3^{-/-}*. Leurs axones n'ont pu franchir la ligne médiane.
- En revanche, les neurones du NRL/NCE croisent au moins partiellement la plaque du plancher en absence de Robo1/Robo2/Robo3. Chez les souris *robo3^{-/-}*, leur incapacité à franchir la ligne médiane est donc bien liée en partie à une activité incontrôlée des récepteurs Robo1 et Robo2.
- En l'absence de DCC une partie des axones olivaires ne parvient pas à franchir la ligne médiane et atteint le cervelet ipsilatéral. De plus, certains des neurones de l'OI s'arrêtent prématurément au cours de leur migration. Leurs corps cellulaires n'atteignent pas la ligne médiane et se positionnent latéralement, tout comme une majorité des neurones du NRL/NCE. Ces NPC ne semblent donc plus sensibles à l'effet attractif de la Nétrine1 exprimée par la plaque du plancher.
- Les récepteurs Robo3 et DCC coopèrent pour guider les neurones olivaires ventralement et leur permettre de se positionner à proximité de la plaque du plancher. En effet, la perte d'un allèle du gène *DCC* chez des souris déficientes en *robo3* entraîne un phénotype très similaire aux souris *DCC^{-/-}*, certains neurones restent bloqués latéralement. De plus, le phénotype des souris *DCC^{-/-}* est fortement aggravé par la délétion complète du gène *robo3*. Aucun neurone olivaire ne parvient alors à rejoindre la ligne médiane ventrale. Ils se regroupent au sein d'un noyau latéral et projettent tous vers la moitié du cervelet ipsilatérale.

L'activité des récepteurs Robos détermine donc la capacité de ces neurones en migration tangentielle à croiser entièrement ou partiellement la plaque du plancher. Elle contrôle notamment l'arrêt de leurs corps cellulaires à la ligne médiane.

Senior Editor: Marie Filbin

Reviewing Editor: Steve Strittmatter

Molecular Mechanism controlling midline crossing by precerebellar neurons

Thomas DiMeglio^{1, 2}, Kim Nguyen-Ba-Charvet^{1, 2}, Marc Tessier-Lavigne³, Constantino Sotelo^{1, 2, 4} and Alain Chédotal^{1, 2, *}

¹ CNRS, UMR 7102, Paris, 75005 France

² Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7102, Paris, 75005 France

³ Genentech Inc., 1 DNA way, South San Francisco, CA 94080, USA

⁴ Cátedra de Neurobiología del Desarrollo “Remedios Caro Almela”, Instituto de Neurociencias de Alicante UMH–CSIC, 03550 San Juan de Alicante, Alicante, Spain

Correspondence: Dr Alain Chédotal; tel: (33) 144273447; fax: (33) 144272669

e-mail: alain.chedotal@snv.jussieu.fr;

Running title: Robo/Slit control the migration of precerebellar neurons

Keywords: cerebellum, inferior olive, floor plate, Roundabout, Slit, DCC, migration

Number of Figures: 14; Number of pages 39

Abstract

Precerebellar neurons of the inferior olive (IO) and lateral reticular nucleus (LRN) migrate tangentially from the rhombic lip toward the floor plate following parallel pathways. This process is thought to involve netrin-1 attraction. However, while the cell bodies of LRN neurons cross the midline, IO neurons are unable to do it. In many systems and species axon guidance and cell migration at the midline is controlled by Slits and their receptor Robos. We showed previously that precerebellar axons and neurons don't cross the midline in absence of Robo3 receptor. To determine if this signaling by Slits and the two other Robo receptors, Robo1 and Robo2 also regulates precerebellar neuron behavior at the floor plate we studied the phenotype of *Slit1/2* and *Robo1/2/3* compound mutants. Our results showed that IO neurons can cross the midline in absence of *Slit1/2* or *Robo1/Robo2* supporting a role for midline-repellent in guiding precerebellar neurons. The analysis of *Robo1/2/3* triple mutants suggests that Robo3 inhibits Robo1/Robo2 repulsion in precrossing LRN neurons but not in IO neurons where it has a dominant role. We also bring genetic evidence suggesting that Robo3 cooperates with the netrin-1 receptor DCC to attract IO neurons and axons toward the floor plate.

Introduction

At all levels of the nervous system a multitude of axons cross the midline, either dorsally or ventrally, to form commissural projections (Williams et al., 2004; Lindwall et al., 2007). Most of the commissures form at very early stages of development as growing axons cross the floor plate or roof plate. However, a variety of midline crossing behaviors is exhibited by neurons and axons. First, many don't cross the midline and those who cross do it only once. Second, most often, only the axons project to the contralateral side, but in some cases cell bodies also cross which ultimately leads to an ipsilateral projection (George et al., 2007; see also below). More rarely, commissures are formed by a migration of neuronal cell bodies across the midline, leaving their axon behind (Simon and Lumsden, 1993). Third, dendrites crossing the midline have also been observed (Furrer et al., 2003; Suli et al., 2006). In addition, even neurons that project ipsilaterally are often connected with axons originating from the other side of the nervous system. The physiological importance of commissures has been clearly demonstrated in most motor and sensory systems where it is used to compare and integrate stimuli coming from both sides of the body and to coordinate movements. In humans, defects in the formation of commissures during development often results in major brain or motor dysfunction (Engle, 2007; Paul et al., 2007).

Midline crossing has been described in virtually all animal species and the molecular mechanisms regulating this process are known to be highly conserved in evolution (Goodman, 1994). Two ligand/receptor couples play a major role in this process: netrin-1/DCC (*deleted in colorectal cancer*) and Slit/roundabout (Robo; Dickson, 2002; Dickson and Gilestro, 2006). *In vitro* experiments and phenotypic analysis of mutant animals deficient for these molecules have shown that slits and

netrin-1, secreted by cells at the midline can repel or attract commissural axons respectively (Kennedy et al., 1994; Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995; Serafini et al., 1996; Fazeli et al., 1997). However, netrin-1 can also repel away from the midline axons expressing UNC-5 receptors, alone or in combination with DCC (Hong et al., 1999; Keleman and Dickson, 2001; Dillon et al., 2007).

In vertebrates, hindbrain precerebellar neurons represent an excellent system for studying the regulation of midline crossing. They all originate from the rhombic lip, a dorsal stripe of neuroepithelium lining the edges of the fourth ventricle (Wingate, 2001). Inferior olivary neurons are the source of the climbing fibers and synapse on Purkinje cell dendrites in the cerebellar cortex. All other hindbrain precerebellar neurons, the lateral reticular nucleus (LRN) the external cuneatus nucleus (ECN) and the pontine neurons (nucleus reticularis tegmenti pontis and basal pontine gray ; PN) send mossy fibers on granule cell dendrites. During development, hindbrain precerebellar neurons migrate tangentially from the rhombic lip toward the floor plate (Bourrat and Sotelo, 1990a, b; Kawauchi et al., 2006). Mossy fiber projection neurons follow a superficial pathway under the pial surface (also called the posterior and anterior precerebellar extramural or marginal migratory streams ; Altman and Bayer, 1987a, b) whereas IO neurons migrate at a short distance from the surface (the intramural or submarginal olivary migratory stream ; Altman and Bayer, 1987c). Upon reaching the floor plate they exhibit distinct behaviors : IO neurons stop and only their axons cross, LRN and ECN neurons entirely cross, most PN neurons stop but some also cross (Figure 1). Netrin-1 was shown to attract all precerebellar neurons toward the midline (Bloch-Gallego et al., 1999; Yee et al., 1999; Causeret et al., 2002). We showed previously that the slit receptor Rig1/Robo3 (hereafter referred to as Robo3), that is expressed on the leading processes of precerebellar neurons until they cross

the floor plate, has a major function in this process (Marillat et al., 2004). All precerebellar neurons are unable to cross the midline in *Robo3*^{-/-} mutant embryos and send their axons into the ipsilateral cerebellum. Robo3 plays a similar role to control midline decussation by spinal cord commissural axons (Sabatier et al., 2004). The current working model is that Robo3 somehow interferes with Slit-mediated repulsion thereby allowing Robo1/2 expressing axons to reach and cross the midline (Long et al., 2004; Sabatier et al., 2004). After crossing, Robo3 expression is turned off and Slits push precerebellar axons away from the midline. The distinct behavior of the different categories of precerebellar neurons could be due to their distinct morphologies, migration timing and possible co-receptors (Marillat et al., 2004). To test the existing model, in particular the contribution of Slit repulsion and of Robo1 and Robo2 receptors, we analyzed here the development of posterior precerebellar neurons (IO, LRN and ECN) in mice deficient for Slit1 and Slit2 or Robo receptors (Plump et al., 2002; Grieshammer et al., 2004; Long et al., 2004). This confirms that Slit1/Slit2 and Robo1/Robo2 prevent IO neurons from crossing the midline and also control the migration of LRN and ECN neurons. However the analysis of *Robo1/Robo2/Robo3* triple mutants suggest that Robo3 does not merely control Robo1 and Robo2 activity but has a distinct function. We also bring genetic evidence supporting an cooperation between Robo3 and DCC in the guidance of precerebellar neurons toward the floor plate.

Materials and Methods

Mice

Swiss mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were used for expression studies. *Slit*-deficient mice and *Robo*-deficient mice were previously described and genotyped by PCR (Plump et al., 2002; Grieshammer et al., 2004; Long et al., 2004; Sabatier et

al., 2004; Fouquet et al., 2007). The day of the vaginal plug was counted as embryonic day 0 (E0), and the day of the birth as postnatal day 0 (P0).

Immunocytochemistry

Until E16, embryos were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer, pH 7.4 (PFA). Older mice were perfused transcardially with 4% PFA, post-fixed for 3 hr and then cryoprotected in 10% sucrose. Cryostat sections were blocked in 0.2% gelatin in PBS containing 0.25% Triton-X100, and incubated overnight at room temperature (RT) with Goat anti-Robo1 (R&D system, Minneapolis, MN), Goat anti-Robo2 (R&D), Rabbit anti-Robo2 (a gift from Dr Murakami, Osaka, Japan; Sabatier et al., 2004), Goat anti-Robo3 (R&D), Rabbit anti- β -galactosidase (ICN/Cappel, Costa Mesa, CA), Rabbit anti-GFP (GFP (Molecular Probes), Chicken anti-GFP (Abcam, Cambridge, UK), Rabbit anti-Brn3.2 (Chemicon-Millipore, Billerica, MA), Rabbit anti-Pax6 (Chemicon-Millipore), Mouse anti-Calbindin_{D28K} (Swant, Switzerland), Goat anti-ALCAM/BEN (R&D), followed by species-specific secondary antibodies directly conjugated to fluorophores (Jackson immunoresearch, West Grove, PA or Molecular Probes-Invitrogen). Sections were examined under a fluorescent microscope (DMR, Leica, Nussloch, Germany) or a confocal microscope (SP5, Leica).

In Situ Hybridization

Antisense riboprobes were labeled with digoxigenin-11-d-UTP (Roche Diagnostics) as described elsewhere (Marillat et al., 2002), by *in vitro* transcription mouse or rat cDNAs encoding *Slit1*, *Slit2*, *Slit3*, *Robo1*, *Robo2* (Brose et al., 1999), *Robo3* (Marillat et al., 2004), *Brn3.2*, *TAG-1*, *Pax6* (de Diego et al., 2002), *Barhl1* (Li et al., 2004) and *Er81* (Zhu and Guthrie, 2002). Tissue sections and whole-mount embryos were

hybridized with digoxigenin-labeled riboprobes as described elsewhere (Marillat et al., 2002; Marillat et al., 2004).

Dil injection

After intracardiac perfusion with 4% PFA, a small occipital craniotomy was performed to expose the cerebellum of E18-P0 mice. A small crystal of lipophilic tracer 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (Dil, Molecular Probes) attached to the tip of a broken glass pipette was applied on one side of the cerebellum. After 2-3 weeks at 37°C in the dark, the brain was dissected out and observed and photographed using a Leica DMR fluorescence microscope (Leica). Some injected brains were also embedded in 2% agarose, and cut in 200µm sections with a vibratome (Leica). The sections were then counterstained in a solution of 10 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma) in PBS for 30 min, rinsed three times in PBS and conserved in 4% PFA.

Results

Expression of Robo receptors in migrating precerebellar neurons

Using *in situ* hybridization we first showed that neurons of the inferior olivary olive (IO neurons) and of the lateral reticular nucleus (LRN) express mRNA encoding *Robo1*, *Robo2* and *Robo3* at E12-E13, during their migration from the rhombic lip (Fig. 2A-C), as previously described (Marillat et al., 2002; Marillat et al., 2004). In *Robo1*-deficient mice, a cassette encoding β-galactosidase (β-gal) was inserted in the *Robo1* locus (Long et al., 2004). Similarly, β-galactosidase-fused with tau was inserted into the *Robo2* locus (Grieshammer et al., 2004). In E13-E15 *Robo1*^{-/-} mice, β-galactosidase immunoreactivity was detected in migrating IO neurons (Fig. 2D),

that also highly expressed the transcription factor Brn3.2 (McEvelly et al., 1996), and in LRN neurons that were not labeled by Brn3.2 antibodies (Fig. 2E; see also Fig.3A-C). Likewise, these neurons also expressed β -galactosidase in E13-E15 *Robo2*^{-/-} mice (Fig. 2F-H). As previously described, Robo3 was highly expressed in all precerebellar neurons during their migration, but was rapidly down regulated after their leading process had crossed the floor plate (Fig. 2C and data not shown ; (Marillat et al., 2004). We could also confirm that mRNAs encoding the three mouse *slit* genes (*Slit1-Slit3*) were expressed during precerebellar neuron migration by floor plate cells in the hindbrain (Supplementary Fig. 1).

Abnormal migration of IO neurons across the floor plate in Robo mutants

We have shown before that all precerebellar neurons and axons are unable to cross the ventral midline in mice deficient for *Robo3* (Marillat et al., 2004); see also Figs 6, 7). By analogy with the current model of Robo3 function in spinal cord commissural axons (Sabatier et al., 2004), we proposed that this phenotype was due to a premature activation of Robo1 and Robo2 receptors by floor plate-derived slits. The validation of this hypothesis first requires showing that Robo1 and Robo2 mediate a repulsive Slit signal for precerebellar neurons. To test this model we analyzed the phenotype of *Robo1*, *Robo2*, *Slit1* and *Slit2* single and double knockout mice. IO neurons were visualized using Brn3.2 immunostaining (Fig.3A-K). LRN neurons were identified using Pax6 immunostaining and hoechst staining (Fig. 3B, C; Engelkamp et al., 1999). These two types of neurons are known to migrate tangentially close to the pial surface of the caudal hindbrain following two parallel and independent routes, just under the pial surface for LRN neurons, and deeper in the brain parenchyma for IO neurons (Fig. 3A, B). While LRN neurons cross the floor plate to settle on the

opposite side of the brain, IO neurons are unable to cross it (Fig. 1C). This distinct behavior could be seen using Brn3.2 and Hoechst double staining. In our working model, Robo1 and 2 cooperate to prevent the cell bodies of IO neurons from crossing the midline. We first quantified the number of Brn3.2 IO neurons that were found inside the midline in wild type, *Slit1/Slit2* and *Robo1/2* knockouts, at E13, when the bulk of IO neurons reaches the floor plate (Fig. 3A-K). The number of IO neurons at the midline was extremely low in wild type (n=3) as well as in *Robo1^{-/-}* (n=4), *Robo2^{+/-}* (n=4) and *Slit1^{-/-}* (n=2) embryos (Fig. 3D, E, F, H, L and not shown). By contrast, there was a significant increase of the number of IO neurons in the midline of *Robo2^{-/-}* (n=4), *Slit2^{-/-}* (n=2) and *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* (n=3) mutants, that reached a maximum in *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (n=3) embryos (Fig.3I-L). In all these knockouts, midline crossing by LRN neurons was always observed (Fig. 3). This result suggested that IO neurons were less sensitive to midline derived slits and may cross the ventral midline. To further demonstrate that some IO neurons cross the midline in *Slit* and *Robo* knockouts, Dil was injected unilaterally in the cerebellum of E18-P0 animals (Marillat et al., 2004). In all wild type (n=3), *Robo1^{-/-}* (n=5), *Slit1^{-/-}* (n=2) and *Slit2^{+/-}* (n=2) mice, a retrograde tracing of the inferior olivary nucleus located on the contralateral side was observed (Fig.4A, D and not shown). IO axons could be clearly visualized as they cross the floor plate in the interolivary commissure. By contrast, an increasing number of Dil labeled IO neurons were always observed on the side of the injection in all *Robo2^{-/-}* (n=2), *Slit2^{-/-}* (n=2) and *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* (n=5) mice (Figure 4B, C, E). This proportion could reach about 40% of the labeled neurons in *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (n=6) mutant embryos (Fig. 4F). This, together with the Brn3.2 immunostaining results, show that in absence of Slit1 and Slit2 or Robo1 and Robo2, many IO neurons can

cross the floor plate. In this system, Robo2 and slit2 repulsive activity appears preponderant but Slit1 and Robo1 also contribute to the repulsion.

Abnormal morphology and lamellation of the inferior olive in Slit and Robo knockouts

In wild type mice the transcription factors Brn3.2 and Er81 (Zhu and Guthrie, 2002; Marillat et al., 2004) are strongly expressed in specific subdivisions of the inferior olivary complex, symmetrically organized on both sides of the floor plate. Three main ION subdivisions can be recognized in all vertebrate species (Azizi and Woodward, 1987), the medial accessory olive (MAO), the dorsal accessory olive (DAO) and the principal olive (PO; Fig.5). All express Brn3.2 but Er81 is not expressed in the MAO (Fig. 5). These can be further subdivided into smaller entities/subnuclei, such as the dorsal lamella and ventral lamella in the case of the DAO (Azizi and Woodward, 1987). In *Slit1/Slit2* and *Robo1/Robo2* single and double mutants, all IO neurons were still found near the floor plate, but the overall morphology of the nuclear complex was modified. In situ hybridization with *Er81* riboprobes showed that the IO was more compact and closer to the midline in *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* (n=4), *Robo2^{-/-}* (n=5), and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (n=6) E18 embryos than in wild type, *Slit1/Slit2* (n=2 for both) and *Robo1* (n=6) single mutants or heterozygous mice (Fig. 5A-D, G-I and not shown). The increased medio-lateral compaction of the IO nucleus was also observed on embryos hybridized with Brn3.2 probes (Fig. 5E-F, J-L). This abnormal structure of the IO complex was even more striking on coronal sections from *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* mutants labeled with Brn3.2 or *Er81*. First, the dorsal lamella of the DAO was more compact and abnormally curved toward the floor plate and second, the MAO was interwoven with the PO (Fig. 5G-M). However, neurons

from the different IO subdivisions were apparently not mixed. This observation was confirmed using immunostaining for Brn3.2, BEN and CaBP, that are known to label IO subnuclei (Supplementary Fig. 2; Wassef et al., 1992; Marillat et al., 2004). At E18, *Robo2* mRNA is more highly expressed in the DAO and dorsal MAO (Supplementary Fig. 2). *Robo2* in situ hybridization on sections from *Slit1/Slit2* double mutants confirmed the abnormal compaction of the DAO (Supplementary Fig. 2). Overall this shows that the final positioning of IO neurons and the lamellation of the inferior olive is at least partially controlled by Slit/Robo signaling.

We next examined whether LRN/ECN neurons were also affected by the absence of Slit1/Slit2 or Robo1/Robo2 using in situ hybridization for *Barhl1*, a transcription factor strongly expressed by these neurons (Li et al., 2004). This showed that even in the *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* double mutants the position of the LRN was still comparable to wild type, although the nucleus was thinner and its size apparently reduced (Supplementary Fig. 3). Likewise ECN neurons were still found at a dorsal position, caudal to the cerebellum (supplementary Fig.4) but in their case the organization/morphology of the nucleus was very perturbed. The ECN morphology did not seem affected in *Slit1^{-/-}* (n=4) and *Robo1^{-/-}* (n=4) single mutants (Supplementary Fig.4) but in *Slit2^{-/-}* (n=2) and *Robo2^{-/-}* (n=4) mutants the nucleus was less compact and more elongated caudally. This caudal extension of the ECN and its fragmentation were much more pronounced in *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* (n=6) and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (n=9) double mutants (Supplementary Fig.4). These results confirm that the migration of precerebellar neurons is controlled by Slit/Robo signaling.

Midline crossing by LRN and IO neurons is not rescued in Robo1/2/3 triple mutants

The current working hypothesis of Robo3 function in hindbrain and spinal cord commissural projections is a negative regulation of Robo1/Robo2-mediated Slit repulsion prior to midline crossing. According to this model Robo3 somehow prevents Slits from activating Robo1/2 receptors during axonal and neuronal migration toward the floor plate. Accordingly, we showed that Robo3 expressing precerebellar axons or neurons are unable to cross the ventral midline in *Robo3*^{-/-} mutants (Marillat et al., 2004; see also Fig. 6G, H) and that many IO neurons abnormally cross it in *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-} double mutants. To try to further confirm this model, we generated *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-}; *Robo3*^{-/-} triple mutants (hereafter referred to as *Robo1/2/3* triple mutants) and analyzed precerebellar neuron migration and axonal projections. As previously described (Marillat et al., 2004) the green fluorescent protein (GFP) was inserted in the *robo3* locus and can be used to identify Robo3 expressing precerebellar neurons at E13 in *Robo3* knockouts, as they reach the floor plate. Migrating IO neurons and LRN neurons can be clearly distinguished in *Robo3*^{+/-} mice, using double immunostaining for GFP and Brn3.2 (Fig. 6A, B). Only Brn3.2 negative/GFP positive LRN neurons cross the floor plate (Fig. 6A, B). The stream of LRN neurons crossing the floor plate could also be visualized with in situ hybridization for *Barhl1* (Fig. 6C). As described above, many IO neurons (Brn3.2 positive/ GFP positive) crossed the floor plate in *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-}; *Robo3*^{+/-} mice (n=2) (Fig. 6D, E), in addition to LRN neurons (Fig.6D-F). By contrast, no GFP processes or neurons were observed at the midline in E13 *Robo3*^{-/-} mutants (n=3), and both LRN and IO neurons were found at an abnormal distance from the floor plate (Fig.6G-H). In *Robo1/2/3* triple mutants (n=2), IO neurons were still able to form a nucleus near the ventral midline but no Brn3.2-positive neurons were found inside the floor plate (Fig. 6J, K) similarly to wild type and *Robo3* single mutant but in contrast with *Robo1/Robo2* double mutants.

Likewise, the number of cell bodies of LRN neurons at the midline was very reduced in *Robo1/2/3* triple mutants (Fig.6J-L) but they were closer to it than in *Robo3* single mutant. In addition, some GFP-positive processes originating from LRN neurons were observed in the floor plate of E13 *Robo1/2/3* triples (Fig. 6J,K). At E15, some *Barhl1*-expressing LRN neurons were observed in the midline (data not shown), suggesting that the *Robo3* phenotype may be partially rescued in *Robo1/2/3* triples. These results suggest that the IO axon midline crossing defects are very similar in *Robo1/2/3* triple mutants and *Robo3* single mutants. This surprising result was confirmed by performing unilateral Dil injection into the cerebellum of *Robo1/2/3* triple mutants. In both *Robo3* single mutant and *Robo1/2/3* triple mutants (n=2), Dil-labeled IO neurons were exclusively located on the injection side (Fig. 7A-D), instead of the opposite side as in wild type animals (compare with Fig. 4A). Therefore, these observations suggest that *Robo3* function in the IO nucleus is not merely to regulate Slit/*Robo1/Robo2* inhibition and may even be dominant over *Robo1/Robo2*. Coronal sections of the inferior olive of E18 *Robo1/2/3* triple mutants labeled with *Er81* probe (n=1), showed that IO lamellation was more profoundly perturbed than in *Robo3* single mutant (Fig 7E-F), thereby suggesting that the three receptors cooperate to control IO nucleogenesis.

Robo3 cooperates with DCC to guide IO neurons toward the floor plate

One alternative explanation for the inability for precerebellar axons and neurons to cross the floor plate in *Robo3* deficient mice could be a lack of attraction of their axons and leading processes by the floor plate. This hypothesis has been ruled out in the case of spinal cord commissural axons (Sabatier et al., 2004); see discussion). The phenotype of *netrin-1* deficient mice and *in vitro* evidence suggest that

precerebellar axons and neurons are attracted toward the floor plate by netrin-1 (Bloch-Gallego et al., 1999; Yee et al., 1999). However, the IO phenotype of *netrin-1* knockouts is complex due to the death of many ION neurons (Llambi et al., 2001). Although LRN and IO neurons express the netrin-1 receptor DCC their development has not been analyzed in *DCC* knockouts. We first labeled E18 inferior olivary neurons in *DCC*^{+/-} (n=6) and *DCC*^{-/-} (n=5) embryos using *in situ* hybridization for *Er81* (Fig. 8A,B,D, E and not shown). This showed that IO neurons were present in *DCC*^{-/-} mice but that the IO nucleus was fragmented in several clusters distributed along the ventral surface of the hindbrain. Only some of the IO neurons were able to reach the floor plate. Therefore, DCC is required to guide IO neurons to the floor plate. To analyze the behavior of *DCC*^{-/-} IO neurons at the floor plate, E13 hindbrain sections were labeled with anti-Brn3.2 and anti-Pax6 antibodies (n=2) and Dil tracing was performed at E18 (n=3). This study revealed that IO neurons do not cross the floor plate in *DCC*^{-/-} embryos (Fig. 9A, B, E, F, H, I). However, Dil-labeled IO neurons, including those in the ectopic clusters, were found on both sides of the floor plate (Fig. 9F). Therefore, the behavior of neurons labeled on the contralateral side resembles wild type IO neurons (cell bodies don't cross but axons cross), but the behavior of ipsilateral IO neurons is abnormal as their axon does not cross the ventral midline, like in *Robo3*^{-/-} mutants. The LRN nucleus was also severely affected in *DCC*^{-/-} mice and reduced to a thin stream of cells at E13 (Fig. 9B) and a few clusters of cells at E18 (Fig.10A, B). Surprisingly coronal sections of the mutant heads at the level of the inner ear, revealed that a stream of Pax6 expressing cells appeared to leave the hindbrain close to the origin of the LRN to invade the surrounding tissue (Fig. 9C, D). These cells also expressed *Barhl1* (data not shown) suggesting that they were misrouted LRN neurons. To determine if Robo3 and DCC cooperate to

guide IO axons to the floor plate, we next crossed *Robo3* and mutants and analyze IO neurons in compound mutants (heterozygotes and homozygotes). The IO nucleus had of normal morphology, position and size in *DCC^{+/-};Robo3^{+/-}* (n= 5) and its projection was entirely crossed like in wild-type (n=2) (Fig. 8A, D and data not shown). Likewise, the phenotype of *DCC^{-/-};Robo3^{+/-}* mice (n=5) was undistinguishable from the *DCC^{-/-}* mutants (Fig. 8G, J and not shown). By contrast the IO nucleus was severely altered in *DCC^{-/-};Robo3^{-/-}* double mutants (Fig. 8I, L): The number of *Er81*-IO neurons was reduced and they were never found near the floor plate but at very dorso-lateral position (n=2). These ectopic IO neurons still projected to the cerebellum (Fig. 9G, J) but exclusively on the side of the injection (n=2). Last, whereas all *Er81*-positive IO neurons reached the floor plate in *Robo3^{-/-}* mutants (Fig. 8C, F), clusters of ectopic IO neurons were observed laterally in *DCC^{+/-};Robo3^{-/-}* embryos (n=3) (Fig. 8H, K) a phenotype resembling the one of *DCC^{-/-}* embryos. This result, together with the aborted migration of IO neurons in *DCC/Robo3* double mutants provide genetic evidence supporting an interaction between these receptors of their signaling pathway during IO neuron migration toward the ventral midline.

Last, the LRN defects in *DCC^{-/-};Robo3^{-/-}* double mutants (n=2) were similar to *DCC^{-/-}* mutants (n=4) or *DCC^{-/-};Robo3^{+/-}* (n=1) but the LRN seemed normal in *DCC^{+/-};Robo3^{-/-}* mutants (Fig.10B, C).

Discussion

Slit/Robo interactions prevent IO neurons from crossing the midline

His (1890) first proposed that in human embryos, inferior olivary neurons are generated dorsally in the rhombic lip and migrate ventrally (Altman and Bayer, 1978). This observation was confirmed experimentally in chick embryos (Harkmark, 1954) and by birthdating studies in rodents (Ellenberger et al., 1969; Altman and Bayer, 1978, 1985). Slice culture experiments showed that tangentially migrating inferior olivary neurons send a long leading process across the midline but that their cell body always stays ipsilateral (Bourrat and Sotelo, 1988). The leading process of IO neurons transforms into an axon that approaches the cerebellum as the cell body reaches to the floor plate (Wassef et al., 1992). The floor plate was then proposed to attract ventrally migrating precerebellar neurons (Bourrat and Sotelo, 1990a), a process later shown to involve DCC/netrin-1 chemoattraction (Bloch-Gallego et al., 1999; Yee et al., 1999; Causeret et al., 2002). However, the molecular mechanism that stops IO cell bodies at the floor plate is unknown, and there was so far no evidence of midline crossing by IO neurons in any mutant mice.

In many animal species, Slit/Robo signaling controls midline crossing by a variety of commissural and longitudinal axons (Dickson, 2002; Fouquet et al., 2007). In *Drosophila* embryos, Slit/Robo signaling also prevents tracheal, sensory precursor cells and cardiac cells from approaching the midline (Lundstrom et al., 2004; Orgogozo et al., 2004; Santiago-Martinez et al., 2006). However, in vertebrates, a similar function for slit/Robo in the control of neuronal migration at the midline had never been demonstrated. We show here that some ION neurons can cross the floor plate in mice deficient for Slit2, Robo2, Robo1 and Robo2 or Slit1/Slit2. This number is maximum in Robo1/Robo2 double mutants where it represents up to 40% of the Dil-labeled IO neurons. IO neurons were also shown to express Robo1 and Robo2 receptors during their ventral migration. The absence of obvious axon guidance

defects in *Robo1/Robo2* mutants (see below) strongly suggest that in this system they primarily control migration but not axon guidance. Therefore, these results support a simple model according to which the binding of Slits, released by the floor plate, on *Robo1/2* expressing IO neurons force their cell body to stay on the ipsilateral side. Although the phenotype is stronger in *Robo1/Robo2* double mutants, some IO neurons also cross in *Robo2* singles. Therefore, *Robo2* appears to have the strongest repulsive activity in this system, but *Robo1* cooperates with *Robo2* to prevent crossing. However, the *Robo1* knockout line used here was obtained by gene trap method and may be only be an hypomorphic allele (Long et al., 2004; Fouquet et al., 2007). Accordingly, their telencephalon has a milder phenotype than another line obtained by classic gene targeting method (Andrews et al., 2006; Lopez-Bendito et al., 2007). It would be important to compare the IO development of the two *Robo1* lines. Although, in many types of commissural axons, *Robo1* and *Robo2* were also shown to act redundantly (Fouquet et al., 2007; Lopez-Bendito et al., 2007), *Robo1* is the major repulsive receptor in spinal cord commissural axons (Long et al., 2004). Our data suggest that in IO neurons, *Robo2*-mediated repulsion prevails over *Robo1*. The IO neuron crossing defects are also stronger in *Slit1/Slit2* double mutants than in the *Slit1* and *Slit2* single mutants but more moderate than in *Robo1/Robo2* double mutants. This suggests that some floor plate repellent, most likely *Slit3* is still detected by IO neurons, as previously observed in the spinal cord (Long et al., 2004).

IO neurons are also labeled on both sides of the floor plate in *DCC*^{-/-} embryos, like in *Robo1/Robo2* double mutants, but in this case, IO neuron were not found in the floor plate demonstrating that in *DCC* mutants, ipsilaterally traced neurons projected their axons on the ipsilateral side, like in *Robo3* mutants. Ipsilateral IO axons were

previously detected in *netrin-1* knockout (Bloch-Gallego et al., 1999) and our data suggest that they did not cross the floor plate.

Surprisingly, in all the knockout lines analyzed here, IO axons always manage to project to the cerebellum, suggesting that neither Slit/Robo nor Netrin/DCC control the guidance of IO axons after crossing the midline. Unfortunately, the double Slit1/Slit2 and Robo1/Robo2 knockouts die too early to determine if later in development, these ligands/receptors control IO axon targeting in the cerebellar cortex.

Although, our results demonstrate that Slit binding to Robo1 and Robo2 is the major ligand/receptor system controlling midline crossing by IO neurons, one important remaining issue is to understand the cellular and molecular mechanism downstream of Robo receptors that can selectively block the translocation of IO nucleus before the floor plate. Using the available anti-Robo1 and Robo2 antibodies we were not able to determine if their cell membrane distribution is compartmentalized along IO axons, as described for *Drosophila* commissural axons (Kidd et al., 1998; Keleman et al., 2005). However, in *Drosophila*, this heterogenous expression requires *commissureless*, a gene that does not seem to have vertebrate homologues (Keleman et al., 2005).

Slit/Robo signaling and IO lamellation

Our results also show that Slit/Robo signaling control the migration of LRN and ECN neurons. We previously proposed that these neurons are repelled by Slits only after crossing the midline, and that a shorter leading process may partially explain why they are able to cross the floor plate (Marillat et al., 2004). In addition, the different type of precerebellar neurons may not express the same set of axon guidance

receptors. Accordingly, LRN neurons don't seem to express UNC-5H2 receptors, contrary to IO neurons (Bloch-Gallego et al., 1999). Our observations also suggest that Slit/Robo control the final positioning of LRN and ECN neurons that are not properly distributed in *Slit1/Slit2* and *Robo1/Robo2* knockouts.

This may be also for IO neurons. In *Slit* and *Robo* mutants, the IO complex is disorganized: although neurons are able to reach the ventral midline, the morphology of the three main IO subdivision is abnormal. This is particularly striking for the DAO that appears flipped over dorsally toward the floor plate, and the MAO that protrudes inside the PO. Furthermore, the different IO subdivisions are almost impossible to delimit in *Robo1/2/3* triple mutants. The aggregation of IO neurons and the formation of the distinct lamella is a late process and ³H-thymidine studies have shown that the position of IO neurons in the nucleus depends on their birthdate (Bourrat and Sotelo, 1991). DAO neurons are born first and are also the one that are the most affected in *Slit/Robo* mutants. However, before IO subdivisions adopt their final morphology they already express different combination of proteins (Wassef et al., 1992), including axon-guidance molecules and receptors (Chedotal et al., 1996; Nishida et al., 2002; Backer et al., 2007) and cell-cell interaction and specific adhesive properties are supposed to controlled IO neuron aggregation. Interestingly, mice lacking the Rho-Guanine exchange factor (GEF) Trio exhibit IO lamellation defects resembling those observed in *Robo1/Robo2* and *Slit1/Slit2* mutants (Backer et al., 2007). Neurons of the DAO that are the most severely affected, were shown to strongly express Cadherin-11 (Backer et al., 2007) but also Robo2 (this study). Robo was previously found to inhibit N-cadherin-mediated adhesion (Rhee et al., 2002) and in *C.elegans*, UNC-73, the TRIO homologue, was recently shown to bind and modulate the repulsive activity of SAX-3 (Watari-Goshima et al., 2007). These data suggest that in

addition to controlling midline crossing, Robo receptors influence IO nucleogenesis via homophilic and heterophilic interactions (Hivert et al., 2002; Camurri et al., 2005) or by modulating cadherin-mediated cell adhesion. This could also be the case for LRN and ECN neurons whose migration is also controlled by cadherins (Taniguchi et al., 2006) and are less compact in absence of Slit/Robo signaling.

Robo3 does not inhibit Robo1/Robo2 repulsive activity in IO neurons

Robo3 has been proposed to block Slit-mediated repulsion thereby allowing IO axons and LRN and ECN neurons to cross the floor plate (Marillat et al., 2004). Although our data support a role for Robo1 and Robo2 in IO neuron repulsion at the midline they also suggest that Robo3 does not directly control this process. If this were the case, then one should have expected to find the same midline crossing defects in *Robo1/Robo2/Robo3* triple mutants than in *Robo1/Robo2* double mutants. However, they are more similar to *Robo3* mutants, as no IO commissure develops. This brings genetic evidence that in this system, Robo3 functions independently of Robo1/Robo2 to guide IO axons toward the midline. Robo3 function is dominant and in its absence no IO axon can cross the midline. Several Robo3 splice variants have been described in vertebrates (Yuan et al., 1999; Jen et al., 2004; Camurri et al., 2005; Challa et al., 2005). Robo3 isoforms A and B, differ in their N-terminal portion, that contains 26 additional amino acids in Robo3A (Camurri et al., 2005). These two isoforms seem to have distinct functions in zebrafish (Challa et al., 2005). More recently it was shown (Chen et al., 2007) that exists a Robo3.2 isoform differing from a Robo3.1 isoform by the insertion of 43 residues in the cytoplasmic domain. Interestingly, in spinal cord commissural axons, Robo3.1 is expressed before crossing and appears to block Robo1 inhibition while Robo3.2 is expressed after

crossing and cooperates with Robo1 and Robo2 to repel commissural axons from the floor plate. By contrast with the IO system, the absence of midline crossing by LRN neurons appears at least partially rescued in absence of Robo1 and Robo2, which would argue in favor of our initial Robo3 model of action (Marillat et al., 2004). This confirms, that different precerebellar neurons use different molecular strategies to cross the midline. It will be important to analyze the expression of all Robo3 isoforms in precerebellar neurons, but in any case our *Robo3* knockouts lack all Robo3 isoforms. It will also be important to determine if IO axons can recross if Slit1/Slit2 are deleted in a Robo3 mutant background. The absence of rescue would suggest that Robo3 function does not require Slits. Preliminary binding data performed in our laboratory (A. Chédotal, C. Fouquet unpublished data) suggest that Sli1-3 are unable to bind any of the Robo3 isoforms (see below) in contrast with previous and contradictory reports (Camurri et al., 2004; Sabatier et al., 2004; Camurri et al., 2005), thereby suggesting that Robo3 may have other ligands.

Robo3 cooperates with DCC to attract PCN neurons toward the midline

This study and others have shown that netrin-1/DCC and Robo3 are key regulators of axon guidance and neuronal migration in the precerebellar system. We show here that in absence of DCC, IO, LRN and ECN neurons do not migrate properly. Clusters of IO neurons are unable to reach the floor plate and they project either ipsilaterally or contralaterally. This shows that DCC controls migration and axon guidance in this system. The number of IO neurons does not seem to be reduced in DCC mutants which would support the idea that IO neuron cell death observed in Netrin-1 knockout embryos is due to the absence of netrin-1 inducing a pro-apoptotic activity of its receptor DCC (Bloch-Gallego et al., 1999; Llambi et al., 2001). Despite the presence

of ectopic clusters, many IO neurons manage to migrate ventrally in *DCC*^{-/-} mice suggesting that additional molecular mechanism attract IO neurons toward the floor plate. In the spinal cord, commissural axons are also attracted by Sonic hedgehog (Shh) upon binding the Boc receptor (Charron et al., 2003; Okada et al., 2006) but it is unknown if the same mechanisms plays a role at other brain levels. Our results suggest that precerebellar commissural axons use a different attraction system, as the simultaneous absence of Robo3 and DCC is sufficient to prevent all IO neurons or their axons to move toward the floor plate. Furthermore, the similarity of the IO defects in *DCC*^{-/-} and *DCC*^{+/-};*Robo3*^{-/-} mutant mice brings genetic evidence supporting a direct cooperation between these two receptors to mediate floor plate attraction of IO neurons. In the presence of Slit, Robo1 was shown before to interact with DCC, which results in the inhibition of netrin-1 attraction (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). This involves binding of the CC1 cytoplasmic domain of Robo1 to the P3 cytoplasmic domain of DCC. Robo3, whatever the isoform, does not have a CC1 domain (Yuan et al., 1999), suggesting that it is unable to bind to DCC (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). However, our data indicate that Robo3 and DCC may interact and preliminary coimmunoprecipitation experiments (Y. Zagar, A. Chedotal, unpublished data) support this conclusion. Likewise, in *C. elegans*, direct and indirect interaction between SAX-3 and UNC-40 signaling pathways have been described (Chang et al., 2004; Watari-Goshima et al., 2007). One tempting hypothesis is that Robo3/DCC interaction would directly control IO neuron responsiveness to floor plate long-range attraction. In absence of robust and reproducible in vitro assay allowing to monitor the growth of IO axons this hypothesis can't be easily tested. Slits would act at short-range to control midline crossing by precerebellar neurons.

Our observations also suggest that in *DCC*^{-/-} mice, LRN neurons migrate out of the CNS to invade the adjacent sensory ganglia. This result is very unexpected and is reminiscent of the motor neuron emigration caused by the ablation of boundary cap cells in the spinal cord (Vermeren et al., 2003). It is unclear if this LRN emigration from the hindbrain involves netrin-1 signaling or is caused by other developmental defects in the periphery.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Marion Wassef (Ecole Normale Supérieure, Paris, France) and F. Qiu (UMDNJ, Piscataway, USA) for giving us various cDNAs. This work is supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and the Fondation pour la Recherche Médicale (programme équipe FRM) to A. C. T.D. was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (MRT). M.T.L. was supported by the Howard Hughes Medical Institute.

References

- Altman J, Bayer SA (1978) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. II. Cytogenesis and histogenesis of the inferior olive, pontine gray, and the precerebellar reticular nuclei. *J Comp Neurol* 179:49-75.
- Altman J, Bayer SA (1985) Embryonic development of the rat cerebellum. III. Regional differences in the time of origin, migration, and settling of Purkinje cells. *J Comp Neurol* 231:42-65.
- Altman J, Bayer SA (1987a) Development of the precerebellar nuclei in the rat: IV. The anterior precerebellar extramural migratory stream and the nucleus reticularis tegmenti pontis and the basal pontine gray. *J Comp Neurol*

257:529-552.

Altman J, Bayer SA (1987b) Development of the precerebellar nuclei in the rat: III.

The posterior precerebellar extramural migratory stream and the lateral reticular and external cuneate nuclei. *J Comp Neurol* 257:513-528.

Altman J, Bayer SA (1987c) Development of the precerebellar nuclei in the rat: II.

The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J Comp Neurol* 257:490-512.

Andrews W, Liapi A, Plachez C, Camurri L, Zhang J, Mori S, Murakami F, Parnavelas

JG, Sundaresan V, Richards LJ (2006) Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. *Development* 133:2243-2252.

Azizi SA, Woodward DJ (1987) Inferior olivary nuclear complex of the rat:

morphology and comments on the principles of organization within the olivocerebellar system. *J Comp Neurol* 263:467-484.

Backer S, Hidalgo-Sanchez M, Offner N, Portales-Casamar E, Debant A, Fort P,

Gauthier-Rouviere C, Bloch-Gallego E (2007) Trio controls the mature organization of neuronal clusters in the hindbrain. *J Neurosci* 27:10323-10332.

Bloch-Gallego E, Ezan F, Tessier-Lavigne M, Sotelo C (1999) Floor plate and netrin-

1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J Neurosci* 19:4407-4420.

Bourrat F, Sotelo C (1988) Migratory pathways and neuritic differentiation of inferior

olivary neurons in the rat embryo. Axonal tracing study using the in vitro slab technique. *Brain Res* 467:19-37.

Bourrat F, Sotelo C (1990a) Early development of the rat precerebellar system:

migratory routes, selective aggregation and neuritic differentiation of the

- inferior olive and lateral reticular nucleus neurons. An overview. *Arch Ital Biol* 128:151-170.
- Bourrat F, Sotelo C (1990b) Migratory pathways and selective aggregation of the lateral reticular neurons in the rat embryo: a horseradish peroxidase in vitro study, with special reference to migration patterns of the precerebellar nuclei. *J Comp Neurol* 294:1-13.
- Bourrat F, Sotelo C (1991) Relationships between neuronal birthdates and cytoarchitecture in the rat inferior olivary complex. *J Comp Neurol* 313:509-521.
- 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.
- Camurri L, Mambetisaeva E, Sundaresan V (2004) Rig-1 a new member of Robo family genes exhibits distinct pattern of expression during mouse development. *Gene Expr Patterns* 4:99-103.
- Camurri L, Mambetisaeva E, Davies D, Parnavelas J, Sundaresan V, Andrews W (2005) Evidence for the existence of two Robo3 isoforms with divergent biochemical properties. *Mol Cell Neurosci* 30:485-493.
- Causeret F, Danne F, Ezan F, Sotelo C, Bloch-Gallego E (2002) Slit antagonizes netrin-1 attractive effects during the migration of inferior olivary neurons. *Dev Biol* 246:429-440.
- Challa AK, McWhorter ML, Wang C, Seeger MA, Beattie CE (2005) Robo3 isoforms have distinct roles during zebrafish development. *Mech Dev* 122:1073-1086.
- Chang C, Yu TW, Bargmann CI, Tessier-Lavigne M (2004) Inhibition of netrin-mediated axon attraction by a receptor protein tyrosine phosphatase. *Science*

305:103-106.

- Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M (2003) The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113:11-23.
- Chedotal A, Pourquie O, Ezan F, San Clemente H, Sotelo C (1996) BEN as a presumptive target recognition molecule during the development of the olivocerebellar system. *J Neurosci* 16:3296-3310.
- Chen Z., Gore B. and Tessier-Lavigne M. (2007) Alternatively spliced robo3/rig1 isoforms contribute to switching axonal responses at the CNS midline. Society for Neuroscience, abstract 460.18/F8.
- Colamarino SA, Tessier-Lavigne M (1995) The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81:621-629.
- de Diego I, Kyriakopoulou K, Karagogeos D, Wassef M (2002) Multiple influences on the migration of precerebellar neurons in the caudal medulla. *Development* 129:297-306.
- Dickson BJ (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298:1959-1964.
- Dickson BJ, Gilestro GF (2006) Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:651-675.
- Dillon AK, Jevince AR, Hinck L, Ackerman SL, Lu X, Tessier-Lavigne M, Kaprielian Z (2007) UNC-5C is required for spinal accessory motor neuron development. *Mol Cell Neurosci* 35:482-489.
- Ellenberger C, Jr., Hanaway J, Netsky MG (1969) Embryogenesis of the inferior olivary nucleus in the rat: a radioautographic study and a re-evaluation of the rhombic lip. *J Comp Neurol* 137:71-79.

- Engelkamp D, Rashbass P, Seawright A, van Heyningen V (1999) Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* 126:3585-3596.
- Engle EC (2007) Oculomotility disorders arising from disruptions in brainstem motor neuron development. *Arch Neurol* 64:633-637.
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386:796-804.
- Fouquet C, Di Meglio T, Ma L, Kawasaki T, Long H, Hirata T, Tessier-Lavigne M, Chedotal A, Nguyen-Ba-Charvet KT (2007) Robo1 and robo2 control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* 27:3037-3045.
- Furrer MP, Kim S, Wolf B, Chiba A (2003) Robo and Frazzled/DCC mediate dendritic guidance at the CNS midline. *Nat Neurosci* 6:223-230.
- George L, Chaverra M, Todd V, Lansford R, Lefcort F (2007) Nociceptive sensory neurons derive from contralaterally migrating, fate-restricted neural crest cells. *Nat Neurosci*.
- Goodman CS (1994) The likeness of being: phylogenetically conserved molecular mechanisms of growth cone guidance. *Cell* 78:353-356.
- Grieshammer U, Le M, Plump AS, Wang F, Tessier-Lavigne M, Martin GR (2004) SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 6:709-717.
- Harkmark W (1954) Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons; a morphological and experimental investigation on chick embryos. *J Comp Neurol* 100:115-209.
- His W. (1890) Die entwicklung des menschlichen Rautenhirns vom ende des ersten

bis zum beginn des dritten monats. I. Verlangertes Mark. Abh. Kg. Sächs Ges. Wissensch., Math. Phys. Kl. 29 :1-74.

Hivert B, Liu Z, Chuang CY, Doherty P, Sundaresan V (2002) Robo1 and Robo2 are homophilic binding molecules that promote axonal growth. *Mol Cell Neurosci* 21:534-545.

Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97:927-941.

Jen JC, Chan WM, Bosley TM, Wan J, Carr JR, Rub U, Shattuck D, Salamon G, Kudo LC, Ou J, Lin DD, Salih MA, Kansu T, Al Dhalaan H, Al Zayed Z, MacDonald DB, Stigsby B, Plaitakis A, Dretakis EK, Gottlob I, Pieh C, Traboulsi EI, Wang Q, Wang L, Andrews C, Yamada K, Demer JL, Karim S, Alger JR, Geschwind DH, Deller T, Sicotte NL, Nelson SF, Baloh RW, Engle EC (2004) Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science* 304:1509-1513.

Kawauchi D, Taniguchi H, Watanabe H, Saito T, Murakami F (2006) Direct visualization of nucleogenesis by precerebellar neurons: involvement of ventricle-directed, radial fibre-associated migration. *Development* 133:1113-1123.

Keleman K, Dickson BJ (2001) Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* 32:605-617.

Keleman K, Ribeiro C, Dickson BJ (2005) Comm function in commissural axon guidance: cell-autonomous sorting of Robo in vivo. *Nat Neurosci* 8:156-163.

Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are

- diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78:425-435.
- Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92:205-215.
- Li S, Qiu F, Xu A, Price SM, Xiang M (2004) Barhl1 regulates migration and survival of cerebellar granule cells by controlling expression of the neurotrophin-3 gene. *J Neurosci* 24:3104-3114.
- Lindwall C, Fothergill T, Richards LJ (2007) Commissure formation in the mammalian forebrain. *Curr Opin Neurobiol* 17:3-14.
- Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *Embo J* 20:2715-2722.
- Long H, Sabatier C, Ma L, Plump A, Yuan W, Ornitz DM, Tamada A, Murakami F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M (2004) Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42:213-223.
- Lopez-Bendito G, Flames N, Ma L, Fouquet C, Di Meglio T, Chedotal A, Tessier-Lavigne M, Marin O (2007) Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain. *J Neurosci* 27:3395-3407.
- Lundstrom A, Gallio M, Englund C, Steneberg P, Hemphala J, Aspenstrom P, Keleman K, Falileeva L, Dickson BJ, Samakovlis C (2004) Vilse, a conserved Rac/Cdc42 GAP mediating Robo repulsion in tracheal cells and axons. *Genes Dev* 18:2161-2171.
- Marillat V, Cases O, Nguyen-Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chedotal

- A (2002) Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* 442:130-155.
- Marillat V, Sabatier C, Failli V, Matsunaga E, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chedotal A (2004) The slit receptor Rig-1/Robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. *Neuron* 43:69-79.
- McEvelly RJ, Erkman L, Luo L, Sawchenko PE, Ryan AF, Rosenfeld MG (1996) Requirement for Brn-3.0 in differentiation and survival of sensory and motor neurons. *Nature* 384:574-577.
- Nishida K, Flanagan JG, Nakamoto M (2002) Domain-specific olivocerebellar projection regulated by the EphA-ephrin-A interaction. *Development* 129:5647-5658.
- 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.
- Orgogozo V, Schweisguth F, Bellaïche Y (2004) Slit-Robo signalling prevents sensory cells from crossing the midline in *Drosophila*. *Mech Dev* 121:427-436.
- Paul LK, Brown WS, Adolphs R, Tyszka JM, Richards LJ, Mukherjee P, Sherr EH (2007) Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci* 8:287-299.
- Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, Mason CA, Tessier-Lavigne M (2002) Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33:219-232.
- Rhee J, Mahfooz NS, Arregui C, Lilien J, Balsamo J, VanBerkum MF (2002) Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated

- cell adhesion. *Nat Cell Biol* 4:798-805.
- 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.
- Santiago-Martinez E, Soplop NH, Kramer SG (2006) Lateral positioning at the dorsal midline: Slit and Roundabout receptors guide *Drosophila* heart cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12441-12446.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001-1014.
- Simon H, Lumsden A (1993) Rhombomere-specific origin of the contralateral vestibulo-acoustic efferent neurons and their migration across the embryonic midline. *Neuron* 11:209-220.
- 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.
- Suli A, Mortimer N, Shepherd I, Chien CB (2006) Netrin/DCC signaling controls contralateral dendrites of octavolateralis efferent neurons. *J Neurosci* 26:13328-13337.
- Taniguchi H, Kawauchi D, Nishida K, Murakami F (2006) Classic cadherins regulate tangential migration of precerebellar neurons in the caudal hindbrain. *Development* 133:1923-1931.
- Vermeren M, Maro GS, Bron R, McGonnell IM, Charnay P, Topilko P, Cohen J (2003) Integrity of developing spinal motor columns is regulated by neural

crest derivatives at motor exit points. *Neuron* 37:403-415.

Wassef M, Chedotal A, Cholley B, Thomasset M, Heizmann CW, Sotelo C (1992) Development of the olivocerebellar projection in the rat: I. Transient biochemical compartmentation of the inferior olive. *J Comp Neurol* 323:519-536.

Watari-Goshima N, Ogura K, Wolf FW, Goshima Y, Garriga G (2007) *C. elegans* VAB-8 and UNC-73 regulate the SAX-3 receptor to direct cell and growth-cone migrations. *Nat Neurosci* 10:169-176.

Williams SE, Mason CA, Herrera E (2004) The optic chiasm as a midline choice point. *Curr Opin Neurobiol* 14:51-60.

Wingate RJ (2001) The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol* 11:82-88.

Yee KT, Simon HH, Tessier-Lavigne M, O'Leary DM (1999) Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* 24:607-622.

Yuan SS, Cox LA, Dasika GK, Lee EY (1999) Cloning and functional studies of a novel gene aberrantly expressed in RB-deficient embryos. *Dev Biol* 207:62-75.

Zhu Y, Guthrie S (2002) Expression of the ETS transcription factor ER81 in the developing chick and mouse hindbrain. *Dev Dyn* 225:365-368.

Figure Legends

Figure 1

Organization of the IO and LRN projections.

A, Schematic representation of the migration pathways (dashed lines) and projections of IO neurons (green) and LRN neurons (purple) to the cerebellum (ce).

These neurons come from the rhombic lip and migrate ventrally toward the floor plate (fp). The cell bodies of IO neurons stop at the ventral midline while LRN neurons cross it. B, C whole mount (B; ventral side) or coronal section (C) of E18 mouse embryos injected with DiA in the right side of the cerebellum and Dil in the left side. IO neurons are labeled on the contralateral side of the injection and LRN on the ipsilateral side. Scale bars: A, 650 μ m; B, 500 μ m.

Figure 2

Expression of Robo receptors in migrating IO and LRN neurons.

A-C, coronal sections of E12 mouse embryos hybridized with digoxigenin-labeled riboprobes for *Robo1* (A), *Robo2* (B), *Robo3* (C). Precerebellar neurons leaving the rhombic lip express the three mRNAs (arrowheads). D, E, coronal sections of E13 *Robo1*^{-/-} embryos. β -galactosidase immunoreactivity is detected both in Brn3.2-immunopositive IO neurons (D) and in Brn3.2-negative LRN neurons (visualized by hoechst staining). F-H, coronal sections of E13 *Robo2*^{-/-} embryos. β -galactosidase immunoreactivity is detected in IO neurons (IO in F) and the marginal stream of migrating LRN neurons (arrowheads in F). β -galactosidase is coexpressed with Brn3.2 in IO neurons (D) and is also detected in Brn3.2-negative LRN neurons (visualized by hoechst staining).

Scale bars: A, B, C, 115 μ m; D, E, G, H, 16 μ m; F, 70 μ m.

Abbreviation: XII, hypoglossal motor nucleus.

Figure 3

IO neurons cross the midline in Slit and Robo mutants.

A, C coronal sections of E13 wild type (A, B) and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (C) embryos immunolabeled with anti-Brn3.2 and anti-Pax6 antibodies. In both types of embryos IO neurons migrate in the submarginal stream (arrows) and express only Brn3.2, whereas LRN neurons migrate in the marginal stream (arrowhead) and express only Pax6. Note that some Brn3.2-positive cells are observed in the midline of the *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* embryo (asterisk in C) and not in wild type. D-K, coronal sections at the level of the IO of E13 embryos of Slit and Robo compound knockouts immunolabeled for Brn3.2 (A-K) and counterstained with hoechst (E-K). Brn3.2-positive IO neurons are found in the floor plate of *Slit2^{-/-}* (G), *Robo2^{-/-}* (I), *Slit1^{-/-}; Slit2^{-/-}*(J) and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (K) embryos In all cases, LRN neurons cross the midline. L, quantification of the number of Brn3.2-positive IO neurons in the midline of Slit and Robo mutants. NS: non significant; * p=0.05; ** p=0.01; *** p<0.005.

Scale bars: A-C, 180µm; D- K, 50µm.

Figure 4

Ipsilateral IO projection in Slit and Robo mutants

Coronal vibratome sections of E18 embryos injected unilaterally into the cerebellum with Dil and counterstained with Hoechst. IO neurons are retrogradely labeled on the controlateral side in *Slit1^{+/-}; Slit2^{+/-}*(J) and *Robo1^{-/-}* (D) embryos but an increasing number of Dil labeled IO neurons are found on ipsilateral side (arrowheads) in *Slit2^{-/-}* (B), *Slit1^{-/-}; Slit2^{-/-}* (C), *Robo2^{-/-}* (E) and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (F) embryos.

Scale bars: A, B, C, D, E, F, 120 µm.

Figure 5

Abnormal morphology and lamellation of the IO in Slit and Robo mutants

A-F, Ventral view of E18 whole-mount embryos hybridized with *Er81* (A-D) or *Brn3.2* (E, F) riboprobes. In *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* (B), *Robo2^{-/-}* (C) and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (D, F) embryos the IO is more compact and closer to the midline than in wild type (E) or *Robo1^{+/-};Robo2^{+/-}* embryos. Note that the DAO (arrowheads) is not found at its normal position. G-L, coronal sections at the level of the IO hybridized with *Er81* riboprobe (G-I) or immunolabeled for Brn3.2 (J-L). Whereas in wild type (G, J) the DAO (arrowhead) is found laterally, it is flipped over dorsally and compressed in *Slit1^{-/-}; Slit2^{-/-}* (H, K) and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (I, L) mutants, and the MAO (arrows in H and I) protrudes in the PO. M, schematic representation of IO lamellation defects.

Scale bars: A-D, 190µm; E, F, 150µm; G-I, 100µm; J-L, 80µm.

Figure 6

Phenotypic similarity of *Robo3* mutants and *Robo1/2/3* triple mutants

Coronal sections at the IO level of E13 embryos immunolabeled for GFP and Brn3.2 (A, B, D, E, G, H, J, K) or hybridized with *Barhl1* riboprobes (C, F, I, L). (A-C) In *Robo3^{+/-}* embryos, no Brn3.2/GFP-positive IO neurons are found at the midline whereas Brn3.2-negative/GFP-positive and *Barhl1*-positive LRN neurons cross it. (D-F) By contrast, many Brn3.2/GFP-positive IO neurons (arrowheads in D and E) are found in the floor plate of *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-};Robo3^{+/-}* mutants as well as LRN neurons. G-I, in *Robo3^{-/-}* mutants, both IO neurons and LRN neurons are more lateral and none cross the floor plate. (J, K) in *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-};Robo3^{-/-}* triple mutants IO neurons do not enter the midline, but some LRN neurons are closer to it than in *Robo3^{-/-}* single mutants and some appear to cross the midline (arrowheads in J and K).

Scale bars: A-D, 190µm; E, F, 150µm; G-I, 100µm; J-L, 80µm.

Figure 7

IO projection and lamellation in *Robo1/2/3* triple mutants

A-D, ventral views of whole-mount brains (A, B) and coronal sections (C, D) from Dil labeled E18 *Robo3*^{-/-} single mutants (A, C) and *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-};*Robo3*^{-/-} triple mutants (B, D). In both, the IO nucleus is labeled on the ipsilateral side but in the triple mutants the IO is less compact and fragmented. E, F coronal sections at the level of the IO of E18 *Robo3*^{-/-} single mutant (E) and *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-};*Robo3*^{-/-} triple mutant (F) hybridized with *Er81* riboprobes. The IO lamellation is still recognizable in *Robo3* single mutant but not in *Robo1/2/3* triple mutants.

Scale bars: A, B, 800µm; C, D, 400µm; E, F, 220µm.

Figure 8

Robo3 cooperates with DCC to guide IO neurons toward the floor plate

Coronal sections (A-C, G-I) and ventral view of whole-mount hindbrains (D-F, J-L) of E18 embryos hybridized with *Er81* riboprobes. IN *DCC*^{-/-} embryo (B, E) the IO is fragmented in several parts or clusters some of which found at a distance from the midline (arrowheads in B and E). By contrast in wild type (A, D) and in *Robo3*^{-/-} mutants (C, F) all IO neurons are near the midline and form a well-defined nuclear complex. The IO defects in *DCC*^{-/-};*Robo3*^{+/-} mutant (G, J) are identical to *DCC*^{-/-} single mutant with ectopic lateral clusters (arrowheads in G, J). By contrast the IO of *DCC*^{+/-};*Robo3*^{-/-} mutants (H, K) does not resemble the IO of *Robo3*^{-/-} mutant (compare with C, F) but is somehow comparable to the *DCC*^{-/-} single mutant, with IO fragmentation and lateral clusters (arrowheads). Last, in *DCC*^{-/-};*Robo3*^{-/-} double

mutants (I, L); *Er81*-expressing IO neurons are still present (arrowhead) but don't approach the midline, and remain along the dorso-lateral margin of the hindbrain.

Scale bars: A-C, G-I, 530 μ m; D-F, J-L, 600 μ m.

Figure 9

IO and LRN migration and axon guidance defects in *DCC* and *Robo3/DCC* mutants.

A-D, visualization the IO and LRN migratory streams in *DCC*^{+/-} (A, C) and *DCC*^{-/-} E14 embryos using immunostaining for Brn3.2 (A, B) and Pax6 (A-D). The LRN (arrowheads in A-D) is very reduced in *DCC*^{-/-} embryos. C, D, coronal section at the level of the inner ear. In *DCC*^{-/-} mutant Pax6-positive LRN neurons appear to leave the CNS to invade the surrounding tissue. The dashed line delineates the surface the hindbrain. E-J, ventral views of whole-mount brains (E-G) and coronal sections (H, J) from Dil labeled P0 *DCC*^{+/-} (E), *DCC*^{-/-} (F) single mutant and *DCC*^{-/-};*Robo3*^{-/-} double mutant (G). *DCC*^{-/-} embryos, IO neurons are retrogradely traced on both the ipsilateral and contralateral side (arrows in F and I). In *DCC*^{-/-};*Robo3*^{-/-} double mutants, Dil labeled IO neuron are on the ipsilateral side and at a dorsal position (arrows in G, J).

Scale bars: A, B, 300 μ m; C, D, 80 μ m; E-J 500 μ m.

Figure 10

The LRN does not form in absence of *DCC*.

Coronal sections at the level of the LRN of *DCC*^{+/-} (A), *DCC*^{-/-} (B) single mutant and *DCC*^{-/-};*Robo3*^{-/-} double mutant (C) E18 embryos hybridized with *Barhl1* riboprobe. Note that the LRN (arrowheads in B, C) is almost absent in *DCC*^{-/-} single mutant and *DCC*^{-/-};*Robo3*^{-/-} double mutant.

Scale bars: A-C, 530µm.

Abbreviation: ecn, external cuneatus nucleus

Supplementary Figure 1

Slits are expressed in the floor plate.

Coronal sections of the hindbrain of E12 embryos, hybridized with *Slit1* (A), *Slit2* (B), *Slit3* (C) riboprobes. All Slits are expressed in the floor plate (arrow in A-C). *Slit2* mRNA is also detected in the ventricular zone (arrowhead in A).

Scale bars: A-C, 170 µm.

Abbreviation: XII, hypoglossal motor nucleus

Supplementary Figure 2

IO lamellation defects in Slit and Robo mutants.

A-D, coronal sections at the level of the IO of wild type (A), *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* (B) *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (C) and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-};Robo3^{-/-}* (D) triple mutants embryos immunolabeled with anti-Brn3.2 and anti-CaBP antibodies. A-C, the DAO (arrowheads) is flipped over dorsally in *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* mutants. D, the IO lamellation is completely perturbed in *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-};Robo3^{-/-}* triple mutants. E, F, coronal sections at the level of the IO of wild type (E) *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* (F) E18 embryos hybridized with a *Robo2* riboprobe. *Robo2* mRNA is highly expressed in the DAO (arrowhead in E). DAO neurons still expressed *Robo2* mRNA in *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* mutant (F) but they are found more dorsally and in a compact cluster (arrowhead).

Scale bars: A-D, 95 µm; E, F, 80µm.

Supplementary Figure 3

LRN defects in Slit and Robo mutants.

A-D, coronal sections at the level of the LRN of *Robo*^{+/-};*Robo2*^{+/-} (A), *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} (B) *Robo2*^{-/-} (C) and *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} E18 embryos hybridized with *Barhl1* riboprobe. IN all three homozygous mutants, the LRN is not as compact and ventral than in *Robo*^{+/-};*Robo2*^{+/-} embryos. Note also the absence of external cuneatus nucleus (ecn) in *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} (B) and *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} (D) double mutants.

Scale bars: A-D, 500µm.

Supplementary Figure 4

ECN defects in Slit and Robo mutants.

A-F, dorsal view of whole-mount hinbrains of E18 embryos hybridized with *Barhl1* riboprobes. In wild type (A, wt) and *Robo1*^{-/-} single mutant (D) the external cuneatus nucleus (arrowhead) is a dorsal and ovoid nucleus located a distance from the fourth ventricle just caudal to the rhombic lip. In *Slit2*^{-/-} (B), *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} (C) *Robo2*^{-/-} (E) and *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} (F) the ECN (arrowheads) is disorganized and does not form a well defined nucleus. It is also closer to the fourth ventricle and extends more caudally in the hindbrain.

Scale bars: A-F, 640µm.

Fig.1

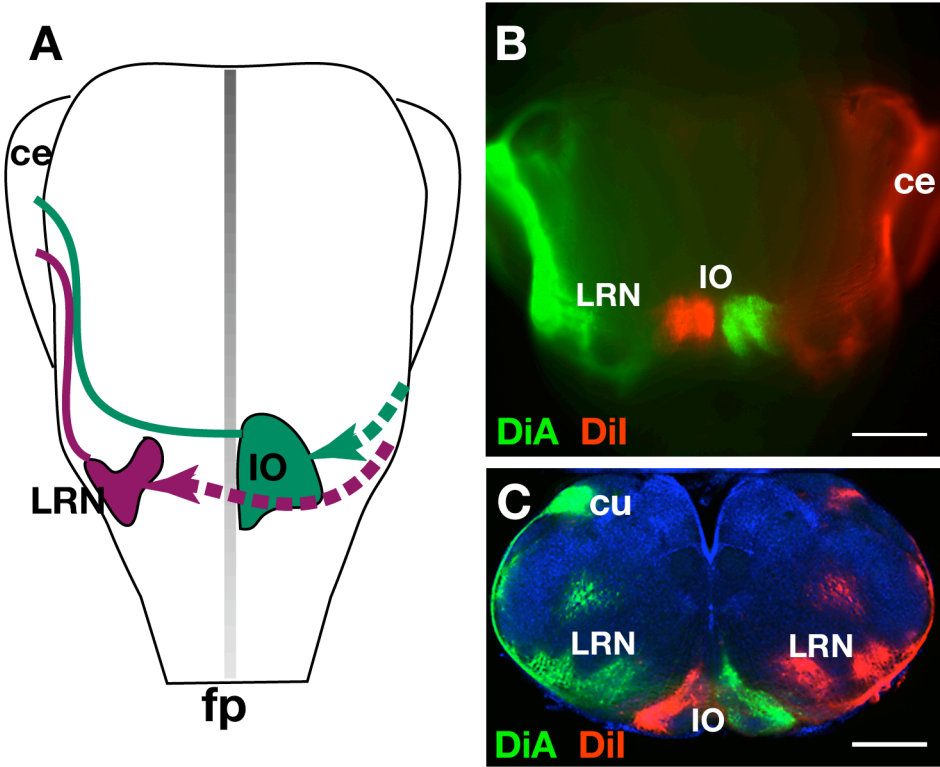


Fig.2

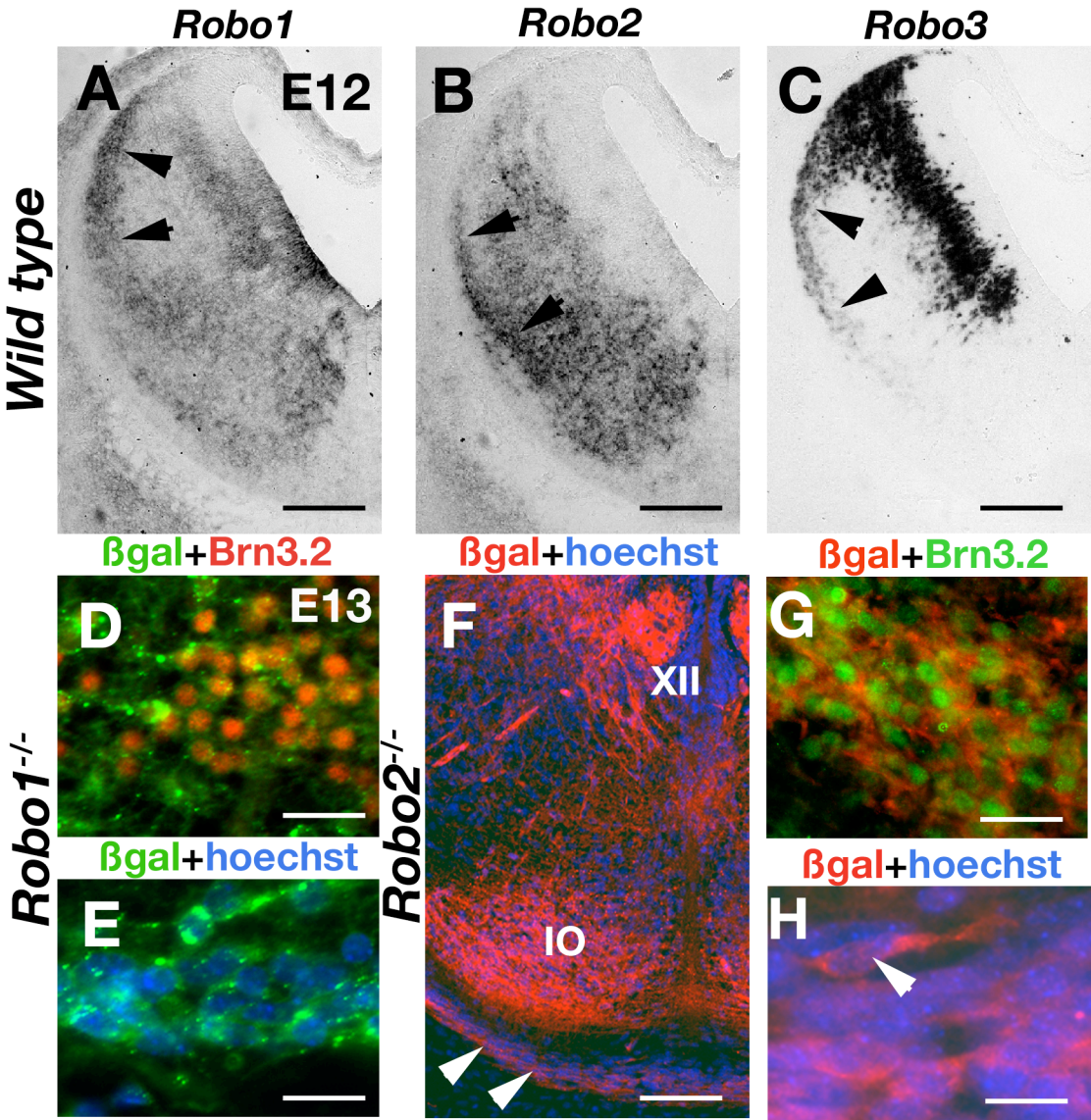


Fig.3

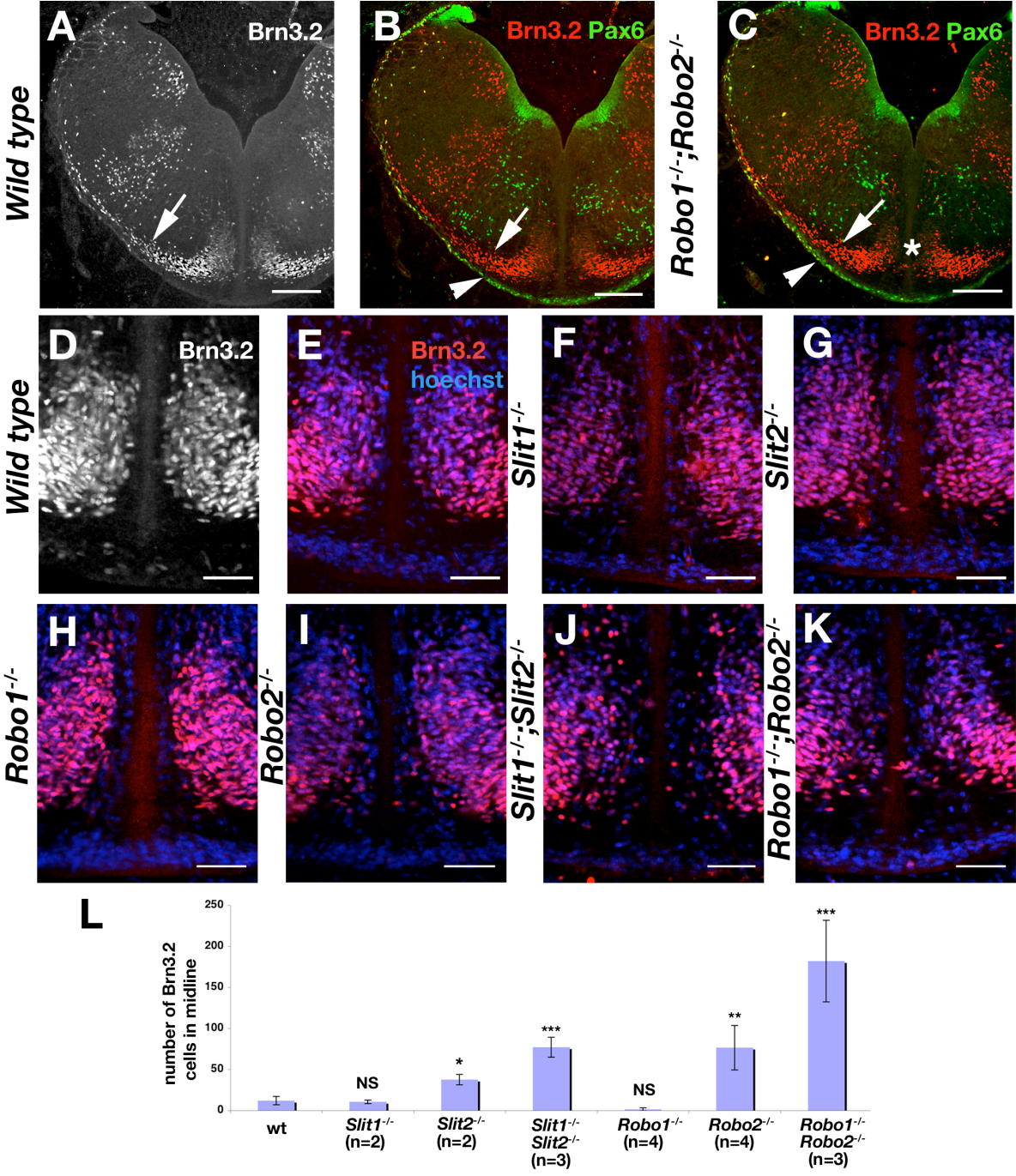


Fig.4

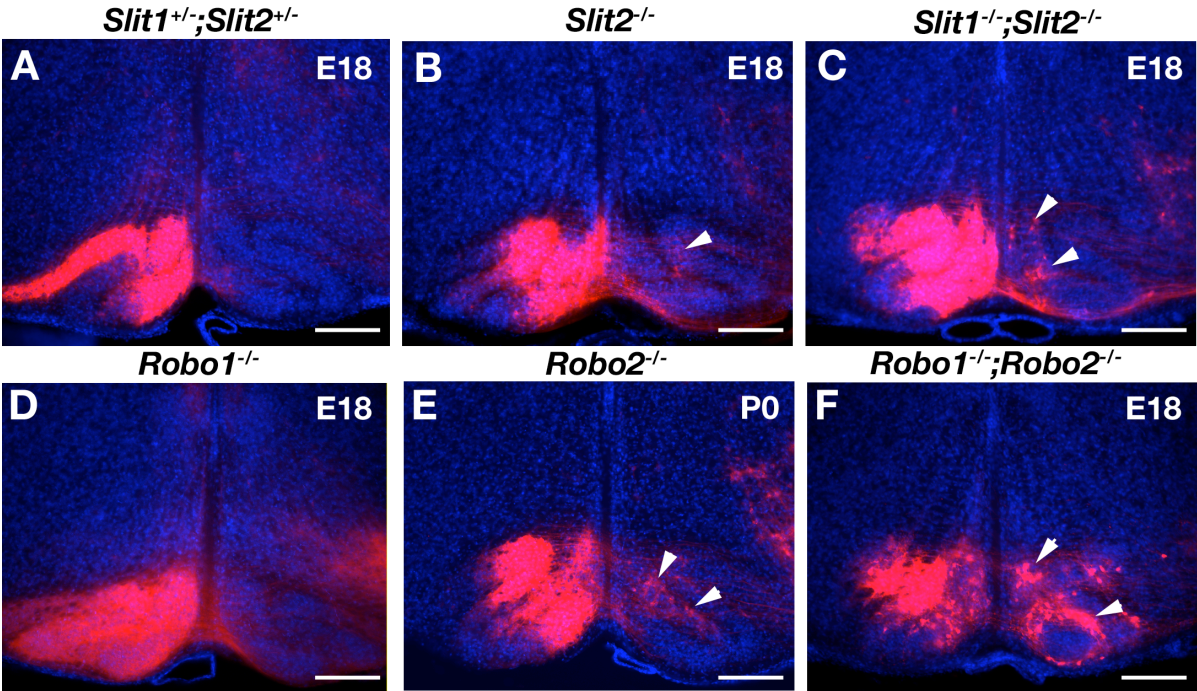


Fig.5

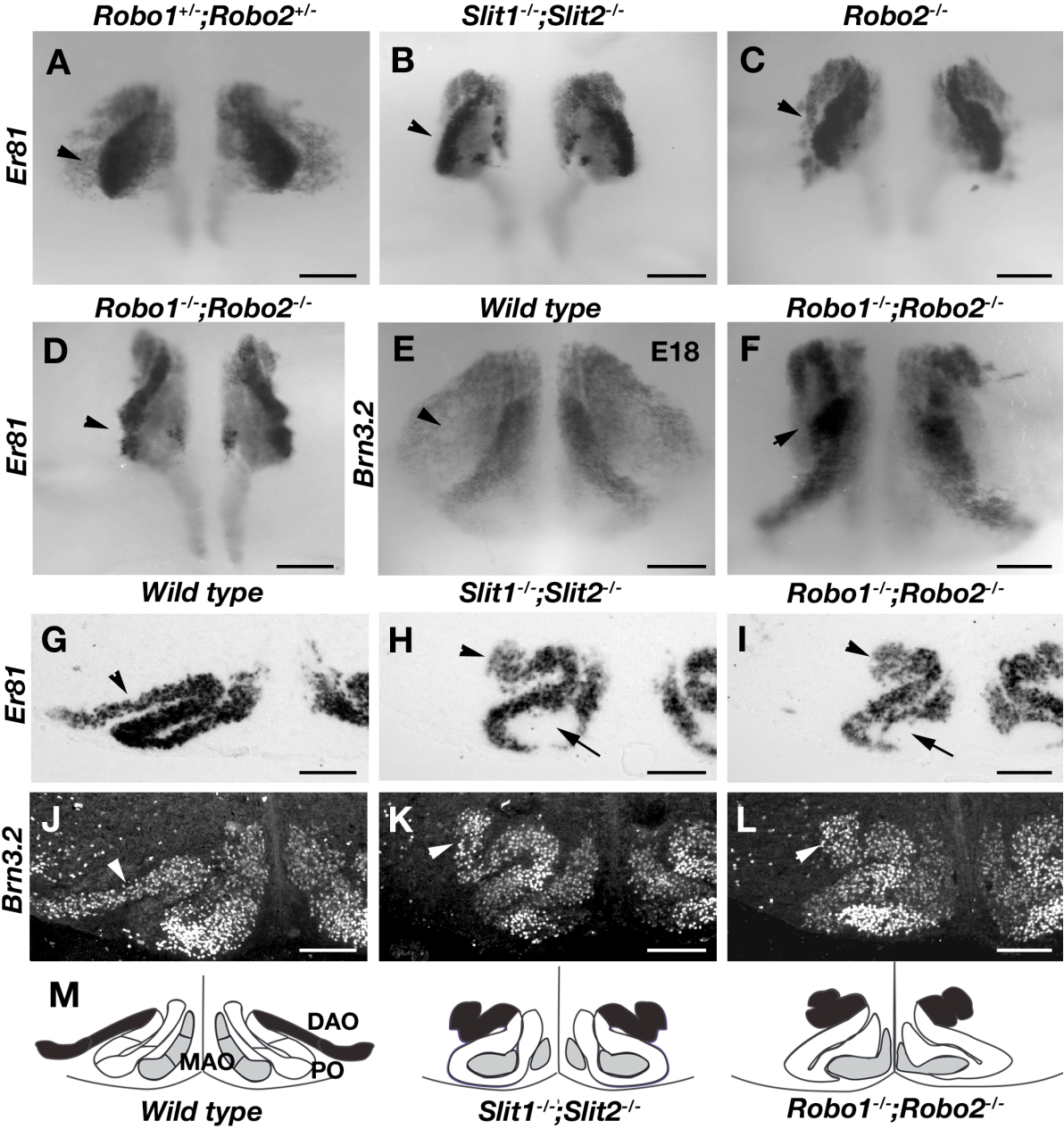


Fig.6

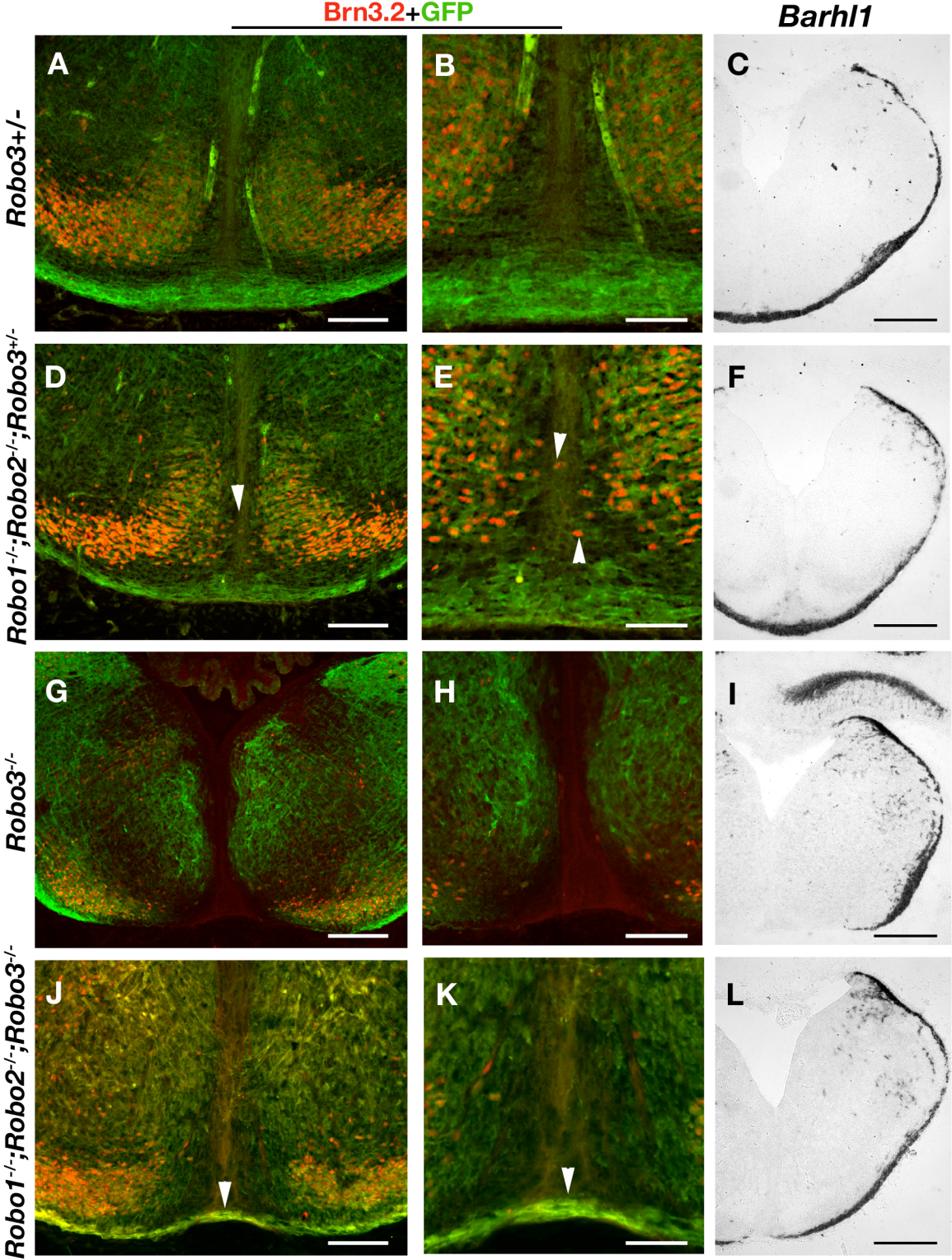


Fig.7

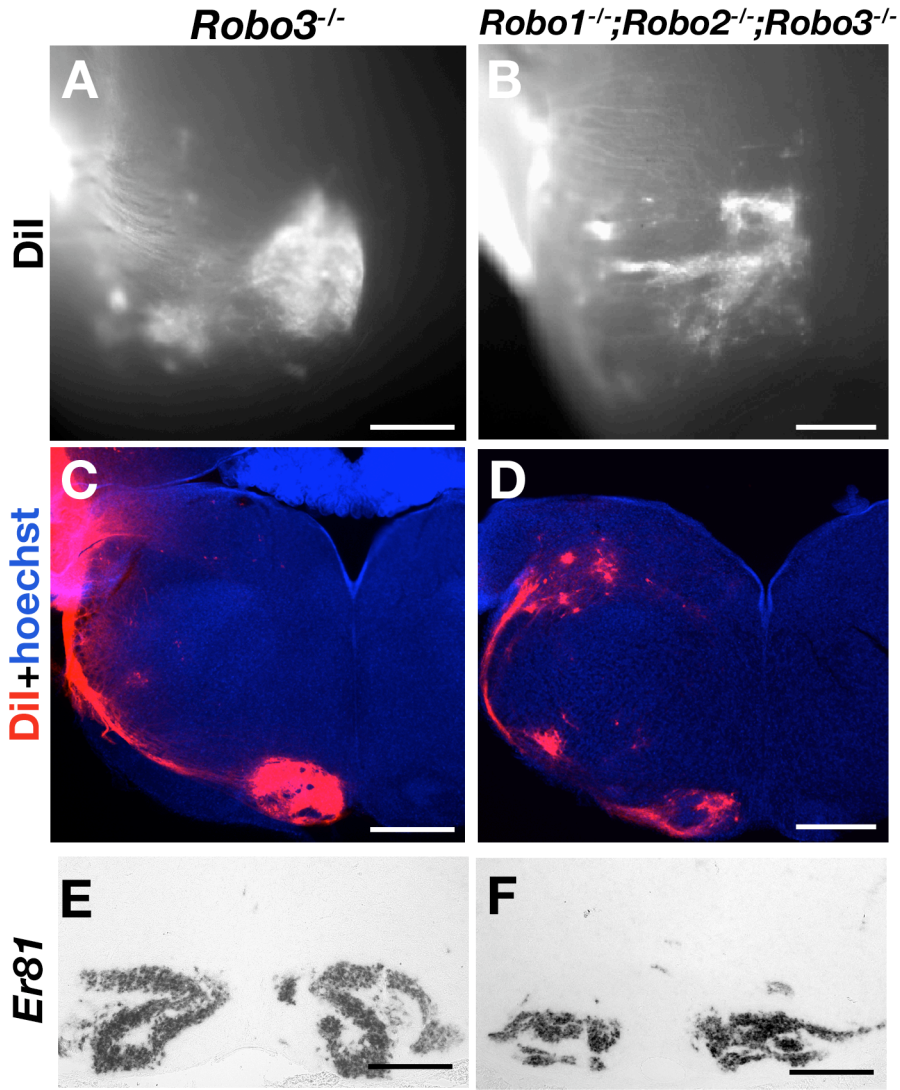


Fig.8

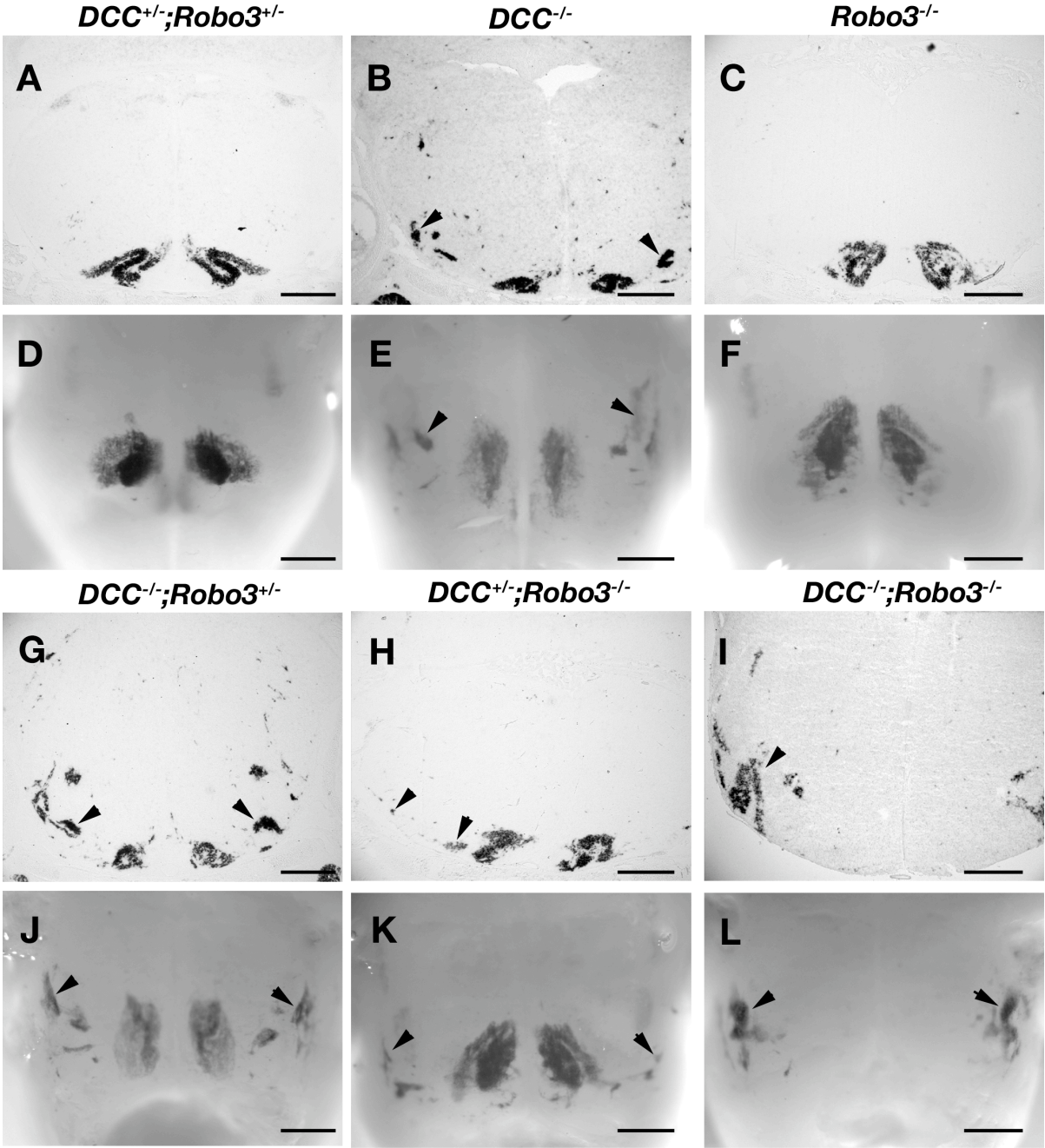


Fig.9

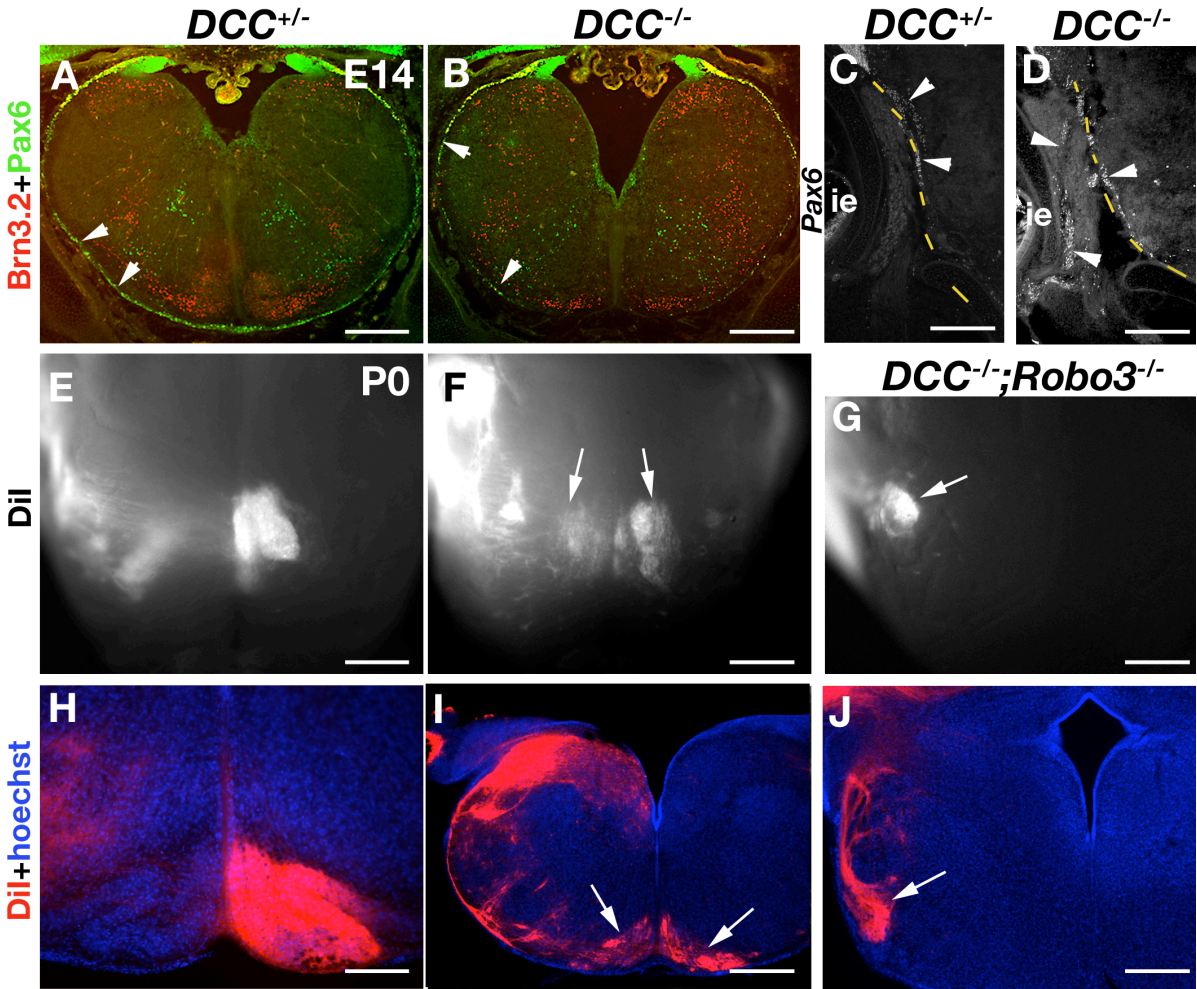


Fig.10

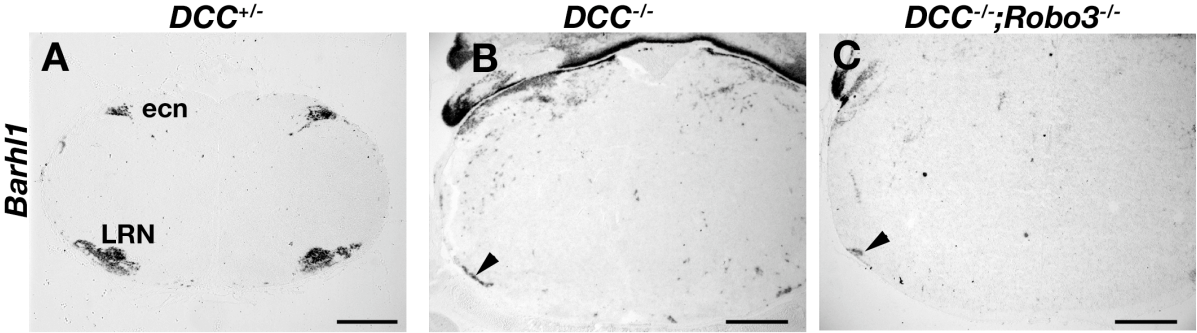


Fig.Sup1

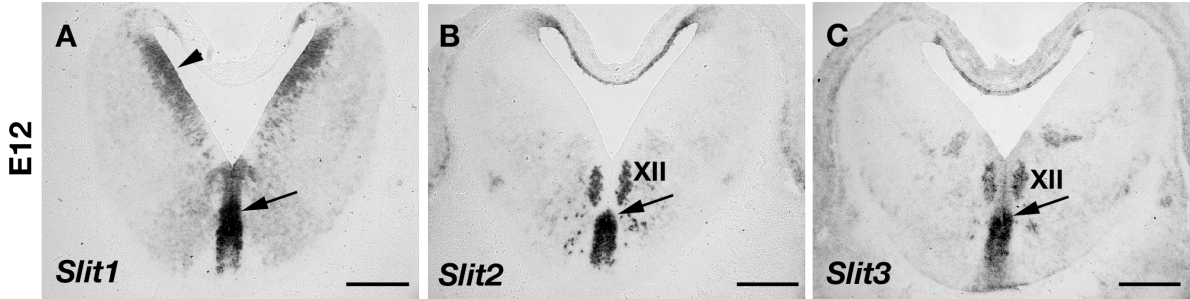


Fig.Sup2

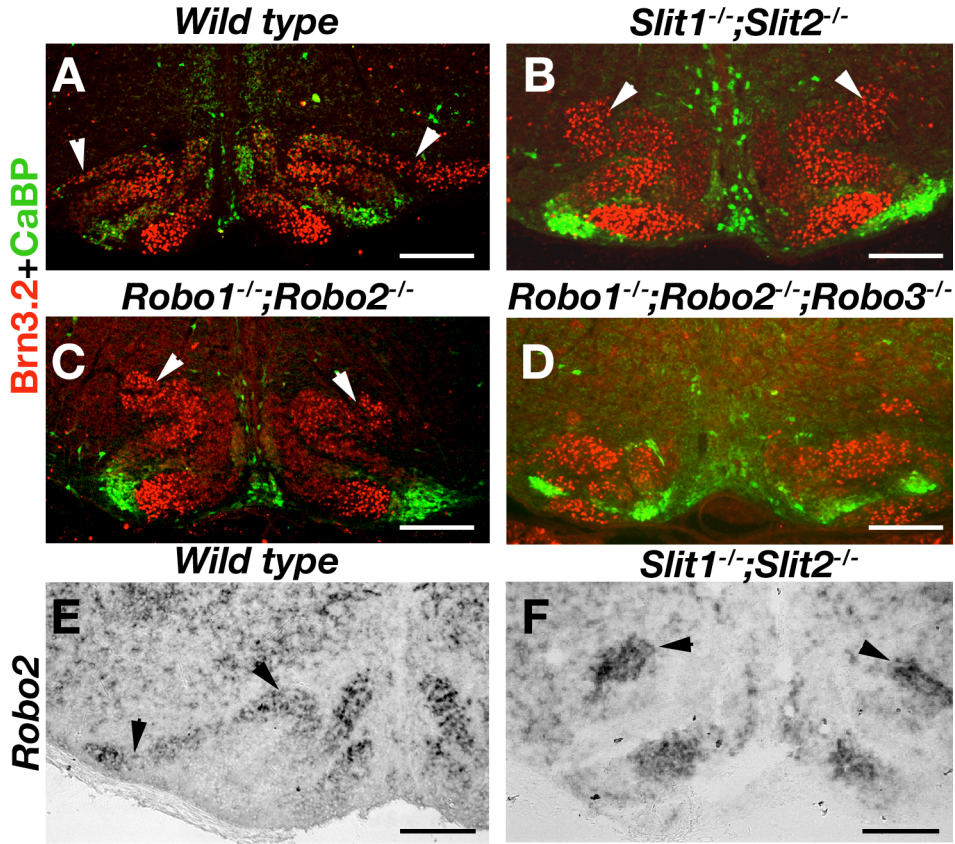


Fig.Sup3

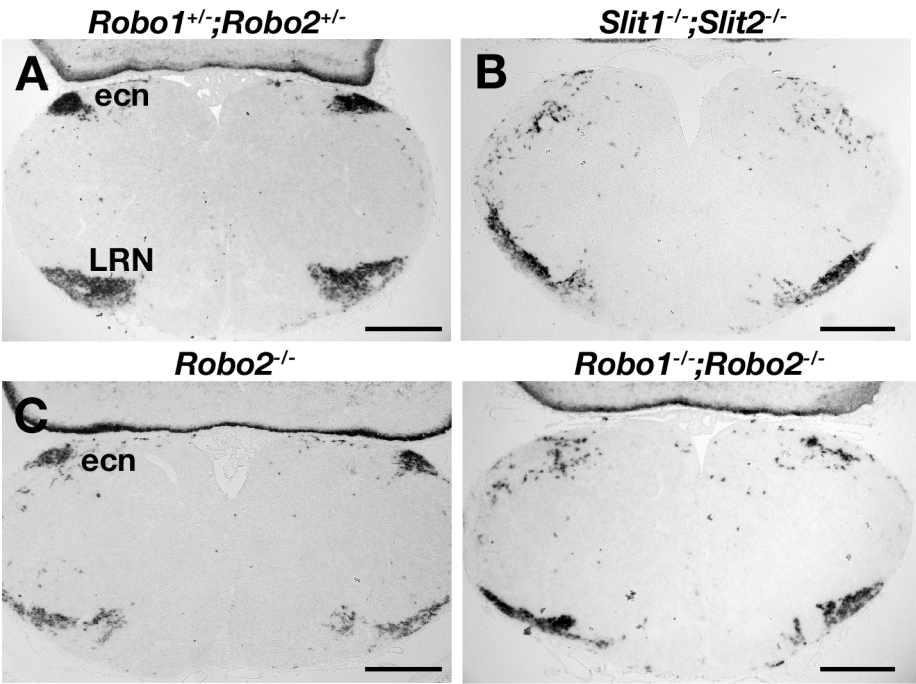
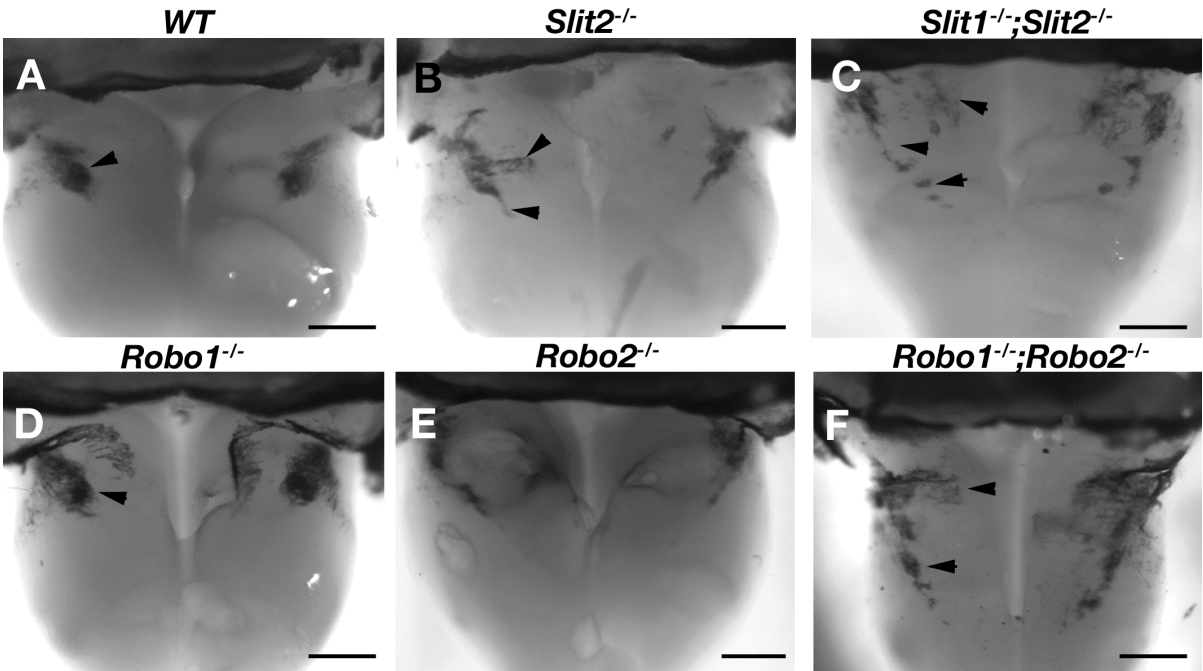


Fig.Sup4



DISCUSSION/CONCLUSION

Le croisement de la ligne médiane par les axones en développement est un processus hautement régulé. Il met en jeu l'action coordonnée de molécules de guidage de nature diverses (cf. introduction). Nos travaux ont porté sur l'étude de la fonction de Slit/Robo lors de la mise en place de plusieurs systèmes commissuraux du télencéphale et du tronc cérébral. Nous savions que le système Slit/Robo ne contribue pas de la même façon au contrôle du croisement de la ligne médiane dans ces deux régions du système nerveux (cf. introduction). Un premier facteur déterminant est lié à la distribution des Slits. Dans le télencéphale, ces molécules sont exprimées à la ligne médiane mais de façon discontinue, les fibres commissurales progressent controlatéralement à travers des couloirs dépourvus de Slits. En revanche, dans le tronc cérébral et la moelle épinière, les systèmes commissuraux croisant la plaque du plancher doivent forcément se confronter à cette région enrichie en molécules Slits. Par ailleurs dans ce dernier système, il était démontré que la combinaison en récepteurs Robo exprimée à la surface des axones commissuraux est déterminante. Robo3 est alors essentiel au croisement de la plaque du plancher, alors qu'il ne paraît pas intervenir dans la mise en place des projections commissurales du télencéphale. Les résultats obtenus viennent d'une part confirmer l'importance des récepteurs Robo1 et Robo2 *in vivo*. D'autre part, nos résultats permettent de préciser les interactions entre les systèmes Slit/Robo et Nétrine/DCC mises en jeu lors du croisement de la plaque du plancher *in vivo*. Nous confirmons que Robo3 apparaît être un élément clé de cette interaction. J'aimerais dans cette discussion proposer plusieurs modèles expliquant d'un point de vue fonctionnel les différents rôles du système Slit/Robo dans le contrôle du croisement de la ligne médiane.

1 Contribution du système Slit/Robo à la mise en place des projections commissurales du télencéphale

1.1 La répartition des Slits détermine la capacité des axones exprimant Robo1 et Robo2 à franchir la ligne médiane

L'analyse de la fonction des récepteurs Robo1 et Robo2 lors du développement des projections corticales et olfactives vient confirmer plusieurs points essentiels. Ces deux récepteurs sont toujours co-exprimés à la surface des axones formant le tractus olfactif latéral ou les projections corticales. La présence de Robo1 et Robo2 confère à ces fibres la capacité de fixer les Slits et de répondre à leur effet répulsif *in vitro* et *in vivo*. Ces axones, qu'ils doivent ou non croiser la ligne médiane, se retrouvent donc en permanence soumis à l'action des Slits. Par conséquent, la répartition des Slits sur la trajectoire de ces axones devient déterminante sur leur capacité à projeter ipsi ou controlatéralement.

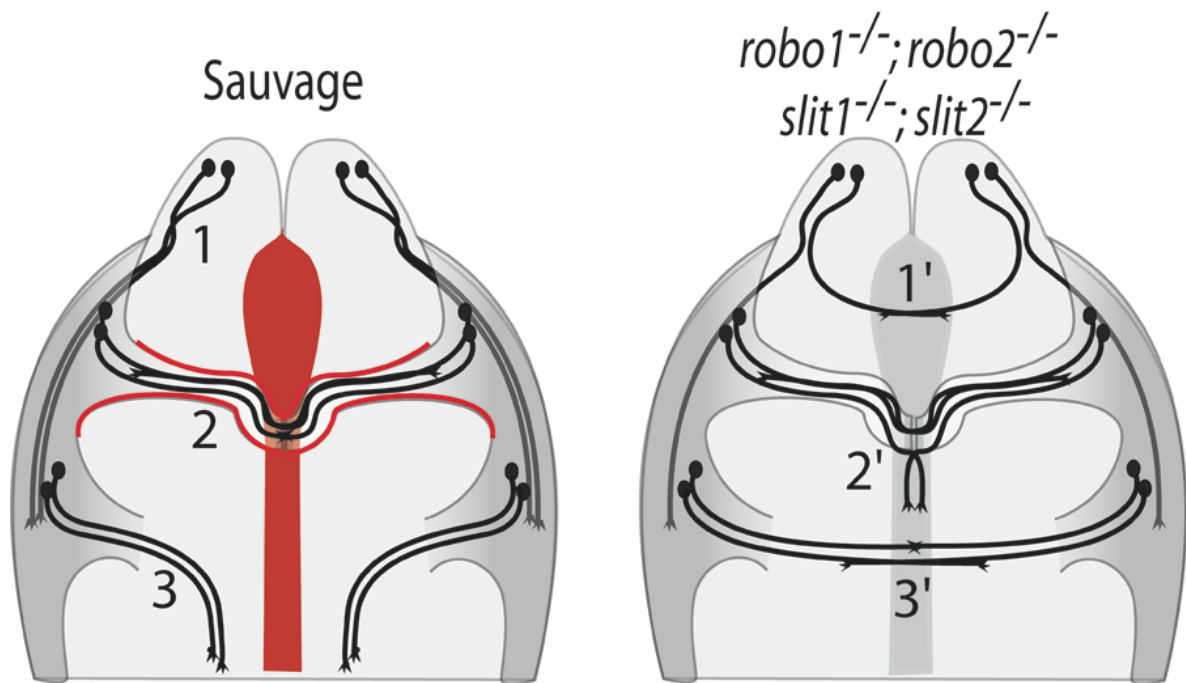


Figure 56: Fonction du système Slit/Robo lors de la mise en place des projections axonales au sein du télencéphale

Représentations schématiques de différentes voies de projections axonales du télencéphale. Chez des souris sauvages, tous les axones à croissance ipsi ou controlatérale expriment Robo1 et Robo2 et sont repoussés par les Slits (Rouge). Les axones à croissance ipsilatérale évoluent dans un environnement où les Slits sont concentrés au niveau médian et les empêchent de décussar (1, 3). Les axones commissuraux peuvent franchir la ligne médiane en progressant dans des couloirs encadrés par les Slits (2).

Chez des souris déficientes en Robo1/Robo2 ou Slit1/Slit2, des axones qui devraient progresser ipsilatéralement ne sont plus repoussés par la ligne médiane et forment plusieurs commissures ectopiques (1', 3'). Par ailleurs, certains axones commissuraux dévient de leur voie de projection normale et ne parviennent pas à décussar normalement (2').

Les axones du TOL sortant du bulbe olfactif pénètrent dans la moitié ventrale du télencéphale. Ils sont directement exposés à l'action de Slit1 et Slit2 diffusant depuis le septum médian et sont contraints d'adopter une trajectoire latérale. Il en est de même pour les axones corticofuges empruntant la capsule interne qui se retrouvent ensuite repoussés par les Slits exprimés à la ligne médiane ventrale du télencéphale et doivent alors tourner longitudinalement. Nos travaux confirment qu'en l'absence d'interactions entre les Slits et Robo1/Robo2, ces faisceaux d'axones se retrouvent defasciculés et ne parviennent pas à maintenir leur trajectoire ipsilatérale. Ils ne répondent plus à l'effet répulsif de la ligne médiane ventrale et se mettent à la croiser en formant plusieurs commissures ectopiques (Fig.56 ; article 1, 2 ; Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2002).

Certains axones commissuraux du télencéphale sont orientés dans des voies de projection encadrées par les Slits qui les canalisent à travers la ligne médiane. Nous avons étudié le cas des axones à projection cortico-corticale qui sortant du cortex dans la région dorsale du télencéphale s'engagent directement à travers le corps calleux. L'action de Slit2, exprimé par le glial wedge (GW) et *l'indusium griseum* (IGG), s'exerce aussi bien sur les axones pré ou post-commissuraux exprimant Robo1 et Robo2. Leurs interactions répulsives contribuent au guidage de ces axones en les empêchant de sortir de la voie de projection normale avant ou après avoir franchi la ligne médiane (Fig.56). Ce mode d'action est donc équivalent à celui mis en jeu lors du guidage des axones rétiniens à travers le chiasma optique (cf. introduction ; Plump et coll., 2002 ; Hutson et Chien, 2002 ; Fricke et coll., 2001). Il conviendrait tout de même de vérifier l'état du chiasma optique chez les souris déficientes en Robo1 et/ou Robo2 pour déterminer leur importance relative. Il faut aussi préciser que la fonction du système Slit/Robo n'est pas pour autant généralisable à toutes les commissures du télencéphale. La commissure antérieure est par exemple correctement formée chez les souris déficientes en Slit1/Slit2 (Bagri et coll., 2002) ou Robo1/Robo2 (article 2), bien que déplacée dorsalement par la commissure ectopique constituée les fibres corticofuges. La formation de cette commissure est placée sous le contrôle d'autres familles de molécules de guidage telles que la Nétrine1 (Fazeli et coll., 1997 ; Kennedy et coll., 1994) ou les Sémaphorines (Chen et coll., 2000a ; Giger et coll., 2000 ; Sahay et coll., 2003 ; Falk et coll., 2005). Ainsi, certains systèmes commissuraux pourraient échapper au contrôle du système de guidage Slit/Robo.

1.2 Coopération entre processus de guidage à courte et longue distance

Lors de la mise en place du tractus olfactif latéral, l'action à longue distance des Slits sécrétés par le septum est restée longtemps controversée. L'analyse des souris déficientes en Slit1 et Slit2 a pu confirmer ce rôle *in vivo* (Hirata et coll., 2001 ; Patel et coll., 2001 ; Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2002). L'absence d'effets des domaines extracellulaires de Robo sur le guidage

des axones du TOL *in vitro* constituait un argument allant contre l'implication des récepteurs Robo1 et Robo2 dans cette fonction (Hirata et coll., 2001 ; Patel et coll., 2001). Notre étude apporte la preuve que ces récepteurs sont bien indispensables *in vivo* au guidage des axones du TOL. Nous confirmons donc que l'action des Slits s'exerce à longue distance en interaction avec les récepteurs Robo1 et Robo2. Un système de culture organotypique a permis de démontrer que la fonction du facteur de transcription Lhx2, lors du guidage des axones du TOL, ne s'exerce pas de façon cellulaire autonome (Saha et coll., 2007). Nous pourrions prouver qu'il en est de même de l'action de Slit1 et Slit2. Lors de la greffe d'un bulbe olfactif issu d'une souris *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}* à la place d'un bulbe olfactif sauvage, le TOL devrait se développer normalement. En culture de tranches de télencéphale (Hirata et coll., 2001), nous pourrions également vérifier que la greffe d'un septum sauvage à la place de celui d'une souris *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}* compense le phénotype observé. Ces expériences amèneraient d'autres preuves de l'importance fonctionnelle des Slits sécrétés par cette région médiane.

Nous avons vu que plusieurs données montrent que les cellules du TOL interviennent dans le guidage des axones olfactifs. Cependant, aucun mécanisme moléculaire ne permet d'expliquer leur action de guidage qui s'exerce à courte distance, par contact. Nos résultats démontrent que les cellules du TOL ne sont pas impliquées dans l'apparition des défauts observés chez les souris déficientes en Slit1/Slit2 ou Robo1/Robo2. En effet, la distribution de ces cellules n'est pas affectée en l'absence de signalisation Slit/Robo, ces cellules n'entourent pas les axones ectopiques. De plus, contrairement à ce qui était envisagé, l'action à courte distance des cellules du TOL n'est pas suffisante au guidage des axones olfactifs, puisque leur présence ne compense pas l'apparition de défauts chez les mutants analysés. L'importance des processus de guidage à longue distance est donc prépondérante. Néanmoins, certains axones olfactifs poussent normalement au contact des cellules du TOL chez les souris déficientes en Slit1/Slit2 ou Robo1/Robo2. Il faut donc envisager que leur influence locale puisse compenser en partie la perte de l'effet répulsif lié à l'action longue distance des Slits. Cette hypothèse pourrait être testée en culture par l'analyse des conséquences de l'ablation de ces cellules chez des souris *robo1^{-/-}* ; *robo2^{-/-}* ou *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}*. Par ailleurs, il serait intéressant d'analyser le phénotype des souris triplement déficientes en Robo1, Robo2 et DCC. En effet, la délétion du récepteur DCC affecte spécifiquement la mise en place des cellules du TOL (Kawasaki et coll., 2006). Dans l'hypothèse d'une fonction compensatrice, le défaut de positionnement des cellules du TOL dû à l'absence de DCC, devrait aggraver le phénotype des souris déficientes en Robo1 et Robo2. A l'inverse, il a été proposé que l'action des Slits lors de la formation du corps calleux s'exercerait principalement à courte distance depuis les structures gliales du GW et de l'IGG qui encadrent ces axones. Cependant, nous avons vu que la fonction répulsive du GW met aussi en jeu l'action d'autres facteurs de la famille des Wnts (Keeble et coll., 2006 ; Wang et

coll., 2006) ou des Ephs/ephrines (Mendes et coll., 2006). Il conviendrait de vérifier en culture si le GW issu de souris *slit2*^{-/-} perd toute activité répulsive sur la croissance des axones corticaux. De plus, chez les souris hétérozygotes *Fgfr1*^{+/-} (Smith et coll., 2006) ou complètement déficientes en GAP43 (growth-associated protein 43 ; Shen et coll., 2002b), les axones du corps calleux ne parviennent pas à franchir la ligne médiane bien que le GW et l'IGG soient présents et expriment Slit2. L'action locale de Slit2 ne semble donc pas suffisante au guidage de ces axones. On ne peut rejeter l'hypothèse d'une action à longue distance des Slits sécrétés par le septum. En effet, en l'absence de Slit2 ou de Robo1/Robo2, les axones déviés au niveau de la ligne médiane et formant des faisceaux de Probst pénètrent massivement dans cette région plus ventrale. Le laboratoire a développé une lignée de souris portant une version « loxée » du gène *slit2*, pouvant être croisée avec une lignée exprimant spécifiquement la recombinaison Cre dans le GW et l'IGG. Nous pourrions ainsi étudier les conséquences d'une inactivation ciblée de Slit2 dans ces cellules gliales.

2 L'activité des récepteurs Robos détermine la capacité des neurones précérébelleux à croiser la plaque du plancher

Dans la moelle épinière, nous avons vu que les molécules de guidage exprimées par la plaque du plancher jouent un rôle déterminant sur le comportement adopté par les axones en croissance vis-à-vis de la ligne médiane. La plaque du plancher constitue soit une barrière infranchissable repoussant à distance les axones qui ne doivent pas la croiser, soit une cible intermédiaire attirant la croissance des axones commissuraux. La dynamique d'expression et d'activation des récepteurs Robos est alors déterminante. Comme dans le télencéphale, les récepteurs Robo1 et Robo2 sont exprimés par plusieurs populations d'axones qui croisent ou non la ligne médiane (cf. introduction). La capacité à approcher et croiser la ligne médiane dépend alors de la présence de Robo3. Dans la moelle épinière, ce récepteur est retrouvé principalement à la surface des axones pré-commissuraux. En inhibant Robo1, Robo3 les rend insensibles à l'activité répulsive des Slits. La Nétrine1 et Shh coopèrent alors pour les attirer à travers la plaque du plancher. Après la décussation, l'expression de Robo1 et Robo2 augmente à l'inverse de celle de Robo3. L'action de ces récepteurs répulsifs devient dominante et permet aux axones post-commissuraux de quitter la ligne médiane et de se positionner latéralement. L'action de Robo1 et Robo2 dépend alors de leur interaction avec les Slits et sûrement en partie de leur capacité à inhiber l'activité du complexe Nétrine1/DCC (cf. introduction). L'étude des neurones précérébelleux nous a permis de tester ce schéma d'interaction dans un autre système de neurones commissuraux. La singularité qui fait aussi tout l'intérêt de ce système réside dans le fait que les NPC du tronc cérébral forment trois populations neuronales d'origine

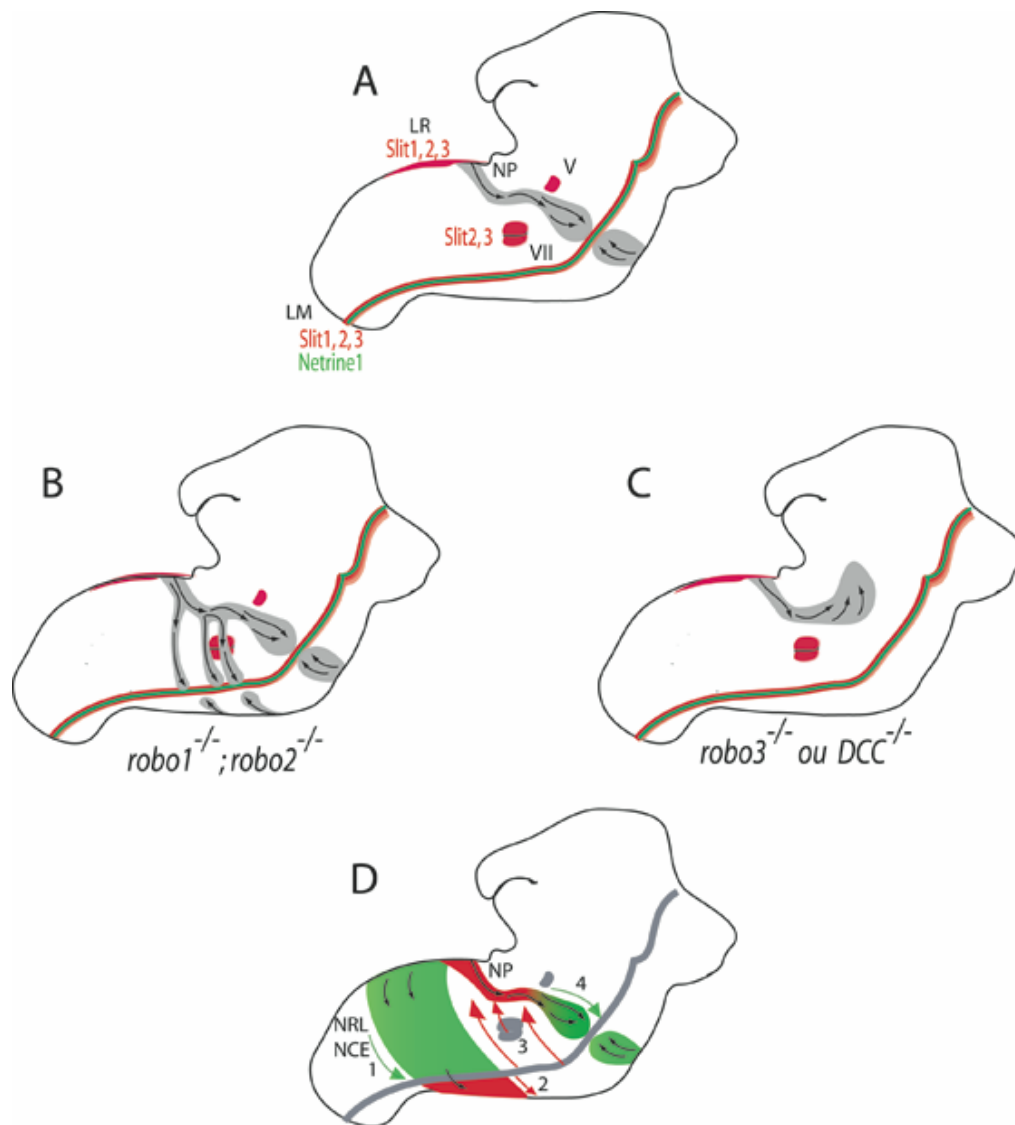


Figure 57 : Guidage des neurones du pont en migration

Les neurones du pont quittant les lèvres rhombiques (LR) alternent deux phases de migration longitudinale antérieure puis transversale ventrale (A). Les Slits sont exprimés comme la Nétrine1 dans la ligne médiane (LM) et sont aussi retrouvés dans les lèvres rhombiques et les noyaux du nerf facial (VII) et trijumeaux (V). En absence de Robo1/Robo2, la plupart des neurones du pont migrent avec une trajectoire normale. Néanmoins, certains ne parviennent pas à s'engager ou à se maintenir dans la voie de migration longitudinale et rejoignent la ligne médiane à une position ectopique trop postérieure (B). Les neurones du pont dépourvus de Robo3 ou DCC restent bloqués latéralement à l'issue de leur migration longitudinale (C).

Modèle proposé (D) : lorsque l'activité des récepteurs Robo1 et Robo2 est dominante, les NPC sont sensibles à l'effet répulsif des Slits présents médialement qui peut masquer l'effet attractif de la Nétrine (Rouge). Cette action est essentielle lors de la phase de migration longitudinale des neurones du pont (3) et pour permettre aux neurones du NRL/NCE de se positionner après le franchissement de la ligne médiane (2).

A l'inverse, lorsque l'activité de Robo3 et DCC est dominante, les NPC sont sensibles à l'effet attractif de la Nétrine1 alors que leur réponse aux Slits est inhibée (Vert). ceci impose une orientation de migration ventrale aux neurones du NRL/NCE sortant des lèvres rhombiques (1) ou aux neurones du pont ayant achevé leur migration longitudinale (4). Ainsi l'activité du système Slit/Robo explique les différences de comportement migratoire entre les différentes classes de neurones à fibres moussues.

commune qui décussent certes, mais de trois façons différentes : soit entièrement (NRL, NCE et une petite partie des neurones du pont), soit partiellement, le corps cellulaire ne suivant pas l'axone contralatéralement (OI et une majorité des neurones du pont), soit en se déplaçant au préalable longitudinalement (neurones du pont). Ainsi ce système permet non seulement d'étudier les mécanismes contrôlant la décussation axonale mais aussi le comportement des corps cellulaires à la ligne médiane. Nos travaux montrent que l'action du système Slit/Robo permet d'expliquer certaines des caractéristiques migratoires de chaque population de NPC.

2.1 Choix de migration longitudinale, le système Slit/Robo indique où croiser la ligne médiane

Peu de données permettent de comprendre comment la signalisation de différentes molécules de guidage le long des axes dorso-ventral et antéro-postérieur est intégrée par les neurones en migration tangentielle. Les neurones à fibres moussues du pont et du NRL/NCE proviennent des mêmes précurseurs au sein des lèvres rhombiques cérébelleuses et expriment un certain nombre de facteurs communs (cf. introduction). Ils n'empruntent pourtant pas les mêmes voies de migration. Les neurones du pont, à la différence des neurones du NRL/NCE (et olivaires), ne rejoignent pas directement la ligne médiane et migrent d'abord antérieurement (passant de R6-R8 à R4). Les résultats de l'analyse comparative des souris déficientes en Slit1/Slit2, Robo1/Robo2 ou pour les facteurs de transcription *Hoxa2/Hoxb2*, démontrent l'importance du système Slit/Robo durant la migration longitudinale des neurones du pont (les aspects concernant le contrôle exercé par ces gènes *Hoxs* sur l'expression des gènes *slits* et *robo2* sont traités dans la discussion de l'article 4). Il apparaît que les récepteurs Robo1 et Robo2 sont actifs quand les neurones du pont quittent les lèvres rhombiques, ce qui les distingue des autres NPC. Ils sont alors les seuls à être sensibles à l'activité répulsive des Slits exprimés au niveau médian qui les empêche de migrer directement vers la plaque du plancher avant d'avoir progressé antérieurement. En l'absence de Slit1/Slit2 ou Robo1/Robo2 certains neurones du pont rejoignent la ligne médiane dans la région postérieure du tronc cérébral comme les neurones du NRL/NCE. Cependant, ces neurones ectopiques n'ont pas pour autant changé d'identité, car ils ne peuvent pas franchir la ligne médiane et s'arrêtent de part et d'autre de celle-ci (Fig.57).

Nos données démontrent que le noyau facial est une autre source de Slits (Slit2 et Slit3) essentielle au guidage des neurones du pont. En son absence chez les souris *Phox2b^{-/-}*, les Slits sécrétés par la ligne médiane ne suffisent pas à prévenir l'apparition d'ectopies. En revanche, la présence de ce noyau n'est pas suffisante pour prévenir l'apparition de défauts chez les souris *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}*. Sa fonction de guidage dépend donc au moins en partie de sa capacité à sécréter Slit2. Les neurones du noyau facial sont générés plus précocement que

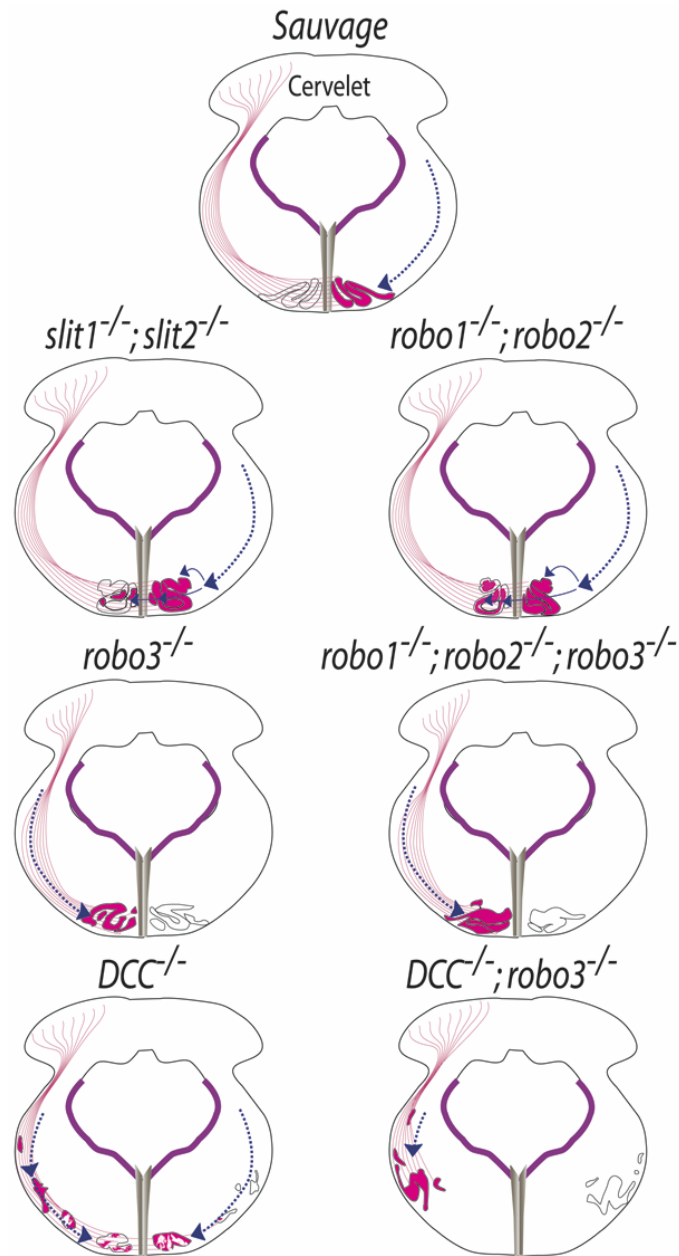


Figure 58: Résultats de l'étude comparative du développement des neurones olivaires

Représentations schématiques du positionnement et de la projection des neurones olivaires chez les différents cas analysés. Les flèches représentent les voies de migration adoptées par les neurones projetant vers l'hémicervelet gauche (rose)

Chez des souris sauvages, tous les neurones olivaires sont positionnés ventralement et projettent ipsilatéralement. Chez les souris *slit1*^{-/-} ; *slit2*^{-/-} ou *robo1*^{-/-} ; *robo2*^{-/-} certains corps cellulaires croisent anormalement la ligne médiane ventrale. La projection olivaires est au final mixte, ipsi et controlatérale. Chez les souris *robo3*^{-/-} et *robo1*^{-/-} ; *robo2*^{-/-} ; *robo3*^{-/-} les neurones olivaires parviennent à migrer ventralement bien que leurs axones n'aient pas franchi la ligne médiane. Ils projettent donc tous ipsilatéralement. En absence de DCC, une grande partie des neurones olivaires n'atteignent pas la ligne médiane. Ils restent bloqués latéralement et projettent leurs axones ipsilatéralement. Les neurones parvenant à se positionner ventralement constituent un noyau fortement désorganisé à projection mixte ipsi et controlatérale. Chez les souris *DCC*^{-/-} ; *robo3*^{-/-} aucun neurone olivaire ne pénètre dans la moitié ventrale du tronc cérébral. Ils se retrouvent bloqués latéralement et projettent exclusivement vers le cervelet ipsilatéral.

les neurones du pont. Ils migrent tangentiellement entre E10 et E14 depuis les régions ventriculaires de R4, à travers R5, puis atteignent R6 où ils se positionnent ventro-latéralement sous la surface piaie par migration radiaire (Auclair et coll., 1996 ; Studer et coll., 1996). La synchronisation de développement entre ces deux populations neuronales est donc étonnante : les neurones du noyau facial sont impliqués dans le guidage des neurones du pont alors qu'ils viennent juste de se positionner.

Le modèle proposé est donc le suivant (Fig.57) : en sécrétant Slit2 et Slit3, le noyau facial contribue avec la plaque du plancher à élever le taux global de Slits diffusant dans la région dorsale du tronc cérébral. Ces protéines sont alors présentes en quantités suffisantes pour activer les récepteurs Robo1 et Robo2 présents à la surface des neurones du pont sortant des lèvres rhombiques. Ceci les empêche de migrer plus ventralement et contribue à les orienter longitudinalement. Abaisser le taux de récepteurs Robos exprimés par les neurones du pont et/ou la quantité de Slits diffusant dorsalement diminue la somme des contraintes répulsives exercées sur ces neurones. Elles deviennent alors insuffisantes pour compenser les effets attractifs de la plaque du plancher et empêcher certains de ces neurones de la rejoindre trop précocement. Ainsi, l'activité du système Slit/Robo contrôle le niveau de l'axe antéro-postérieur à hauteur duquel les neurones du pont vont décrosser et se positionner.

2.2 L'action coordonnée des récepteurs Robo3 et DCC permet d'être attiré vers la plaque du plancher

Tous les NPC ont une phase de migration ventrale commune au cours de laquelle leurs axones et corps cellulaires rejoignent la ligne médiane. Nous avons démontré que DCC et Robo3 coopèrent fonctionnellement à cette étape. Les neurones du pont ou du NRL/NCE ont un phénotype très comparable chez les souris déficientes en DCC ou Robo3. Ces neurones et/ou leurs axones perdent la capacité de franchir la ligne médiane. Dans les neurones du pont, DCC et Robo3 ne sont pas requis durant la phase de migration longitudinale. En revanche ces neurones ne peuvent ensuite tourner et migrer vers la plaque du plancher (Fig.57 ; Yee et coll., 1999 ; Marillat et coll., 2004 ; observations personnelles). Le phénotype des souris *DCC*^{-/-} est aggravé par le fait que certains neurones du NRL/NCE et du pont sortent du tronc cérébral au cours de leur migration (article 4 ; Yee et coll., 1999).

Dans les neurones olivaires, la relation entre les gènes *DCC* et *robo3* est plus complexe. En l'absence de DCC, certains neurones parviennent à se positionner ventralement alors que d'autres se retrouvent bloqués latéralement. De plus une partie des neurones situés ventralement et la majorité de ceux qui sont ectopiques projettent ipsilatéralement, leur axone n'a pas franchi la plaque du plancher (Fig.58). Ainsi DCC contrôle la migration et la projection des neurones olivaires vers la plaque du plancher mais seulement partiellement. Il est apparu

que Robo3 participe au processus compensant l'absence de DCC. En effet, le phénotype des souris *robo3^{-/-}* ; *DCC^{-/-}* est beaucoup plus prononcé, plus aucun neurone olivaire ne parvient à migrer ventralement ou à projeter à travers la ligne médiane. Nous savions par l'analyse des souris déficientes en Robo3, que ce facteur est indispensable à la décussation des axones olivaires (Marillat et coll., 2004). Néanmoins, cette étude ne laissait pas supposer que Robo3 puisse diriger la migration de ces neurones, puisqu'ils parviennent tous à se positionner ventralement en son absence (Fig.58). Nous prouvons à présent que ceci requiert l'action compensatrice de DCC, qui sans Robo3 est indispensable à la migration ventrale de tous les neurones olivaires.

Le phénotype du mutant DCC s'explique par le fait que les NPC ne sont plus sensibles aux effets attractifs de la Nétrine1 (Fig.59). Dans la moelle épinière, un gradient de Nétrine1 ventro-dorsal a pu être visualisé grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques, ce facteur est donc bien susceptible de diffuser et d'agir à longue distance (Kennedy et coll., 2006). Concernant les neurones du pont, il était déjà établi que les phénotypes des souris *nétrine1^{-/-}* et *DCC^{-/-}* étaient très comparables (Serafini et coll., 1996 ; Yee et coll., 1999). Nous venons confirmer que c'est aussi le cas des neurones olivaires (article 4 ; Bloch-Gallego et coll., 1999). Cependant la déficience en Nétrine1 s'accompagne de la mort d'une grande partie des neurones olivaires (Bloch-Gallego et coll., 1999), qui pourrait être la conséquence de l'activité pro-apoptotique de DCC déclenchée en l'absence de son ligand (Jiang et coll., 2003 ; Llambi et coll., 2001). Nos travaux confirment que cette mort neuronale n'est pas déclenchée en l'absence de DCC, car aucune activité apoptotique n'est détectée dans les neurones olivaires et leur nombre reste normal (article 4 ; Mehlen, communication personnelle). Ainsi, la mort des neurones olivaires serait une conséquence directe de l'absence de Nétrine1 plutôt que secondaire aux défauts de migration. Il est donc difficile de comparer ces phénotypes afin de déterminer si DCC est le seul récepteur mis en jeu dans la réponse des NPC à la Nétrine1 *in vivo*. Nous pourrions répondre à cette question grâce à des expériences de co-cultures, en vérifiant que des neurones précérébelleux d'embryons *DCC^{-/-}* perdent toute sensibilité à la Nétrine1.

Par ailleurs, comme en ce qui concerne les axones commissuraux de la moelle épinière (Charron et coll., 2003), la Nétrine1 n'est peut-être pas le seul facteur attractif présent dans la plaque du plancher. Ceci expliquerait que ses effets en culture ne s'exercent pas sur tous les neurones olivaires (De Diego et coll., 2002). D'autres facteurs chimio-attractifs présents dans la plaque du plancher, dont Shh, pourraient également participer à leur attraction (Charron et coll., 2003). Il serait intéressant de vérifier en premier lieu si la plaque du plancher peut toujours attirer les NPC en absence de Nétrine1 *in vitro*. L'ajout de Shh soluble au milieu de culture pourrait permettre de tester sa capacité à stimuler la migration de ces neurones. Shh n'est plus exprimé à la ligne médiane des souris *Gli2^{-/-}* (Charron et coll., 2003). Nous pourrions donc

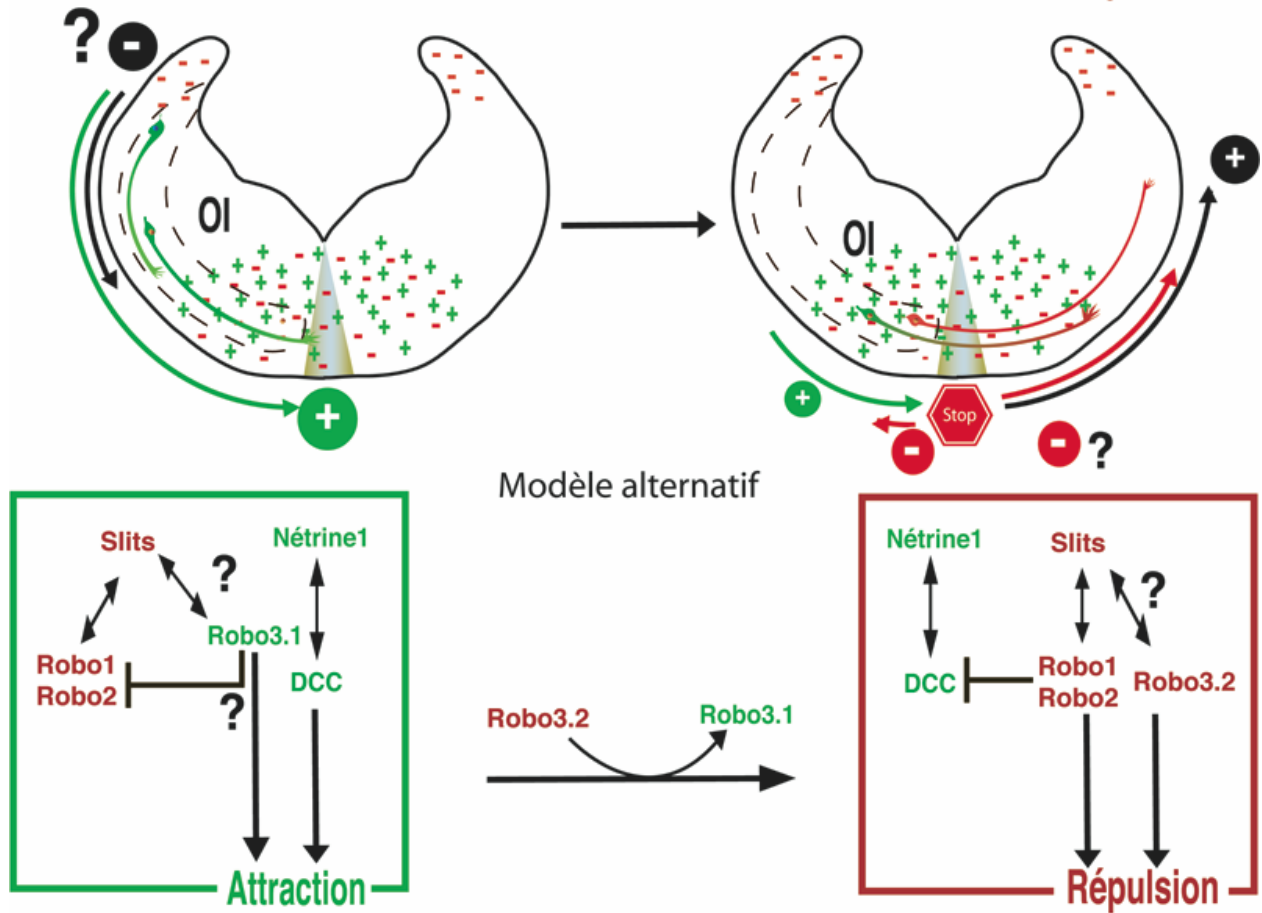
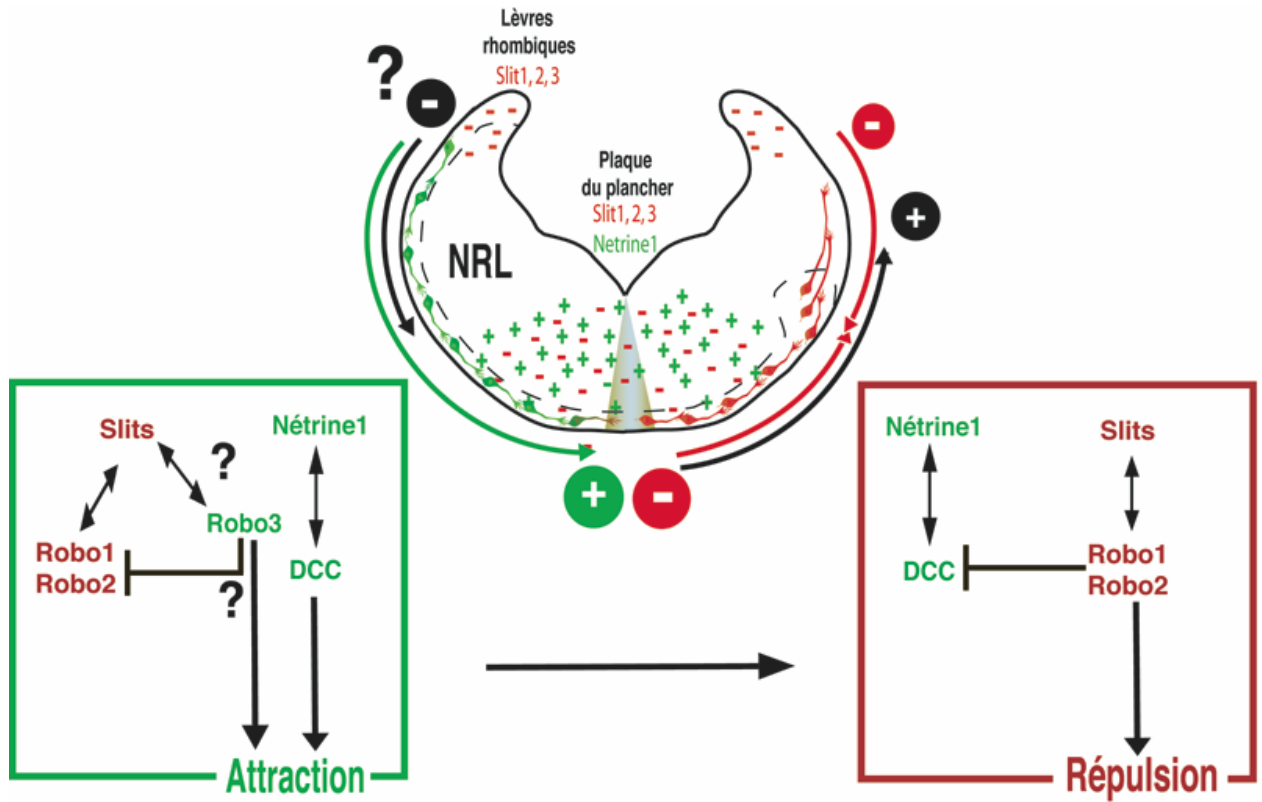


Figure 59: Guidage des neurones du NRL/NCE et de l'olive inférieure, modèle d'interactions entre les systèmes Slit/Robo et Nétrine1/DCC

La réponse des NPC aux molécules Slits et Nétrine1 dépend de la combinaison de récepteurs exprimés. En présence de Robo3, l'attraction par la plaque du plancher est dominante (cadre et flèches verts). Le récepteur DCC est actif à l'inverse des récepteurs Robo1 et Robo2. Ces récepteurs Robos sont inactivés par Robo3 (cas des neurones du NRL/NCE), qui peut également contribuer à l'action attractive de la plaque du plancher par un mécanisme inconnu (neurones olivaires). Lorsque l'expression de Robo3 disparaît, Robo1 et Robo2 actifs déclenchent la réponse répulsive aux molécules Slits secrétées dans la ligne médiane et inhibent l'activité de DCC. Les NPC perdent alors toute sensibilité à la Nétrine1 (cadre et flèches rouge).

Les mécanismes permettant aux neurones du NRL/NCE et de l'OI de quitter les lèvres rhombiques restent indéterminés, mais pourraient mettre en jeu l'effet de facteurs chimio-répulsifs concentrés dans cette régions dorsale (flèches moires, (-)). L'action attractive de la plaque du plancher permet aux NPC de migrer ventralement (flèches vertes, (+)). Les neurones du NRL/NCE ou les axones olivaires peuvent alors franchir la ligne médiane. Après cette étape décisive, l'effet répulsif des Slits devient dominant (flèches rouges, (-)). Il contribue à l'arrêt des corps cellulaires olivaires à la ligne médiane et code une information permettant aux neurones du NRL/NCE de se positionner latéralement. Une action répulsive sur la croissance des axones olivaires reste à confirmer. Des facteurs chimio-attractifs exprimés dans le cervelet ou dans la plaque alaire contribuent respectivement au guidage des axones olivaires ou des neurones du NRL/NCE post-commissuraux (flèches noires, (+)).

Un modèle d'interactions alternatif restant hypothétique, illustre comment un changement dans l'épissage alternatif du messenger de Robo3 pourrait modifier la sensibilité des NPC au franchissement de la ligne médiane. L'isoforme Robo3.1 exprimée par les neurones précommissuraux exercerait la fonction de Robo3 décrites ci-dessus, alors que Robo3.2 participerait avec les récepteurs Robo1 et Robo2 à la répulsion des neurones ou axones post-commissuraux (modèle valable dans les axones commissuraux de la moelle épinière).

analyser le phénotype des souris déficientes en Gli2 et Nétrine1. A première vue, nos résultats suggèrent que Robo3 puisse répondre à un facteur attractif exprimé au niveau médian et coopérer avec le système Nétrine1/DCC, mais nous verrons que sa fonction est sûrement plus complexe.

2.3 Arrêt des corps cellulaires à la ligne médiane : les récepteurs Robos font la différence

Il a été proposé que la plaque du plancher émette un signal déclenchant l'arrêt des neurones olivaires en migration (Bourrat et Sotelo, 1990b ; De Diego et coll., 2002). L'analyse des souris simplement et doublement déficientes en Robo1/Robo2 ou Slit1/Slit2 a révélé l'importance de ces molécules dans ce processus *in vivo*. En effet, en l'absence de leurs interactions, un nombre significatif de corps cellulaires olivaires ne s'arrête pas avant la plaque du plancher et croise anormalement la ligne médiane. Ils se positionnent dans l'olive inférieure controlatérale et projettent anormalement vers l'hémi-cervelet ipsilatéral (Fig.58). A l'inverse, les neurones du NRL/NCE doivent rester insensibles à l'activité répulsive de la plaque du plancher pour franchir la ligne médiane (De Diego et coll., 2002). En l'absence de Robo1/Robo2 ou Slit1/Slit2, ils atteignent et franchissent normalement la plaque du plancher. Ces neurones pré-commissuraux ne sont donc pas repoussés par les Slits, bien qu'ils expriment Robo1 et Robo2 (article 4, Marillat et coll., 2004) et l'activité de ces récepteurs doit donc être inactivée. Nos résultats suggèrent que Robo3, qui n'est exprimé qu'avant le croisement de la ligne médiane, en est responsable. En l'absence de Robo3, les neurones du NRL/NCE ne parviennent pas à croiser la ligne médiane (Marillat et coll., 2004). Nous confirmons que ce phénotype est dû, au moins en partie, à l'activité répulsive de Robo1 et Robo2. En effet, leur délétion semble compenser au moins partiellement l'absence de Robo3, puisque certains neurones du NRL/NCE parviennent à franchir la ligne médiane chez les souris *robo1^{-/-}* ; *robo2^{-/-}* ; *robo3^{-/-}*. L'analyse des souris déficientes en Robo1/Robo3 et Robo2/Robo3 est en cours, afin de connaître l'importance respective de Robo1 ou Robo2.

Sur la base de ces observations, nous proposons donc que Robo3 rende compte de la différence de comportement des neurones du NRL/NCE ou olivaires à la ligne médiane. Dans les neurones de l'OI, l'expression de Robo3 disparaît une fois que leurs longs prolongements guides ont franchi la ligne médiane. Ce récepteur n'est plus présent lorsque leurs corps cellulaires rejoignent la plaque du plancher. Robo1 et Robo2 sont alors actifs et participent à l'arrêt des neurones olivaires déclenché par les Slits. A l'inverse, Robo3 reste présent lorsque les neurones du NRL/NCE (prolongement guide et corps cellulaire) atteignent la plaque du plancher. Il inactive alors les récepteurs Robo1 et/ou Robo2, rend

ces neurones insensibles à l'effet répulsif des Slits et leur permet ainsi de croiser entièrement la ligne médiane (Fig.59).

2.4 Positionnement latéral post-migratoire

Nous avons vu en introduction que chez l'embryon de drosophile, les trois récepteurs Robos coordonnent le positionnement latéral des axones longitudinaux (Rajagopalan et coll., 2000b ; Simpson et coll., 2000a). Nos travaux suggèrent que cette fonction pourrait être conservée chez les vertébrés. En effet, les interactions Slit/Robo interviennent dans le positionnement des neurones du NRL et du NCE à l'issue de leur migration. En l'absence de Slit1/Slit2 ou Robo1/Robo2, les noyaux formés sont plus étendus et certains neurones du NRL sont déplacés médialement. Nous proposons que les récepteurs Robo1 et Robo2 deviennent actifs seulement quand ces neurones ont franchi la plaque du plancher. Les molécules Slits diffusant depuis les lèvres rhombiques et la plaque du plancher, codent alors une information permettant à ces neurones de rester groupés et de se positionner avec précision sur l'axe dorso-ventral (Fig.59). Par ailleurs, un facteur diffusible présent dans la plaque alaire du tube neural mais d'identité inconnue, exerce un effet attirant à distance les neurones du NRL et du NCE ayant franchi la ligne médiane. Il pourrait coopérer avec le système Slit/Robo pour permettre à ces neurones de quitter la plaque du plancher et de progresser controlatéralement (Fig.59 ; Taniguchi et coll., 2002).

Par ailleurs, les mécanismes moléculaires dirigeant les mouvements cellulaires complexes survenant durant la lamellation olivaire restaient méconnus. Nous savons que cette lamellation résulte de phénomènes intrinsèques indépendants de la mise en place de contacts avec leurs cibles au sein du cervelet (Wassef et coll., 1992). Les neurones olivaires se répartissent au sein des différentes sous-unités en fonction de leur date de naissance, les neurones nés à la même période se regroupant au sein des mêmes sous-unités (Bourrat et Sotelo, 1991). Cette compartimentation pourrait reposer sur l'expression hétérogène de facteurs protéiques comme des récepteurs à des molécules de guidage ou des molécules d'adhérence (Pourquie et coll., 1992 ; Wassef et coll., 1992 ; Chedotal et Sotelo, 1992 ; Bloch-Gallego et coll., 1999). Il était notamment supposé que ces mouvements puissent nécessiter des interactions répulsives avec la plaque du plancher, permettant aux cellules les plus latérales de s'écarter de la ligne médiane (Bourrat et Sotelo, 1991). Nous avons démontré que le système Slit/Robo intervient effectivement dans le positionnement latéral de certaines sous populations de neurones olivaires. Chez les souris *slit1*^{-/-} ; *slit2*^{-/-} et *robo1*^{-/-} ; *robo2*^{-/-}, ces neurones se répartissent bien en différentes sous-unités. En revanche, le positionnement des neurones formant la lamelle ventrale de l'olive inférieure principale (PO) et de l'olive accessoire dorsale (DAO) est affecté (Fig.58,

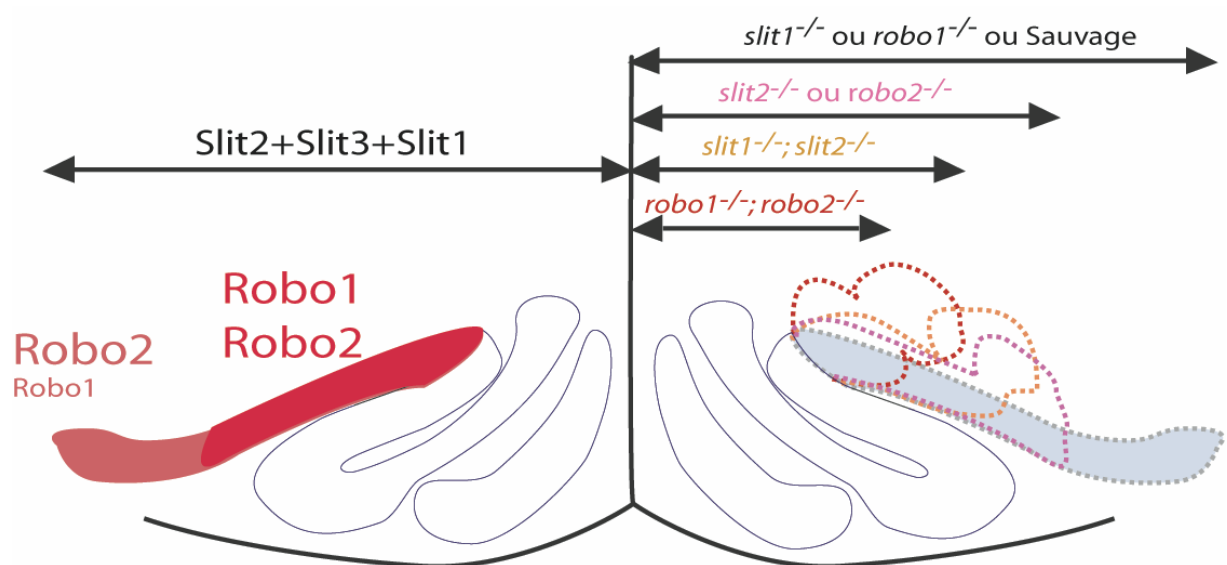


Figure 60 : Mise en jeu de l'effet répulsif des Slits dans le positionnement latéral des neurones de l'olive accessoire dorsale

Les neurones de la lamelle de l'olive accessoire dorsale (DAO) se positionnent latéralement sous l'effet répulsif des Slits diffusant depuis la plaque du plancher (gauche). L'importance relative de Robo1 et Robo2 varie en fonction de la région de la DAO considérée, le positionnement des neurones les plus latéraux repose principalement sur l'activité de Robo2.

L'étalement de la DAO varie en fonction du génotype considéré (droite, pointillés). L'absence de Slit1 et Robo1 est parfaitement compensée et n'entraîne aucun défaut. Slit2 et Robo2 sont essentiels au positionnement des neurones de la partie latérale de la DAO. Le déplacement de ces neurones se retrouve amplifié en l'absence de Slit1/Slit2 (compensation très partielle par Slit3) ou Robo1/Robo2, preuves que ces facteurs coopèrent au positionnement des neurones médians de la DAO.

60). Ces deux lamelles se retrouvent déplacées vers la ligne médiane. Les souris *slit2^{-/-}* et *robo2^{-/-}* ont un phénotype partiel et plus variable. Il affecte principalement les cellules les plus latérales de la DAO. L'action compensatrice de Slit1 ou Robo1 garantit donc toujours un positionnement normal des cellules formant la région médiane de la DAO. L'analyse des souris déficientes en Slit1/Slit2/Slit3, Robo1 ou Robo2 avait déjà révélé leur implication dans le positionnement latéral des axones de la moelle épinière en projection longitudinale. Selon le modèle proposé, l'action répulsive des Slits présents dans la ligne médiane spécifie le positionnement médian ou latéral des axones post-commissuraux exprimant respectivement Robo1 ou Robo2 (cf. introduction ; Long et coll., 2004). Concernant la DAO, nos résultats suggèrent la mise en jeu d'un mécanisme équivalent : en réponse aux Slits, l'action de Robo2 assure principalement le positionnement des neurones les plus latéraux et coopère avec Robo1 pour le positionnement des neurones médians (Fig.60).

Robo3 pourrait également jouer un rôle dans la mise en place de l'organisation olivaire. Chez les souris *robo3^{-/-}*, ce noyau est fortement désorganisé, ce qui pourrait être dû au fait que les axones olivaires ne franchissent pas la ligne médiane. En revanche, ce phénotype est aggravé chez les souris déficientes en Robo1/Robo2/Robo3, bien que la projection olivaire soit également ipsilatérale. Les neurones des différentes sous-unités olivaires se retrouvent mélangés et l'organisation lamellaire est complètement perturbée (Fig.58). Ainsi, les trois récepteurs Robos semblent réguler conjointement la ségrégation des différents compartiments olivaires. Chez l'embryon de drosophile, le système Slit/Robo contribue également à maintenir la ségrégation entre des populations cellulaires adjacentes du lobe optique. Les trois récepteurs Robos coopèrent pour empêcher certains neurones d'envahir le territoire de la lamelle adjacente où sont exprimés les Slits (Tayler et coll., 2004). De plus, lors de la morphogénèse cardiaque, les Slits présents dans la ligne médiane ont un rôle bivalent, tout comme dans notre système. D'une part, les précurseurs cardiaques exprimant seulement Robo se positionnent médialement alors que ceux co-exprimant Robo2 sont plus latéraux. D'autre part, les Slits réguleraient les interactions adhésives entre ces populations cellulaires en les empêchant de se mélanger (Santiago-Martinez et coll., 2006).

3 Précisions sur les interactions fonctionnelles entre Slits et Robos

in vivo

Les études réalisées chez les invertébrés ont révélé que les relations fonctionnelles entre Slits et Robos *in vivo* sont complexes. Chez le nématode qui ne possède qu'une seule version des ces gènes, certains aspects du phénotype du mutant *sax3 (robo)* ne sont pas retrouvés chez le mutant *slt1 (slit)*. Ceci suggère donc que ce récepteur Robo agisse indépendamment de son interaction avec Slit1 et pourrait potentiellement avoir un autre

ligand (Hao et coll., 2001). De même chez la drosophile, il a été proposé que Robo2 guide les axones sensoriels de façon non cellulaire autonome et indépendante de Slit. Exprimé à la surface de la trachée, Robo2 agirait par contact pour attirer leur cône de croissance (Parsons et coll., 2003). *In vitro*, la croissance neuritique d'axones rétiniens ou d'interneurones olfactifs est également stimulée par un support de cellules exprimant les récepteurs Robo1 ou Robo2. Nous savons que les récepteurs Robos possèdent des propriétés d'interactions homophiliques et hétérophiliques. Il est donc tout à fait concevable qu'ils puissent jouer le rôle de facteur d'adhérence (Hivert et coll., 2002). Par ailleurs, les fonctions des récepteurs Robos ne sont pas forcément redondantes. Chez l'embryon de drosophile, les trois récepteurs Robos coopèrent pour diriger le positionnement des axones longitudinaux (Rajagopalan et coll., 2000b ; Simpson et coll., 2000a) alors que le croisement de la ligne médiane est contrôlé par des propriétés redondantes de Robo et Robo2 (Rajagopalan et coll., 2000a ; Simpson et coll., 2000b). Chez la souris, l'importance respective des récepteurs Robo1 et Robo2 peut également varier selon le système neuronal considéré. Dans les axones commissuraux de la moelle épinière, bien que Robo2 soit aussi présent, seul Robo1 semble contrôler le croisement de la ligne médiane (Long et coll., 2004). Par ailleurs, nous avons montré que seul le récepteur Robo2 est exprimé par les axones issus de l'épithélium olfactif, mais qu'il coopère avec Robo1 présent à la surface de cellules guides, les « ensheating cells », pour diriger ces axones jusqu'au bulbe olfactif. La fonction de ces récepteurs paraît alors s'exercer par contact et indépendamment des Slits (cf. article annexe1). En revanche, une fois le bulbe olfactif atteint, les interactions entre Slits et Robo2 deviennent essentielles à la ségrégation dorso-ventrale des axones du nerf olfactif et à leur répartition au sein de glomérules (article annexe1 ; Cho et coll., 2007). Enfin, nous avons vu que Robo1 pourrait aussi agir indépendamment des Slits lors du guidage des interneurones corticaux (cf. introduction ; Andrews et coll., 2007). En ce qui concerne les systèmes neuronaux dont l'étude a été détaillée (articles 1, 2, 3, 4), nous démontrons que les récepteurs Robo1 et Robo2 agissent principalement en coopération et en réponse aux Slits *in vivo*.

3.1 Coopération de Robo1 et Robo2 en réponse aux Slits in vivo

Dans le télencéphale, Slit3 est peu exprimé et ne peut donc compenser l'absence de Slit1 et Slit2, ce qui explique probablement que les phénotypes des souris *robo1^{-/-}* ; *robo2^{-/-}* et *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}* soient identiques (articles 1, 2). De plus, c'est seulement lors de la délétion conjointe de Robo1 et Robo2, que les axones du TOL ou corticaux ne fixent plus les LRR2-Slits. Ceci démontre d'une part que ces deux récepteurs ont chacun la capacité d'interagir avec cette construction (confirmé également par des expériences de « binding » sur

cellules) et d'autre part qu'ils sont bien les seuls récepteurs aux Slits exprimés à la surface de ces axones.

En ce qui concerne les NPC, l'essentiel des défauts observés chez les souris *robo1^{-/-}* ; *robo2^{-/-}* sont également retrouvés chez les souris *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}*. Pour les neurones du NRL/NCE et du pont, la variabilité des anomalies de migration observées fait qu'il est difficile de comparer la gravité de ces phénotypes. En revanche dans le cas de l'olive inférieure, ces défauts sont plus prononcés chez les souris *robo1^{-/-}* ; *robo2^{-/-}* que chez les souris *slit1^{-/-}* ; *slit2^{-/-}*. Ceci reflète donc sûrement une action compensatrice partielle de Slit3, qui reste exprimé dans la plaque du plancher. L'activité chimio-répulsive de ce facteur n'a été que rarement mise en évidence. Slit3 repousse la croissance des axones issus de l'organe voméronasal, tout comme Slit1 et Slit2 (Knoll et coll., 2003 ; Patel et coll., 2001). Il inhibe également la croissance neuritique de neurones dopaminergiques (Lin et Isacson, 2006). Il conviendrait de poursuivre l'analyse comparative du développement olivaire chez les souris déficientes pour les trois gènes *slits*. Cette approche a permis de montrer qu'ils coopèrent lors du guidage des axones commissuraux de la moelle épinière et que Slit3 peut en effet compenser l'absence de Slit1 et Slit2 (Long et coll., 2004).

Chez les souris déficientes en Robo1, seule la formation du corps calleux semble perturbée (article 2 ; Andrews et coll., 2006). Toutefois, ces défauts restent mineurs et sont fortement aggravés par la délétion conjointe de Robo2. Il faut préciser que les lignées de souris déficientes en *Robo1* que nous utilisons portent des allèles hypomorphes de ce gène. Une protéine tronquée reste donc produite, mais se retrouve séquestrée dans un compartiment cellulaire. Il se peut donc qu'une très faible quantité de Robo1 reste exprimée à la membrane (Long et coll., 2004). Ceci peut expliquer que nous observions un phénotype moins important que chez une autre lignée obtenue par des méthodes de recombinaisons homologues classiques (Andrews et coll., 2006). Il conviendrait de comparer le développement des NPC chez ces deux lignées. De plus, Robo2 et Slit2 semblent avoir une importance prépondérante dans les neurones de l'OI, du NRL/NCE et les axones corticaux. Leur absence n'est compensée que partiellement par Robo1 ou Slit1 (articles 2, 4 ; Bagri et coll., 2002). L'analyse des souris doublement déficientes en Slit2 et Robo2 est en cours et devrait nous permettre de confirmer l'importance de leurs interactions *in vivo*. Robo1 n'était pas supposé intervenir lors du guidage des neurones olivaires, son expression n'ayant jamais été détectée en hybridation *in situ* (Marillat et coll., 2002 ; Causeret et coll., 2002). Nous apportons les premières données montrant que Robo1 est bien fonctionnellement actif dans ces neurones. Cependant, il est vrai que son expression dans l'OI est plus difficilement détectable en hybridation *in situ* et moins étendue que celle de Robo2, ce qui expliquerait que ses capacités compensatrices ne soient que partielles. Les données

d'expression obtenues ne constituent que des preuves indirectes de la présence de Robo1 et Robo2 dans les neurones du NRL/NCE ou de l'OI. Celle-ci n'a pas encore pu être détectée par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Nous tentons actuellement de caractériser leur présence grâce à l'utilisation des constructions LRR2-Slits couplée à la phosphatase alcaline.

Les différences fonctionnelles entre Slit1 et Slit2 peuvent être dues à des variations subtiles dans l'expression et la répartition de ces molécules. La nature des défauts observés nous laisse supposer que ces protéines peuvent diffuser en gradients et agir à distance de leurs sources. L'existence d'un tel gradient médian a été caractérisée chez le nématode (Hao et coll., 2001) et dernièrement chez la drosophile (Hohenester et coll., 2006), mais sa fonction n'est pas évidente. Chez l'embryon de drosophile, la surexpression des Slits dans la ligne médiane supposée modifier ce gradient répulsif, ne déplace pas les faisceaux longitudinaux latéralement. Un autre mécanisme d'action a été proposé : les Slits se fixeraient durablement aux récepteurs Robos présents à la surface des axones commissuraux lors de leur passage dans la ligne médiane. La quantité de protéines Robos exprimées déterminerait le taux de protéines Slits chargées et contrôlerait ainsi la position latérale à adopter. Il devient essentiel de connaître la distribution exacte des protéines Slits dans le tronc cérébral et le télencéphale. Nous manquons cependant d'anticorps qui nous permettraient de détecter spécifiquement chaque Slit. Nous développons actuellement des constructions composées des domaines IG1/IG2 des récepteurs Robos (domaines suffisants pour lier les Slits ; Howitt et coll., 2004) couplés à la phosphatase alcaline. Celles-ci pourront être utilisées en « binding » sur coupes de cerveaux embryonnaires afin de révéler la répartition des protéines Slits *in vivo*.

3.2 Nouvelles preuves de la complexité d'action de Robo3

Dans les axones commissuraux de la moelle épinière, la fonction de Robo3 passe essentiellement par une inhibition de l'activité répulsive du récepteur Robo1 déclenchée en réponse aux Slits (Sabatier et coll., 2004). L'analyse des souris *robo1^{-/-}* ; *robo2^{-/-}* ; *robo3^{-/-}* a montré que ce schéma d'interaction s'applique peut être aux neurones du NCE/NRL, mais sûrement pas aux neurones olivaires. En effet, les anomalies de projection olivaire observées chez les souris *robo3^{-/-}* (projection ipsilatérale) ne sont pas compensées par la délétion conjointe de Robo1 et Robo2. Cette compensation apparaît également minime dans les neurones du pont (analyse en cours). Nous ne pouvons pas nous prononcer sur la nature de cette action dominante de Robo3, mais seulement affirmer qu'elle est indépendante de Robo1 et Robo2. Nous avons vu également que Robo3 coopère avec DCC pour permettre aux neurones du pont ou aux neurones olivaires d'atteindre la ligne médiane. L'hypothèse la plus

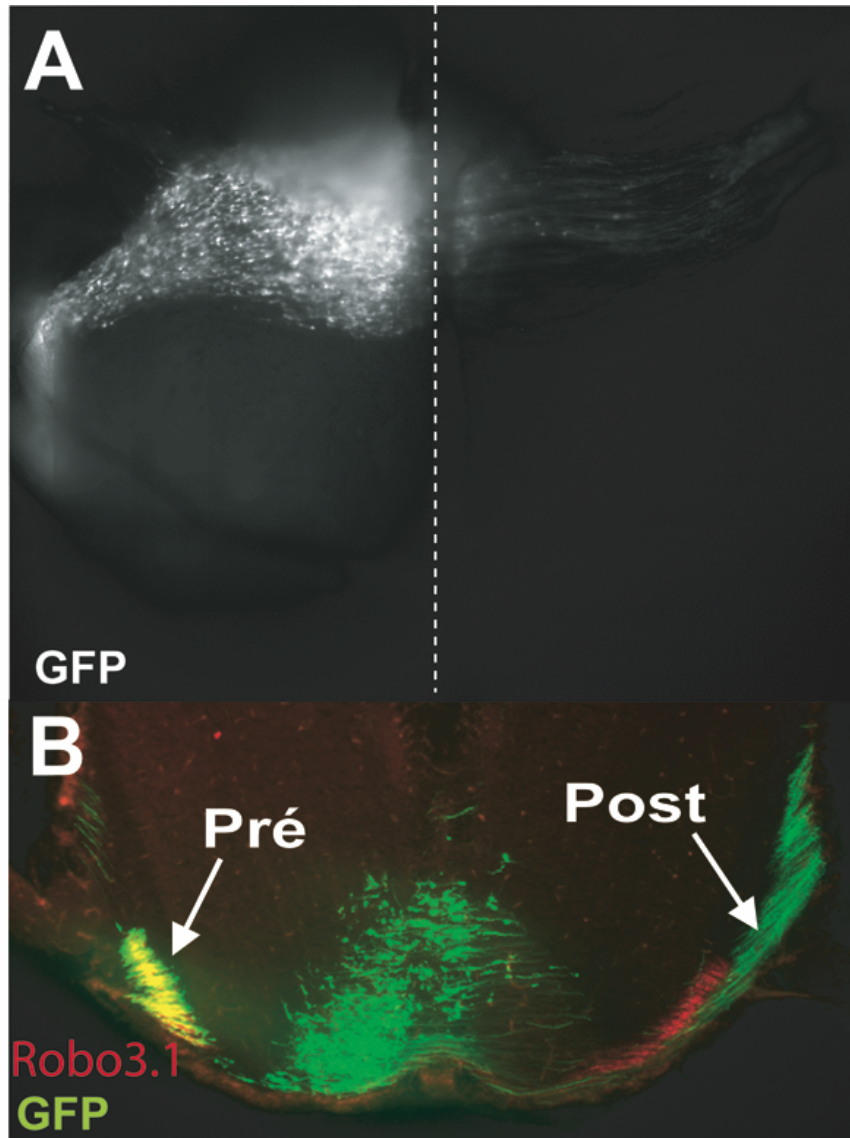


Figure 61: Application de la technique d'électroporation *in utero* des lèvres rhombiques

Une technique d'électroporation *in utero* permet de transférer unilatéralement les neurones du pont avec un vecteur codant la GFP. Ils sont ici électroporés à E13 et observés après trois jours de développement *in utero*. Les neurones du pont marqués (A, tronc cérébral vue ventrale) sont répartis tout au long de la voie de migration marginale antérieure. Leurs corps cellulaires s'arrêtent ventralement alors que leurs axones croisant la ligne médiane s'allongent indépendamment en direction du cervelet controlatéral.

En coupe coronale (B, GFP en vert), il apparaît que Robo3.1 (anticorps révélé en Rouge) est exprimée à la surface des neurones pré-commissuraux (pré) mais pas à la surface des axones ayant franchi la ligne médiane (post).

simple reste que Robo3 soit un récepteur attractif aux Slits. Il pourrait agir comme le récepteur Robo2 chez l'embryon de drosophile qui permet aux branches trachéales d'être attirées par les Slits exprimés au niveau de leurs cibles (action antagonisée par le récepteur Robo ; Englund et coll., 2002). Il serait intéressant de tester l'effet de la surexpression de Robo3 dans les NPC, afin de vérifier si celle-ci reproduit les effets de la délétion de Robo1 et Robo2. Nous pourrions également transfecter *robo3* dans des neurones qui n'expriment normalement que Robo1 et Robo2, comme les cellules mitrales à l'origine du TOL. Ceci permettrait de tester sa capacité à modifier la réponse axonale aux Slits *in vitro*. En l'absence des facteurs de transcription Sim1 et Sim2, les axones issus des neurones du corps mamillaire poussent anormalement vers la ligne médiane, alors qu'ils devraient atteindre le thalamus ipsilatéral. Robo3 est anormalement présent à la surface de ces axones et apparaît en effet inhiber l'activation de Robo1 en réponse aux Slits présents au niveau médian (Marion et coll., 2005).

Les mécanismes d'action de Robo3 restent donc inconnus. Il n'apparaît pas contrôler le trafic des autres protéines Robos comme Commissureless chez la drosophile (Sabatier et coll., 2004). Une hypothèse serait que Robo3 en se fixant sur les récepteurs Robo1 et Robo2 à la membrane, inhibe ou module leur activité. La capacité de Robo3 à lier Robo1 a déjà été démontrée par covasphères (Camurri et coll., 2005). Des expériences de co-immunoprécipitations réalisées au laboratoire confirment cette interaction. Le taux d'expression membranaire de Robo3 serait alors déterminant, car il doit être suffisant pour inhiber l'ensemble des récepteurs Robo1 et Robo2 présents (Camurri et coll., 2005).

Il convient également de préciser que l'étude de la fonction de Robo3 (comme des autres récepteurs Robos) nécessite de prendre en compte un nouveau niveau de complexité imposé par l'existence de plusieurs isoformes de cette protéine. En effet, celles-ci peuvent avoir des propriétés opposées. Par exemple chez l'homme, les isoformes Robo3A et Robo3B diffèrent par leurs extrémités N-terminales et, semble-t-il, leurs capacités à lier Slit2 (Camurri et coll., 2005 ; Mambetisaeva et coll., 2005). Un patient atteint du syndrome HGPPS est affecté d'une mutation du gène *robo3* qui ne devrait affecter que Robo3A. Cette isoforme serait donc la seule essentielle au croisement de la ligne médiane (Jen et coll., 2004). Par ailleurs, le laboratoire du docteur Tessier-Lavigne a identifié dernièrement l'existence de deux isoformes, Robo3.1 et Robo3.2 qui possèdent des domaines intra-cytoplasmiques différents (communication personnelle). Dans les axones commissuraux de la moelle épinière, l'isoforme Robo3.1 est exprimée avant le croisement de la ligne médiane et semblerait responsable de l'inhibition de l'activité de Robo1. En revanche, Robo3.2 n'est exprimée qu'à la surface des axones post-commissuraux et possède une activité répulsive. Nous étudions actuellement la dynamique d'expression de ces deux isoformes dans les neurones précérébelleux. Concernant les neurones du pont, nous avons vérifié que l'isoforme Robo3.1 disparaît de la surface des axones

ayant franchi la ligne médiane (Fig.61). Nous testons également par des approches biochimiques leurs capacités respectives à lier les Slits et à interagir avec les autres récepteurs Robos et DCC *in vitro*.

4 Partenaires à l'action du système Slit/Robo in vivo

4.1 Inhibition de l'attraction Nétrine1/DCC

Les interactions fonctionnelles entre les systèmes Slit/Robo et Nétrine/DCC sont complexes. Chez le nématode, certains défauts liés à un gain de fonction du gène *slt1* (Slit) peuvent être supprimés par la délétion de *unc40* (DCC). De plus, les animaux trans-hétérozygotes pour les gènes *sax3* (Robo) et *unc40* sont phénotypiquement similaires à un homozygote *sax3* mutant (Yu et coll., 2002). Ces données montrent que Unc40 agit indépendamment de Unc6 (Nétrine) et participe à la réponse répulsive déclenchée par les Slits en potentialisant l'action de Sax3. Par ailleurs, nous avons vu que l'influence inhibitrice du complexe Slit/Robo (en l'occurrence Robo1) sur l'activité du complexe Nétrine1/DCC constituait un point clé régulant la balance entre attraction et répulsion à la ligne médiane (Stein et Tessier-Lavigne, 2001). Cette inhibition passerait par une interaction directe entre les domaines intra-cytoplasmiques CC3 de Robo1 et P3 de DCC (Stein et Tessier-Lavigne, 2001). En d'autres termes, les Slits ont la capacité d'inhiber directement l'action de la Nétrine. Certains défendent l'hypothèse selon laquelle les défauts de guidage apparaissant lors de l'inactivation du système Slit/Robo sont essentiellement dus à une « désinhibition » anormale de l'action de DCC, plutôt qu'à une perte d'interactions répulsives. Chez la drosophile, cette hypothèse a été testée par l'analyse des animaux déficients en Nétrines/Slit ou Nétrines/Robo (Bhat, 2005 ; Garbe et Bashaw, 2007). Les phénotypes de ces mutants semblent bien différents de celui des embryons simplement déficients en Nétrines, ce qui confirme l'existence d'une activité des Slits indépendante (Garbe et Bashaw, 2007). Chez les vertébrés, il est clair que les Slits peuvent également agir indépendamment du système Nétrine1/DCC. Par exemple, les axones du TOL sont sensibles à leurs effets et n'expriment pas DCC (article 1 ; Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2002 ; Kawasaki et coll., 2006). En revanche en ce qui concerne les NPC, les défauts observés chez les souris déficientes en Slit1/Slit2 ou Robo1/Robo2 pourraient s'expliquer par le fait que ces neurones sont anormalement sensibles à la Nétrine1 (Fig.59). En effet, les NPC affectés (neurones du pont ectopiques, cellules olivaires traversant la ligne médiane ou mal positionnées etc.) expriment tous DCC et sont déplacés vers la plaque du plancher, source de Nétrine1 (Bloch-Gallego et coll., 1999 ; Yee et coll., 1999 ; observations personnelles). Par ailleurs, il est vrai qu'en culture les Slits n'ont qu'une faible activité répulsive sur la migration des NPC alors qu'ils peuvent inhiber leur réponse à la Nétrine1 (Causeret et coll., 2002). Nous devrions pouvoir vérifier que cette action inhibitrice des Slits dépend de la présence de Robo1 et Robo2. Il serait

également très instructif de créer des souris transgéniques chez lesquelles la séquence des gènes *robo1* et *robo2* codant le domaine CC1 a été excisée. Ceci permettrait d'étudier les effets de la dissociation entre la fonction répulsive de ces récepteurs qui devrait être maintenue et leur fonction inhibitrice de DCC qui serait alors inactivée. Ainsi nous pourrions déterminer si les Slits agissent dans les NPC indépendamment ou non de la Nétrine1. Dans le même esprit, la délétion du domaine P3 de DCC ou son remplacement par un domaine hétérologue de dimérisation (Stein et Tessier-Lavigne, 2001), donnerait un récepteur gardant sa fonction attractive, mais non soumis à l'action inhibitrice de Slit/Robo.

Enfin, le domaine CC1 d'interaction à DCC, n'étant pas présents chez Robo3, celui-ci était supposé lier DCC (Stein et Tessier-Lavigne, 2001 ; Marillat et coll., 2004). Des résultats obtenus au laboratoire démontrent que l'isoforme Robo3.2 peut interagir avec le domaine intracytoplasmique de DCC, contrairement à l'isoforme Robo3.1. Cette capacité de liaison semble donc dépendre d'un domaine localisé dans une région proche de CC3 seulement présent dans Robo3.2. L'isoforme répulsive Robo3.2 peut donc potentiellement inhiber l'activité de DCC comme Robo1 et Robo2. Par ailleurs, la présence de Robo3.1 pourrait au contraire empêcher Robo1 et Robo2 de lier et d'inhiber DCC (résultats obtenus par Y. Zagar). Ce modèle d'interaction expliquerait l'ensemble de nos observations *in vivo* : la répulsion par les Slits sécrétés par la plaque du plancher serait par défaut dominante sur l'attraction Nétrine1, mais la présence de Robo3.1 suffirait à renverser ce rapport. Il libérerait alors l'action de DCC tout en contribuant à guider les NPC alors capables de rejoindre et/ou de croiser la ligne médiane (Fig.59, modèle alternatif).

4.2 Compensation fonctionnelle par d'autres systèmes de guidage

Les défauts de guidage apparaissant chez les souris déficientes en Slit1/Slit2 ou Robo1/Robo2 sont toujours partiels, ce qui suggère la mise en jeu de processus de guidage compensatoires. Nous avons vu en introduction que de nombreux systèmes de guidage coopèrent avec Slit/Robo au guidage des voies de projections axonales du télencéphale. Il semble que ce soit aussi le cas pour les NPC. En effet, l'absence des gènes Slits ou Robos n'affecte que certaines étapes précises de leur migration. Ils ne paraissent pas intervenir dans le départ en migration des NPC nouvellement générés dans les lèvres rhombiques. De plus, leur action ne contrôle pas l'arrêt des neurones du pont à la ligne médiane, contrairement aux neurones olivaires. Il est aussi intéressant de constater qu'à la différence d'autres systèmes neuronaux, la perturbation des interactions entre les Slit1/Slit2 et Robo1/Robo2 ne cause pas de défauts majeurs de projection axonale post-commissurale. Les axones des NPC atteignent majoritairement le cervelet contralatéral, ce qui pourrait mettre en jeu une action compensatrice de Slit3 ou Robo3.2. Il faut également envisager que certains axones post-commissuraux ne puissent

quitter la ligne médiane ou atteindre le cervelet, ce que nous n'avons pu vérifier. Grâce à la technique d'électroporation *in utero* d'un vecteur codant la GFP, il devient possible de visualiser et analyser la trajectoire des axones pontins post-commissuraux et suivre en vidéo-microscopie leur dynamique de croissance. Nous envisageons de l'appliquer à l'étude de nos mutants. Par ailleurs, il est remarquable qu'en l'absence de Robo3 ou DCC, les NPC qui ne croisent pas la ligne médiane projettent quand même vers le cervelet. Il a été démontré qu'un facteur diffusible exprimé dans cette région cible attire à longue distance la croissance des axones olivaires post-commissuraux (Fig.59 ; Zhu et coll., 2003). Cependant, son identité reste à déterminer et son action n'a pas été généralisée à tous les NPC. Il se pourrait donc que chez les souris Robo3^{-/-}, les axones olivaires soient anormalement sensibles à ce facteur attractif avant d'avoir croisé la ligne médiane.

La fonction d'autres facteurs de guidage à activité répulsive présents dans la ligne médiane est également à envisager. Chez le rat, l'expression des récepteurs Unc5h est activée quand les neurones pontins et olivaires quittent les lèvres rhombiques et atteignent la ligne médiane. Il a été proposé qu'ils interviennent en réponse à la Nétrine1 dans l'arrêt et le positionnement de ces neurones à la ligne médiane (Yee et coll., 1999 ; Bloch-Gallego et coll., 1999 ; Alcantara et coll., 2000). Les récepteurs EphB1 et EphB2 sont aussi exprimés par les neurones olivaires en migration chez la souris. Leurs ligands répulsifs ephrineB3, ephrineB1 et ephrineA5 sont bien présents dans la plaque du plancher ou dans les régions délimitant la voie de migration olivaires (De Diego et coll., 2002). Chez le poulet, cette famille de molécules contribue au développement de la topographie de projection olivaire au sein du cervelet qui repose sur des facteurs de guidage locaux (Nishida et coll., 2002 ; Chedotal et coll., 1997). Sa fonction dans le contrôle de la migration tangentielle de ces neurones reste à déterminer. Enfin, l'expression de la Séma3A est détectée dans la plaque du plancher, alors que ses récepteurs Neuropilines1 et Neuropilines1 sont respectivement présents dans les neurones pontins et olivaires en migration (De Diego et coll., 2002 ; Solowska et coll., 2002). Le récepteur Neuropiline1 semble intervenir dans la répartition des fibres moussues au sein du cervelet (Rabacchi et coll., 1999). Ce système pourrait également contrôler avec Slit/Robo la répulsion des axones ou neurones précérébelleux post-commissuraux, comme dans la moelle épinière (Zou et coll., 2000).

De même l'action du système Slits n'explique pas que les neurones du pont migrent avec une orientation rostrale. Les facteurs diffusibles Shh et Wnt4 sont impliqués dans le choix d'orientation rostrale des axones post-commissuraux en croissance longitudinale. Ces protéines diffusent le long de la moelle épinière en deux gradients d'orientations opposées. Wnt4 plus concentré rostralement attire les axones commissuraux (Lyuksyutova et coll., 2003) à l'inverse de Shh qui les repousse des régions caudales (Bourikas et coll., 2005). Un tel système pourrait également être mis en jeu durant le guidage des neurones du pont, ce qui justifierait de tester

les effets de ces facteurs diffusibles en culture. Nous pourrions envisager qu'un facteur chimio-attractif diffuse depuis la région antérieure occupée par le noyau du nerf trijumeau vers lequel les neurones du pont orientent leur migration longitudinale.

4.3 Interactions avec la chimiokine SDF1

Il est récemment apparu que le système Slit/Robo est également capable d'influencer la migration de leucocytes ou de cellules tumorales en modifiant leur sensibilité à la chimiokine SDF1 (Stromal-derived factor). Celle-ci stimule la migration de ces cellules en interaction avec le récepteur CXCR4, mais cet effet se trouve inhibé par l'activation de Slit/Robo. La liaison de Slit2 à Robo1 déclenche l'interaction de son domaine CC3 avec CXCR4 et inactive une partie de la signalisation déclenchée en aval de SDF1 (Wu et coll., 2001b ; Prasad et coll., 2004 ; Prasad et coll., 2007). SDF1 agit également comme un facteur de guidage neuronal. Cette chimiokine est exprimée par les méninges et stimule la migration tangentielle des cellules de Cajal Retzius (Borrell and Marin, 2006) ou exerce un effet attractif sur les précurseurs des cellules granulaires du cervelet (Klein et coll., 2001 ; Zhu et coll., 2002). L'interaction de SDF1 avec son récepteur CXCR4 peut également attirer les axones rétiniens (Li et coll., 2005) ou inhiber leur sensibilité à l'activité répulsive des Slits (Chalasani et coll., 2003). SDF1 intervient durant la migration des neurones du pont, celle-ci est perturbée chez les animaux déficients pour son récepteur CXCR4 (Vilz et coll., 2005). Son action attractive pourrait expliquer que les NPC à fibres moussues empruntent une voie de migration superficielle en se positionnant juste sous les méninges. Elle est également susceptible de modifier la réponse de ces neurones aux Slits et réciproquement. Il serait donc intéressant de vérifier en culture si SDF1 stimule la migration des NPC en présence ou non de Slits.

4.4 Interactions fonctionnelles avec les héparanes sulfates

Les molécules Slits et Robos peuvent interagir avec des protéoglycanes chargés en héparanes sulfates, qui sont présents dans la matrice extracellulaire et à la surface cellulaire. Il a d'abord été montré que Slit1 et Slit2 interagissent avec l'héparine (Liang et coll., 1999) puis avec le Glypican1 (un protéoglycane à héparane sulfate glypié ; Liang et coll., 1999) et le Syndecan (Johnson et coll., 2004) ; Wang et coll., 1999). Les héparanes sulfates peuvent moduler l'interaction entre Slit et Robo. En effet, un traitement à l'héparinase III réduit l'affinité de Slit2 pour Robo1 et inhibe toute son activité répulsive sur la croissance axonale ou la migration neuronale en culture (Hu, 2001). L'héparine est capable d'interagir avec le domaine du LRR2 des Slits liant les récepteurs Robos. La formation d'un complexe entre ces trois partenaires est également essentielle à l'effet de collapsus des Slits sur les cônes de croissance rétiniens (Hussain et coll., 2006). Par ailleurs, des expériences d'immunoprécipitation réalisées à partir

d'extraits d'embryons de drosophile montrent que le Syndecan est capable d'interagir directement avec Slit ou Robo (Johnson et coll., 2004). Le Syndecan comme le Glypican, lie plus fortement le fragment C-terminal des Slits qui n'est pas requis à leur activité chimio-répulsive (Liang et coll., 1999 ; Ronca et coll., 2001a ; Nguyen Ba-Charvet et coll., 2001). Ces données suggèrent donc que les protéoglycans ont plusieurs rôles dans la modulation de la signalisation Slit/Robo. Ils pourraient intervenir dans la formation d'un complexe stabilisant l'interaction entre ces deux partenaires. Une liaison au domaine C-terminal des Slits modifierait leurs propriétés de diffusion et les concentrerait à la surface des cônes de croissance. L'action des héparanes sulfates pourrait ainsi expliquer certaines différences dans l'activité physiologique des protéines Slits entières et de leurs fragments protéolytiques.

In vivo, cette interaction joue un rôle critique dans l'activité des Slits et les héparanes sulfates participent à la mise en place des projections axonales commissurales (Steigemann et coll., 2004 ; Bulow and Hobert, 2004 ; Rhiner et coll., 2005). Dans le système nerveux embryonnaire de drosophile, le patron d'expression du Syndecan est similaire à celui des récepteurs Robos. Les mutants qui en sont dépourvu présentent l'essentiel des défauts de guidage observés chez les mutants *slit* ou *robo*. L'analyse des interactions entre ces gènes a confirmé que le Syndecan participe à l'efficacité de la signalisation Slit/Robo dans les neurones cibles (Steigemann et coll., 2004 ; Johnson et coll., 2004). Il est également nécessaire à la formation d'un gradient de Slits secrétés depuis la ligne médiane, répartition qui se trouve altérée en son absence. De plus, il existe une redondance fonctionnelle entre les différentes familles de protéoglycans. En effet, la surexpression du glypican Dallylike compense de façon significative le phénotype lié à la perte du Syndecan (Johnson et coll., 2004). Des interactions génétiques entre plusieurs enzymes de biosynthèse des héparanes sulfates et la voie de signalisation Slit/Robo ont également été mises en évidence chez le Nématode (Bulow and Hobert, 2004). En ce qui concerne les vertébrés, la délétion de ces enzymes chez le poisson zèbre et la souris entraîne de nombreux défauts de développement des commissures du système nerveux (Lee and Chien, 2004 ; Inatani et coll., 2003 ; Pratt et coll., 2006). Certains sont similaires à ceux observés chez des animaux déficients pour Slits ou Robos. Chez la souris, une délétion conditionnelle du gène *Ext1* (Exostose1), une glycosyltransferase requise pour la synthèse des héparanes sulfates, empêche la formation de plusieurs commissures du cerveau antérieur dont le corps calleux, la commissure antérieure et la commissure hippocampique (Inatani et coll., 2003). Dans la moelle épinière, *Ext1* agit de façon cellulaire autonome lors du guidage des axones commissuraux. Sa délétion altère la signalisation liée à l'interaction entre la Nétrine1 et son récepteur DCC (Matsumoto et coll., 2007). Le guidage des axones rétiniens est également fortement perturbé chez les mutants *Ext1*, avec l'apparition de défauts de guidage post-commissuraux identiques à ceux observés chez les souris déficientes en *Slit1* et *Slit2*. De plus,

des erreurs de guidage similaires apparaissent chez des souris *slit2*^{-/-} seulement lors de la délétion conjointe d'un allèle de *Etx1*, ce qui supporte l'existence d'une interaction fonctionnelle entre ces deux molécules (Inatani et coll., 2003). Une étude plus récemment réalisée chez le poisson zèbre démontre l'importance d'autres enzymes sulfotransférases, Hs2st et Hs6st1, exprimées à la fois dans par les cellules ganglionnaires de la rétine et dans le chiasma optique. Ces facteurs sont requis au maintien de la réponse des axones rétiniens à Slit2 *in vitro*, ce qui expliquerait que des erreurs de guidage surviennent au niveau du chiasma optique en leur absence (Pratt et coll., 2006). Les héparanes sulfates, substrats de ces enzymes, semblent donc bien jouer un rôle physiologique dans la régulation de l'activité du système Slit/Robo *in vivo*.

4.5 Voies de signalisation impliquées dans la réponse aux Slits

La liaison des molécules de guidages à leurs récepteurs déclenche des cascades d'événements cytoplasmiques qui mènent à des réarrangements du cytosquelette et à des modifications des capacités d'adhérence cellulaires. Afin de comprendre l'action du système Slit/Robo *in vivo*, il est essentiel de connaître les facteurs intervenant dans les voies de signalisation associées. J'aimerais revenir sur l'action de certains d'entre eux.

4.5.1 Contrôle de l'activité des RhoGTPases

Les protéines appartenant à la famille des RhoGTPases, telles que RhoA, Rac1 ou Cdc42 jouent un rôle important dans la régulation du cytosquelette d'actine au cours de la croissance axonale et de la migration neuronale. Robo contrôle l'activité de plusieurs RhoGTPases par l'intermédiaire de protéines à activité GAP (GTPase activating protéine ; pour revue Ghose and Van Vactor, 2002). Trois membres d'une même famille srGAP1, 2 et 3 (slit-robo GAP) ont été identifiés par un crible double hybride, pour leur interaction avec le domaine intracellulaire Robo1 (Wong et coll., 2001). La srGAP3 est principalement un modulateur de l'activité de Rac1 (Endris et coll., 2002). La srGAP1 est capable d'inactiver spécifiquement Cdc42 et au contraire d'activer RhoA. L'inhibition des srGAPs ou l'activation constitutive de Cdc42, bloque l'effet répulsif des Slits sur la migration d'interneurones issus de la zone sous-ventriculaire (Wong et coll., 2001). Ces données suggèrent que le récepteur Robo1 présent à la surface de ces neurones induit par l'intermédiaire des srGAP l'inactivation de Cdc42. Les srGAP1 et srGAP3 lient la région CC3 de Robo1 via un domaine SH3, et SrGAP1 peut également lier CC2 (Wong et coll., 2001). La signalisation des récepteurs Robos met en jeu également les GAP vilse/Cross conservées entre les invertébrées et les mammifères (Lundstrom et coll., 2004 ; Hu et coll., 2005). Chez la drosophile, elles participent à la modulation de l'activité de Rac déclenchée par Robo et contribuent à sa fonction répulsive lors du croisement de la ligne médiane. Ces GAPs

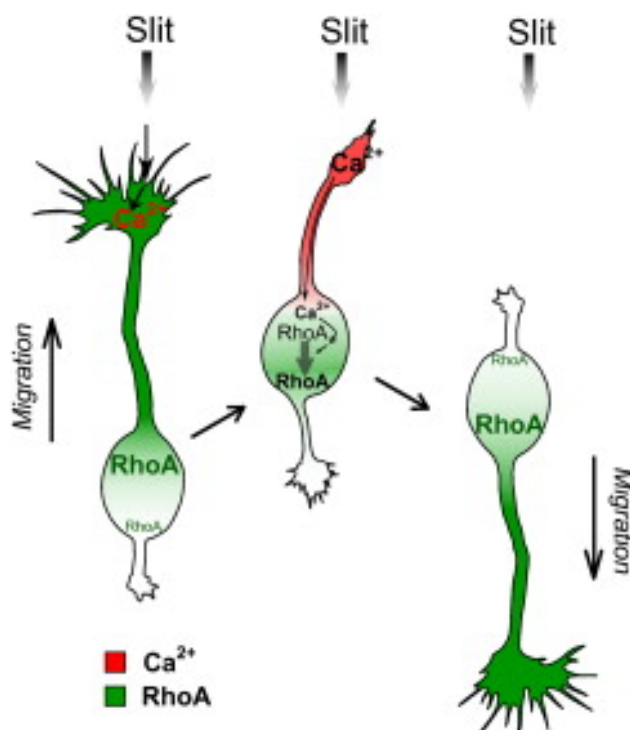


Figure 62: Modèle d'inversion du sens de migration neuronal sous l'action des Slits

Dans une cellule granulaire en migration, RhoA est distribué en gradient décroissant depuis le front de migration jusqu'au soma (gauche). Une exposition frontale à Slit2 entraîne une élévation du taux de Ca²⁺ dans le cône de croissance qui va se propager vers le soma (milieu). Ceci mène à la redistribution de RhoA dont l'activité est requise pour inverser le sens de migration (droite). (Adapté de Guan et coll., 2007)

sont aussi capables d'interagir avec le domaine CC2 de Robo (Lundstrom et coll., 2004). Par ailleurs, chez la drosophile, les gènes *slit* et *robos* interagissent génétiquement avec *dock* et *pak* durant le guidage des axones au niveau de la ligne médiane, indiquant une possible interaction physiologique entre les produits de ces gènes (Fan et coll., 2003). Dock est une protéine adaptatrice qui peut se lier au domaine intracellulaire de Robo et permet le recrutement de PAK en réponse à une stimulation par Slit (Fan et coll., 2003). Ce recrutement s'accompagne d'une activation des trois protéines homologues de Rac chez la drosophile. Les domaines d'interaction de Robo avec Dock et srGAP se recoupent en partie, ce qui laisse envisager une compétition possible entre ces deux voies de signalisation.

Les mêmes RhoGTPases interviennent vraisemblablement dans la transduction du signal déclenchée par le couple Nétrine1/DCC. La réponse à la Nétrine1 dans plusieurs systèmes neuronaux est inhibée par des formes dominantes négatives de Rac1 et Cdc42 ou favorisée par l'inhibition de RhoA (Li et coll., 2002c ; Shekarabi and Kennedy, 2002 ; Shekarabi et coll., 2005). Ainsi, cette réponse passe par une inactivation de Cdc42 ou RhoA, effet antagoniste à la voie de signalisation Slit/Robo. En revanche, ces deux systèmes de guidages pourraient avoir un effet synergique sur l'activation de Rac1. Le lien entre DCC et Rac1 pourrait, comme pour les récepteurs Robos, passer par la protéine adaptatrice Nck1 (homologue de Dock chez la souris). En effet, le domaine intracellulaire de DCC interagit directement avec Nck1 et l'inhibition de cette interaction abolit sa capacité à activer de Rac1 (Li et coll., 2002b ; Yuan et coll., 2003b). Il est donc possible d'imaginer que Robos et DCC entrent en compétition pour recruter localement Nck-1 ou moduler l'activité de Cdc42.

Les neurones du NRL/NCE ou de l'OI expriment différentes combinaisons de RhoGTPases (Causeret et coll., 2004). Néanmoins, il est pour l'instant difficile d'établir un lien entre leur activité et la régulation du croisement de ligne médiane sous l'action coordonnée des Slits et de la Nétrine1. Il apparaît cependant que les RhoGTPases peuvent agir de façon indépendante sur l'élongation neuritique ou la migration des NPC. En culture, la croissance neuritique stimulée par la Nétrine1 est inhibée par la présence de formes dominantes négatives de Rac1 et Cdc42, qui n'ont par ailleurs aucun effet sur la motilité des corps cellulaires. En revanche, l'inhibition des RhoA/B/C ou de leur effecteur Rock stimule la croissance neuritique alors qu'elle bloque complètement la nucléokinèse (Causeret et coll., 2004). Par ailleurs, une étude récente montre que Robo2 est particulièrement accumulé à l'extrémité du prolongement guide de neurones granulaires en migration. Son interaction avec Slit2 déclenche le collapsus de ce prolongement guide ainsi que la propagation d'une vague calcique qui diffuse jusqu'au soma. Ce signal entraîne l'activation et la redistribution de RhoA qui vient se concentrer au niveau du soma et contribue alors à inverser le sens de nucléokinèse (Fig.62 ; Guan et coll., 2007). Ce modèle pourrait s'appliquer aux neurones du NRL/NCE ou du pont qui ont un prolongement guide court.

En revanche, il est plus probable que les Slits agissent directement sur les corps cellulaires des neurones olivaires afin de les arrêter à la ligne médiane indépendamment de leurs axones.

4.5.2 Interaction avec la kinase Abelson et son substrat Enabled

Chez la drosophile, la kinase Abl (Abelson) et son substrat Ena (Enabled), un régulateur bien caractérisé de l'actine, jouent un rôle dans la transduction du signal répulsif Slit/Robo au niveau de la ligne médiane. Des interactions génétiques suggèrent tout d'abord que Abl et Ena ont des fonctions antagonistes (Bashaw et coll., 2000). En effet, en l'absence de Ena qui lie normalement le domaine CC2 de Robo, la répulsion axonale déclenchée par le couple Slit/Robo est diminuée. Au contraire, Abl peut agir comme un régulateur négatif de la signalisation en aval de ce récepteur. Il interagit avec le motif CC3 et phosphoryle CC1 de Robo, ce qui bloque la répulsion induite par Slit. Une mutation du site de phosphorylation de CC1 entraîne une hyperactivité de Robo (Bashaw et coll., 2000). Cependant Abl n'a pas qu'une influence inhibitrice sur la signalisation Slit/Robo. Cette kinase peut recruter la protéine Capulet en réponse à l'activation de Robo et inhiber la polymérisation de l'actine via la formation de ce complexe (Wills et coll., 1999). D'autres études ont ensuite confirmé ce rôle ambivalent d'Abl sur la signalisation déclenchée par les Slits (Hsouna et coll., 2003).

Des approches génétiques menées chez le nématode suggèrent que UNC34, l'homologue de Ena, intervient en aval de SAX3/Robo mais aussi des récepteurs à la Nétrine, UNC40 et UNC5 (Yu et coll., 2002 ; Colavita and Culotti, 1998 ; Gitai et coll., 2003). Chez la souris, dans des cultures de neurones d'hippocampe, l'homologue Mena est phosphorylé en réponse à une stimulation par la nétrine1. L'inhibition ou l'activation de Mena perturbe la dynamique de l'actine et plus particulièrement la formation de filopodes induite par la Nétrine1 via DCC (Lebrand et coll., 2004). De manière intéressante, l'absence de *mena* chez la souris se traduit par des défauts de formation du corps calleux et des commissures hippocampique et pontocérébelleuse (Lanier et coll., 1999). Il est donc essentiel de préciser son rôle dans la régulation de la réponse neuronale aux signaux contrôlant le croisement de la ligne médiane.

4.5.3 Interaction avec la Laminine et les Cadhérines

La présence de Laminine1 dans le milieu extracellulaire peut inverser l'activité de Slit2-N stimulant la formation de branches collatérales d'axones des ganglions rachidiens. L'action de la Laminine1 semble passer par une modulation du taux intracellulaire en nucléotides cycliques puisqu'un même effet est obtenu en abaissant le taux de GMPc (Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2001). De même, la laminine1 peut convertir l'attraction exercée par la Nétrine1 sur les axones rétiniens en répulsion, cette fois en réduisant le taux d'AMPc. Les

récepteurs à la Laminine de la famille des Intégrines sont impliqués dans la modulation de l'activité de guidage de Slit chez la drosophile (Stevens and Jacobs, 2002). Plusieurs isoformes de la Laminine sont exprimées dans les cellules de la plaque du plancher (Lentz et coll., 1997). Elles pourraient donc contribuer à inverser la réponse à la Nétrine1 d'axones ou neurones venant à son contact.

Par ailleurs, dans des cultures de cellules de mammifères, le système Slit/Robo peut inactiver les propriétés de la N-Cadhérine, une molécule d'adhérence à liaison homophilique (Rhee et coll., 2002). La formation d'un complexe Robo/Abl en réponse à Slit entraîne le recrutement de Cables. Robo peut alors interagir directement à la N-Cadhérine par son domaine CC3. En conséquence, Abl va phosphoryler la β -caténine et abaisser son affinité pour la N-Cadhérine dont elle se détache. La β -caténine phosphorylée peut alors être adressée au noyau où elle se fixe au facteur de transcription Tcf/Lef et active son activité transcriptionnelle. La formation du complexe N-Cadhérine/Robo entraînerait également le découplage de la N-Cadhérine avec le cytosquelette et pourrait ainsi causer une perte rapide de l'adhérence cellulaire (Rhee et coll., 2007). Dernièrement il est apparu que les cadhérines jouent un rôle déterminant durant le développement des NPC. La transfection des neurones du NRL/NCE par une forme dominante négative de la N-Cadhérine ou de la Cadhérine11 réduit leur vitesse de migration en affectant potentiellement leurs propriétés d'adhérence (Tanigushi, 2006). Par ailleurs, les Cadhérine6, Cadhérine8 et Cadhérine11 sont exprimées par des compartiments olivaires distincts (Suzuki et coll., 1997). Durant la lamellation olivaire, la protéine Rho-GEF Trio intervient dans la coordination des mouvements des neurones olivaires. Son action est nécessaire à l'activation de Rac1 en aval de la cadhérine11 (Backer et coll., 2007 ; Charrasse et coll., 2007). Les défauts observés affectent principalement la formation de la DAO comme chez les souris déficientes en Slit1/Slit2 ou Robo1/Robo2. Il est donc possible que l'action de Slit/Robo dans ces neurones puisse contribuer à modifier les propriétés d'adhérence liées à la cadhérine11. Cette influence peut être réciproque puisque l'homologue de Trio chez le nématode, Unc73, apparaît capable d'interagir avec Sax3 et de favoriser l'action de ce récepteur (Watari-Goshima et coll., 2007).

5 Conclusion

Nos travaux contribuent donc à confirmer *in vivo* que la fonction du système Slit/Robo est bien essentielle au développement des systèmes neuronaux commissuraux des vertébrés. Cette fonction a donc bien été conservée au cours de l'évolution. Slits et Robos sont également nécessaires à la morphogenèse d'autres tissus ou organes tels que le rein (Liu et coll., 2003 ; Grieshammer et coll., 2004 ; Lu et coll., 2007), le foie (Liu et coll., 2003), le cœur (Liu et coll.,

2003), les poumons (Xian et coll., 2001 ; Anselmo et coll., 2003), la glande mammaire (Strickland et coll., 2006), le tractus urinaire (Lu et coll., 2007), les muscles (Vargesson et coll., 2001), les vaisseaux sanguins (Wang et coll., 2003 ; Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005) ou encore les organes hématopoïétiques (Wu et coll., 2001a). Ils sont impliqués dans de nombreux processus pathologiques. Leur perturbation est mise en cause dans l'apparition de certaines malformations congénitales de ces organes (Liu, 2003, Lu, 2007). Leur expression est également activement régulée dans de nombreux types de cellules cancéreuses chez l'homme (pour revue Chedotal et coll., 2005). Ils interviennent à différentes étapes de la croissance ou de la vascularisation des tumeurs, ainsi que, comme nous l'avons vu, dans la migration des cellules métastatiques. Enfin la SrGAP3 est impliquée dans un retard mental idiopathique lié à des anomalies du chromosome X (Endris et coll., 2002).

Il est notable que Slits et Robos, comme d'autres systèmes de guidages, restent exprimés dans de nombreuses structures neuronales du cerveau jusqu'à l'âge adulte (Marillat et coll., 2004 ; Encinas et coll., 1999 ; Manitt et coll., 2001). Leur fonction reste alors peu explorée. Ces molécules pourraient diriger la migration de neurones générés dans certaines zones germinatives persistantes. Les Slits fortement exprimés dans l'hippocampe sont susceptibles d'intervenir dans la mise en place de neurones nouvellement produits dans le gyrus denté. Par ailleurs, ils contrôlent comme nous l'avons vu la migration des interneurones du bulbe olfactif (Nguyen-Ba-Charvet et coll., 2004). Environ 1% de ces neurones sont remplacés chaque jour, ils sont donc continuellement produits dans la zone sous-ventriculaire, migrent et s'incorporent aux circuits neuronaux du bulbe olfactif (Lois and Alvarez-Buylla, 1994 ; Luskin, 1993 ; Gheusi et coll., 2000). Les Slits pourraient aussi intervenir dans la modulation de la transmission ou de la plasticité synaptique, tout comme les Sémaphorines (Sahay et coll., 2005). On peut supposer que de telles molécules répulsives stabilisent le réseau fondamental des connexions neuronales en gardant sa complexité intacte. Enfin la fonction du système Slit/Robo durant la régénération axonale après lésion reste indéterminée. L'incapacité de régénération chez l'adulte est due à l'action de facteurs inhibiteurs de la croissance axonale exprimés au niveau de la cicatrice gliale et dans myéline (Filbin, 2003). Après lésion du cervelet, du nerf sciatique ou de la moelle épinière, l'expression d'un ou plusieurs gènes Slits est toujours activée au site de lésion. Le messager de Robo2 est également produit par les ganglions rachidiens dont les projections ont été sectionnées. Ce récepteur pourrait contribuer à inhiber leur régénération (Bloechlinger et coll., 2004 ; Wehrle et coll., 2005). Cependant, rien ne prouve que les Slits interviennent alors dans la prévention de la régénération axonale.

La fonction des gènes *slits* et *robos* à des stades post-natals ne peut être déterminée grâce à l'étude des souris déficientes en Slit2, Robo2 et Robo3, qui ne sont pas viables. Notre laboratoire développe actuellement des lignées de souris « knock out » conditionnelles pour les

gènes *slit2* et *robo3*. Leur inactivation peut être ciblée au système nerveux ou bien à certaines populations neuronales sans causer la mort de ces souris. Cette technique a été dernièrement utilisée à l'étude de l'importance du gène *robo2* durant le développement postnatal du système olfactif (Cho et coll., 2007). Ces nouvelles lignées constitueront un excellent outil dédié à l'étude de la fonction tardive de ces gènes. Par exemple, nous pensons pouvoir obtenir des souris viables dont le cerveau sera totalement dépourvu en Slits et pouvoir en analyser les conséquences. Les anomalies de projection et migration commissurales que nous avons caractérisées durant ma thèse devraient apparaître et persister chez ces souris « knock out » conditionnelles (commissures manquantes ou anormalement formées). Elles pourront donc être utilisées à la caractérisation de l'importance fonctionnelle des commissures qui reste comme nous l'avons vu en introduction peu connue.

ANNEXES

Article 5 : Le système Slit/Robo guide les axones du nerf olfactif

Revue : Le code de la route des axones se complique

Robos and Slits control the pathfinding and targeting of mouse olfactory sensory axons

Kim T. Nguyen-Ba-Charvet^{1, 2}, Thomas Di Meglio^{1, 2}, Coralie Fouquet^{1, 2} and Alain Chédotal^{1, 2, #}.

¹CNRS, UMR 7102, Paris, 75005 France

² Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7102, Paris, 75005 France

Contact:

Alain Chédotal. CNRS UMR7102, Université Pierre et Marie Curie, Equipe Développement Neuronal, case 12, 9 quai Saint-Bernard 75005 Paris France.

Tel: (33) 144273447; Fax: (33) 144272669.

mail: alain.chedotal@snv.jussieu.fr

Running title: Slit and Robo guide olfactory sensory projections

Summary

Odorants are detected by olfactory receptor neurons (ORN) located in the olfactory epithelium. In mice, ORN expressing the same odorant receptor project to 2 specific glomeruli out of 1800, on the medial and lateral part of the olfactory bulb (OB) respectively [1]. It has been proposed that OR-derived cAMP signals guide ORN axons to their glomeruli rather than OR themselves [2, 3]. Recently, it has also been shown that the axon guidance molecules Slit1 and its receptor Robo2 control the dorso-ventral segregation of ORN axons as they are projecting to the OB. We have analyzed the development of olfactory projections in *Slit1/Slit2* and *Robo1/Robo2* single and double mutants. Our results show that in *Robo2* and *Robo1/Robo2* mutant mice, ORN axons fail to reach their target in the olfactory bulb and that most of them project caudally into the diencephalon. Moreover, in mice deficient for *Slit1* and *Slit2*, ORN axons expressing the same odorant receptor project to multiple glomeruli. Thus, Slit1, Slit2, Robo1 and Robo2 cooperate to control the coalescence of ORN axons to the OB, and the precise targeting of ORN axons to specific glomeruli.

Results and Discussion

Developing olfactory sensory neurons express Robo2, Slit1 and Slit2

To determine whether the axons of olfactory sensory receptor neurons (ORN) express Robo receptors, we used immunohistochemistry and previously characterized mouse knockout lines that express β -galactosidase under the *Robo1* [4, 5] or *Robo2* [5, 6] promoters. At E13, ORN axons were strongly immunoreactive for Robo2 but not Robo1, consistent with our previous *in situ* hybridization data [7] (Figure 1A and not shown). Accordingly, β -galactosidase was expressed by ORN axons of *Robo2*^{+/-} mice but not

Robo1^{+/-} mice (Figures 1B and 3H). However, some β -galactosidase-positive ORNs did not express OMP and *vice versa* (Figure 3K).

To confirm that Robo2 was the only Slit receptor expressed by ORN axons we performed binding studies using a recombinant protein comprising the second of the four Leucine rich repeat (LRR2) of Slit2 fused to alkaline-phosphatase (LRR2-hSlit2-AP) [5]. LRR2-hSlit2-AP proteins strongly bound to E13 ORN axons from wild type (Figure 1C) and *Robo1*^{-/-} mutant mice (Figure 1D) but no staining was observed in *Robo2*^{-/-} (Figure 1E) and *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} mutant mice (Figure 1F). Overall, these results show that developing ORN axons only express Robo2 receptors. This expression pattern was unchanged at least until E18 (Figure 3I and not shown).

We and others previously showed that ORN from rat and mouse embryos also express *Slit* mRNAs [7, 8]. In absence of any reliable anti-Slit antibodies, we studied the expression pattern of the green fluorescent protein (GFP) in Slit1 and Slit2 knockout mouse lines [9]. Robust GFP immunostaining was observed in the ventral forebrain, in particular the septum region (Figures 1G-1I), of both *Slit1*^{+/-} and *Slit2*^{+/-} E13 embryos. Interestingly, GFP was also highly expressed in ORN cell bodies and their axons (Figures 1G-1I). In the olfactory bulb region of *Slit1* and *Slit2* heterozygous mice, GFP labeling was observed in the olfactory nerve layer (Figures 3A and 3D) and also in the mitral cell layer for *Slit2*^{+/-} mice (Figure 3D). These results suggest that developing ORN axons express Slit1 and Slit2 and also that they grow under the telencephalon around a region that expresses high level of Slit1 and Slit2.

By contrast, ORNs were not immunoreactive for Robo1 (Figure 3G) in wild-type mice, or β -galactosidase in *Robo1*^{+/-} mice (Figure 3H). However, Robo1 expression was detected in p75-immunopositive cells surrounding ORN axons (Figure 3N), suggesting that

olfactory ensheathing cells (OECs) express Robo1 [10]. Robo1-expressing cells are wrapping Slit-GFP-positive ORN axons (Figure 3O) as well as Robo2- β galactosidase-positive axons (Figure 3P) just before entering the OB. In conclusion, ORNs express Slit1, Slit2 and Robo2 while Robo1 is present in OECs.

Olfactory sensory axons are defasciculated and project ectopically in Robo2 and Slit1/Slit2 mutant mice.

To determine if Slit/Robo signaling plays a role in ORN axon guidance from the olfactory epithelium to the OB, we examined the trajectories of ORN axons in *Robo1* and *Robo2* single and double mutants and in *Slit1/Slit2* double mutant mice. As described before, *Robo2*, *Robo1/Robo2*, *Slit2* and *Slit1;Slit2* homozygous mutants die a few hours after birth [6, 11, 12] and thus ORN axons could not be studied in these knockouts at postnatal ages. Developing ORN axons strongly express the olfactory marker protein (OMP)[13]. In E16 and E18 wild type (n = 3), all *Slit* (*Slit1* n = 4; *Slit2* n = 1; *Slit1/2* n = 6) or *Robo* (*Robo1* n = 2; *Robo2* n = 2; *Robo1/2* n = 1) single and double heterozygous mice and in *Slit1*^{-/-} homozygous mutants (n = 5), OMP-positive ORN axons project from the olfactory epithelium to the base of the telencephalon before turning rostrally toward the OB (Figure 2A and not shown). In addition, ORN axons remain fasciculated until they reach the OB. Likewise, in *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} double mutants (n = 3), a majority of OMP-positive ORN axons were still fasciculated until they reached the OB and a glomerular layer formed (Figure 2D). By contrast, in *Robo2*^{-/-} mice (n = 5), fewer axons reached the ONL and those who reached it were bundled in small fascicles and seemed unable to fully cover the OB (Figure S1A). In addition, some ectopic ORN axon bundles were also detected outside the OB in more lateral territories (Figure S1B) and the glomerular layer

appeared discontinuous/fragmented in the ventro-medial part of the OB. ORN axon pathfinding defects were much more severe in *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* double mutants (E13 n = 3; E16 n = 2; E18 n = 5). At E13, an abnormal accumulation of ORN axons under the ventral telencephalon was observed (data not shown). From E16-E18, OMP staining showed that only a minority of OR axons was able to enter the OB medially but that most of them gathered under the ventral telencephalon before taking abnormal routes (Figures 2B and 2F). As in *Robo2^{-/-}* mice, the olfactory nerve was fragmented in multiple axon bundles (Figure 2E). Some of these ORN axon bundles turned caudally and grew under the surface of the telencephalon (Figure 2B) but a majority entered the brain ventrally to invade and massively arborize in the medial septum (Figures 2B and 2F). On coronal sections of *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* double mutants, ORN axons appeared very defasciculated and spread ventro-laterally into the head mesenchyme (Figure 2F). These results show that in absence of Robo/Slit signaling, ORN axons are unable to project to the OB.

One key feature of ORN projection is the glomerular map. Each sensory neuron of the epithelium expressing a given candidate olfactory receptor projects to the same microdomain of the olfactory bulb, forming a spherical structure called a glomerulus, where it synapses on the dendrites of mitral and tufted cells. The spatial position of each glomerulus is highly conserved between animals although their final morphology varies [14]. In the embryonic mouse, the final/mature glomerular pattern emerges around the first postnatal days [15]. In mouse, little is known about the molecules that are controlling glomerulus targeting [16-18]. Although *Slit1/Slit2* and *Robo1/Robo2* double mutants die soon after birth, we tried to determine if Robo/Slit signaling may control the targeting of ORN axons in the OB. Using immunolabeling for different ORN markers

(OMP, NQO1, GAP-43, NP1) the typical glomerular structures were already recognizable in the OB of E18 wild type embryos (Figure 2D and not shown). In *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{-/-} OMP axons also covered the whole OB surface but the glomerular layer was fragmented ventrally (Figure 2D). In *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-} double mutants (Figure 2E) only a subset of OMP axons reached the OB and ended medially and laterally in a layer where glomeruli were not well-defined. OMP axons were almost completely absent from the dorsal OB. Next, we used a recently developed antibody that recognizes a single olfactory receptor called OR256 [19]. (Unfortunately, none of the other receptor specific antibodies we used could label embryonic OR axons). In adult wild type mouse, OR256 positive ORN axons project to a dorsolateral glomerulus and a medioventral one, per olfactory bulb [19]. At E18, we observed the same OR256 pattern in wild type animals with one lateral and one medial glomerulus per OB (Figures 4A-4D and Table 1).

***Slit* and *Robo* mutants present OR256 ectopic glomeruli**

Double immunostaining performed in *Slit1*, *Slit2* and *Robo2* knockouts showed that OR256 sensory neurons were immunoreactive for GFP and β -galactosidase respectively (Figures 3L, 3M), suggesting that they express *Robo2*, *Slit1* and *Slit2*. Next OB from *Slit1/Slit2* and *Robo1/Robo2* single and double mutants were immunostained for OMP and OR256 and the number and position of the labeled glomeruli analyzed (Figures 4E, 4F, 4I, 4J and Table 1). The OR256 glomerular pattern was similar in wild type (n = 8 OB) and in *Slit1* (n = 6), *Slit2* (n = 6), *Robo1* (n = 6) and *Robo2* (n = 6) single mutants (Figure 4, Table 1). By contrast, OR256 glomerular pattern was perturbed in *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{+/-} mice (4 cases out of 4) as two lateral glomeruli instead of one were observed. In *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{-/-} double mutant, 3 lateral glomeruli were observed (6 cases out

of 8) and 2 median glomeruli (5 cases out of 8; Table 1). The distance between these glomeruli varies from 70µm to 500µm and they appeared a little smaller than the wild type ones. Confocal microscopy analysis of OMP/OR256 double labeling showed that even in mutant animals, all axons in the OR256 glomeruli only contains OR256-positive axons (Figure S3) suggesting that a duplication/multiplication of OR256 glomeruli has occurred rather than an ectopic invasion by OR256 ORN axons of OR256-negative neighboring glomeruli. The phenotype was similar in *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* double mutants, but the number of ectopic glomeruli was more wavering, varying from 3 lateral and 2 medial glomeruli (2 cases out of 6) to 2 lateral and 1 medial glomeruli (4 out of 6 cases). The higher phenotypic variability of the *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* mice, could be due to the extra-bulbar projection of many OR256 axons into more caudal structures (Figure 4K). Alternatively, we may have missed some ectopic OR256 glomeruli as they are much smaller than wild-type ones.

In mammals, the olfactory projection is uncrossed: OR axons from one side of the epithelium target the OB located on the same side. As Slit/Robo signaling is known to play a major role in controlling the development of commissural projections in many systems [20, 21], the ectopic glomeruli could contain OR axons coming from the contralateral epithelium. To rule out this possibility a small injection of Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) was performed in one OB. In both wild type (n = 4) and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (n = 2) mutants, retrogradely Dil-labelled OR neurons were only observed on the ipsilateral side (Figure S2). This suggests that olfactory projections remains ipsilateral in absence of Slit/Robo signaling. It is known that even though the glomerular pattern is set just after birth, postnatal refinements still occur until P60 and that initially the projection is more exuberant [22].

Although, *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}*, *Robo2^{-/-}* and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* mutants die at birth, *Slit1^{-/-}* and *Slit1^{-/-};Slit2^{+/-}* mice are viable. To determine if additional glomeruli were still observed after the refinement period, older mutant mice were studied (P60 to P90). As at E18, two OR256 lateral glomeruli were found in the OB of *Slit1^{-/-};Slit2^{+/-}* mice (3 cases out of 3; Figures 4O,4P), instead of one in *Slit1^{-/-}* (n = 2; Figure 4N) and wild type (n = 3) mice. Nevertheless, we did not detect any ectopic medial glomerulus in any case. This suggests that glomerular multiplication is maintained throughout life in *Slit* and *Robo* mutants mice.

In this paper, we show that *Slit1*, *Slit2* and *Robo2* are expressed by ORNs and *Robo1* by OECs. Furthermore, we demonstrate that *Robo2* is necessary for axons to converge to the OB, whereas *Slit1*, *Slit2* and *Robo2* are required by ORN axons to project to a single glomerulus. A role for *Slits* and *Robos* in the development of sensory olfactory neurons was first demonstrated in *Drosophila* [23], where the projection pattern of ORN axons in the glomeruli is controlled by a combinatorial expression of the three *Robo* receptors. Moreover, *Slit/Robo* signaling also controls the arborization of ORNs within the antennal lobe. Our results show that in mouse as in *Drosophila*, *Robo* receptors guide ORN axons to their target area and that in their absence ORN axons fail to reach the OB. Likewise, *Slits* are necessary for correct glomeruli targeting. Although we could not find a combinatorial code of *Robos* differentiating subtypes of ORN axons, our data and others show that *Robo2* is not expressed by all ORNs [24]. Therefore one could easily imagine that *Robo2*-positive ORN axons expressed additional combination of axon guidance receptors. Our results are also consistent with the role of *Robo2* in the establishment of the glomerular map in zebrafish [25]. More recently, another analysis of olfactory projection in *Slit1* and *Robo2* mutant mice showed that they are required for

the zonal segregation of ORN axons, and *Robo2*^{-/-} OB lack ventral innervation [24]. In our study, we find that these missing axons project more dorsally in the telencephalon. Moreover, our analysis of *Robo1/Robo2* double mutants reveals an even more important role for these molecules as in their absence a majority of ORN axons are unable to reach the OB, and when they succeed, they do not project to a single glomerulus. We show here that OR axon guidance defects are more pronounced in *Robo1/Robo2* double mutants than in *Robo2* single mutants. This result supports a non-cell autonomous function for Robo1 in axon guidance, as previously proposed in *Drosophila* [26]. *In vitro* studies have shown that OECs provide a good substrate for ORN axons [27, 28]. Therefore, Robo1 expression on OECs may influence OR axon guidance, by binding to Robo2, or by binding Slits also expressed by OR axons.

Our data also reveals that ORN axons express Slit1 and Slit2 in addition to Robo, and that a simple repulsive model can't probably fully explain their mode of action. We also confirm that Slits and their receptors are essential for the development of the entire olfactory system throughout life. In addition to guiding ORN axons to their appropriate target in the OB, Slit/Robo also control the development of the lateral olfactory tract [5, 9, 29] and the migration of olfactory bulb interneurons [30-33]. Therefore, Slit/Robo signaling appears to act at every levels in the olfactory system. The reduced size of the OB in *Robo1/Robo2* and *Slit1/Slit2* double mutants was explained by a decrease in OB interneurons migration from the subventricular zone [31, 34], but our data suggest that the mistargeting of ORN axons may also be involved, as OB development is known to require olfactory axons [35].

The development of ORN projections is a two steps process. First, ORN axons coalesce to their target region in the OB, probably using axon guidance molecules whose

expression level involves OR-cAMP signaling [2, 3]. Second, they determine their specific position into the appropriate glomerulus in an activity-dependent manner with the help of adhesion and guidance molecules interacting with OR [18]. We show here that Robo1 and Robo2 are also required for ORN axons to coalesce to the OB.

The correct pathfinding of ORN axons requires OR-cAMP signaling [2, 3]. Likewise the activity of axon guidance cues such as Slits, is known to be regulated by cyclic nucleotides [36-39]. Therefore, it is tempting to speculate that variations of cAMP levels induced by OR, would change the cAMP/cGMP ratio, thereby modulating Slit/Robo activity in ORN axons.

An alternative possibility is that Robo could interact with N-Cadherin to guide axons to their glomeruli. N-Cadherin is required for glomerular development in *Drosophila* [40] and mice [41]. Interestingly, Robo interacts with N-cadherin and inhibits its activity [42]. Based on this paper, a very interesting model for guidance of longitudinal axons has been proposed [43], that could also apply to ORN axons. Slit, Robo and N-Cadherin could act in concert. N-cadherin is a permissive adhesion molecule expressed by ORN axons also within the glomerulus longitudinal axon fascicles. Slits are expressed differentially in the OB [24] or on ORN axons. As a growth cone expressing a high level of Robo arrives on a N-Cadherin⁺ glomerulus, it encounters a high level of Slit, which activates Robo but therefore inhibits N-Cadherin. This growth cone then moves on further to a glomerulus situated in region of the OB exhibiting low level of Slits where its Robo signaling is low enough not to inhibit N-Cadherin and therefore enter the glomerulus.

Is Robo function in the coalescence of axons to the OB distinct from its role glomerular targeting? We observed many misrouted ORN axons in *Robo1/2*-deficient mice but not

in *Slit1/2*-deficient mice, raising the possibilities that Slits are not needed for the coalescence of axons. However Slits are obviously required for specific positioning in the OB. In *Drosophila*, a combination of Robo controls OR axon sorting to the antennal lobe, and later, Slit influence the positioning of OR axon terminals in the glomeruli [23]. A similar successive process could occur in mice. Slit/Robo signaling also regulate the branching of sensory axons in the mouse spinal cord [11, 44] and inhibits arborization and synaptogenesis in the zebrafish retina [45]. Therefore, the presence of additional glomeruli in Slit/Robo mutants could also be due to aberrant branching of OR axons in the OB.

To our knowledge this is the best evidence supporting a preponderant role for axon guidance molecules in the establishment of the olfactory sensory map. Our data also confirms that Slit/Robo signaling does not only control midline crossing, but also target recognition.

Experimental Procedures

Swiss mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were used for the collapse assay. *Slit*-deficient mice and Robo2-deficient mice were generated and genotyped by PCR as previously described [6, 12]. The day of the vaginal plug was counted as embryonic day 0 (E0), and the day of the birth as postnatal day 0 (P0). Mice were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg). All animal procedures were carried out in accordance to institutional guidelines.

Immunocytochemistry

Embryos until E16 were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer, pH 7.4 (PFA). Older Mice were perfused transcardiacally with 4% PFA, post-fixed for 3 hr and then cryoprotected in 10% sucrose. Cryostat sections were blocked in 0.2% gelatin in PBS/0.25% Triton-X100, and incubated overnight at room temperature (RT) with anti-GFP (Molecular Probes, Eugene, OR), NP1 (R&D), anti- β gal (CAPPEL), anti-NQO1 (ABCAM), anti-OR256, L1 (Chemicon), OMP (a gift from Dr F. Margolis), anti- Robo1 and anti-Robo2 (a gift from Dr F. Murakami; [46]), Goat anti-Robo1 and Goat anti-Robo2 (R&D) followed by species-specific secondary antibodies directly conjugated to fluorophores (cy3 conjugated from Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, Alexa Fluor 488 from Molecular Probes). Sections were examined under a fluorescent microscope (DMR, Leica, Nussloch, Germany) or using a confocal microscope (TCS; Leica).

Dil Tracing

The olfactory bulb in E18 was labeled with the lipophilic tracer Dil (Molecular Probes) by placing a crystal of Dil in the OB as described previously [47]. Injected heads were cut in 80 μ m sections with a vibratome (Leica). The sections were then counterstained in a solution of 10 μ g/ml Hoescht 33258 (Sigma) in PBS for 10 min and rinsed three times in PBS.

Acknowledgements

This work was supported by an “Equipe FRM” grant from the Fondation pour la Recherche Médicale and by the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

We thank Dr. M. Tessier-Lavigne for providing *Slit* and *Robo* deficient mice, Dr. H. Breer for anti-OR256 antibody, Dr F. Margolis for the anti-OMP, V. Cannaya for excellent technical assistance and R. Schwartzman for confocal imaging. We are grateful to Dr JF Cloutier for helpful comments on the manuscript.

References

1. Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* **87**, 675-686.
2. Imai, T., Suzuki, M., and Sakano, H. (2006). Odorant receptor-derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science* **314**, 657-661.
3. Chesler, A.T., Zou, D.J., Le Pichon, C.E., Peterlin, Z.A., Matthews, G.A., Pei, X., Miller, M.C., and Firestein, S. (2007). A G protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1039-1044.
4. Long, H., Sabatier, C., Le, M., Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D.M., Tamada, A., Murakami, F., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (2004). Conserved roles for slit and robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* **42**, 213-223.
5. Fouquet, C., Di Meglio, T., Ma, L., Kawasaki, T., Long, H., Hirata, T., Tessier-Lavigne, M., Chedotal, A., and Nguyen-Ba-Charvet, K.T. (2007). Robo1 and robo2 control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* **27**, 3037-3045.
6. Grieshammer, U., Ma, L., Plump, A.S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., and

- Martin, G.R. (2004). SLIT2-Mediated ROBO2 Signaling Restricts Kidney Induction to a Single Site. *Dev Cell* 6, 709-717.
7. Marillat, V., Cases, O., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., and Chédotal, A. (2002). Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 442, 130-155.
 8. Yuan, W., Zhou, L., Chen, J.-h., Wu, J.Y., Rao, Y., and Ornitz, D.M. (1999). The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev. Biol.* 212, 290-306.
 9. Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Plump, A.S., Tessier-Lavigne, M., and Chédotal, A. (2002). Slit1 and Slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* 22, 5473-5480.
 10. Ramon-Cueto, A., and Nieto-Sampedro, M. (1992). Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* 47, 213-220.
 11. Ma, L., and Tessier-Lavigne, M. (2007). Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *J Neurosci* 27, 6843-6851.
 12. Plump, A.S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C.J., Goodman, C.S., Mason, C., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33, 219-232.
 13. Farbman, A.I., and Margolis, F.L. (1980). Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol* 74, 205-215.
 14. Komiyama, T., and Luo, L. (2006). Development of wiring specificity in the

- olfactory system. *Curr Opin Neurobiol* 16, 67-73.
15. Royal, S.J., and Key, B. (1999). Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice. *J Neurosci* 19, 9856-9864.
 16. Schwarting, G.A., Raitcheva, D., Crandall, J.E., Burkhardt, C., and Puschel, A.W. (2004). Semaphorin 3A-mediated axon guidance regulates convergence and targeting of P2 odorant receptor axons. *Eur J Neurosci* 19, 1800-1810.
 17. Cutforth, T., Moring, L., Mendelsohn, M., Nemes, A., Shah, N.M., Kim, M.M., Frisen, J., and Axel, R. (2003). Axonal ephrin-As and odorant receptors: coordinate determination of the olfactory sensory map. *Cell* 114, 311-322.
 18. Serizawa, S., Miyamichi, K., Takeuchi, H., Yamagishi, Y., Suzuki, M., and Sakano, H. (2006). A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. *Cell* 127, 1057-1069.
 19. Strotmann, J., Levai, O., Fleischer, J., Schwarzenbacher, K., and Breer, H. (2004). Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. *J Neurosci* 24, 7754-7761.
 20. Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.-H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96, 795-806.
 21. Shu, T., Sundaresan, V., McCarthy, M.M., and Richards, L.J. (2003). Slit2 Guides Both Precrossing and Postcrossing Callosal Axons at the Midline In Vivo. *J Neurosci* 23, 8176-8184.
 22. Zou, D.J., Feinstein, P., Rivers, A.L., Mathews, G.A., Kim, A., Greer, C.A., Mombaerts, P., and Firestein, S. (2004). Postnatal Refinement of Peripheral

- Olfactory Projections. *Science* 304, 1976-1979.
23. Jhaveri, D., Saharan, S., Sen, A., and Rodrigues, V. (2004). Positioning sensory terminals in the olfactory lobe of *Drosophila* by Robo signaling. *Development* 131, 1903-1912.
 24. Cho, J., Lépine, M., Andrews, W., Parnavelas, J., and Cloutier, J.-F. (2007). Requirement for Slit-1 and Robo-2 in zonal segregation of olfactory sensory neuron axons in the main olfactory bulb. *J Neurosci* 27, 9094-9104.
 25. Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S.Y., Hutson, L.D., Chien, C.B., Okamoto, H., and Yoshihara, Y. (2005). Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development* 132, 1283-1293.
 26. Kraut, R., and Zinn, K. (2004). Roundabout 2 Regulates Migration of Sensory Neurons by Signaling In trans. *Curr Biol* 14, 1319-1329.
 27. Kafitz, K.W., and Greer, C.A. (1999). Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia* 25, 99-110.
 28. Tisay, K.T., and Key, B. (1999). The extracellular matrix modulates olfactory neurite outgrowth on ensheathing cells. *J. Neurosci.* 19, 9890-9899.
 29. Nguyen Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Marillat, V., Kidd, T., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., and Chédotal, A. (1999). Slit2-mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22, 463-473.
 30. Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Picard-Riera, N., Tessier-Lavigne, M., Baron-Van Evercooren, A., Sotelo, C., and Chédotal, A. (2004). Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 24, 1497-1506.
 31. Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.M., Marin, O., Rubenstein, J.L.,

- Tessier-Lavigne, M., Okano, H., and Alvarez-Buylla, A. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311, 629-632.
32. Mason, H.A., Ito, S., and Corfas, G. (2001). Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J. Neurosci.* 21, 7654-7663.
 33. Wu, W., Wong, K., Chen, J.-h., Jiang, Z.-h., Dupuis, S., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400, 331-336.
 34. Bagri, A., Marin, O., Plump, A.S., Mak, J., Pleasure, S.J., Rubenstein, J.L.R., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33, 233-248.
 35. Monti-Graziadei, A.G., and Graziadei, P.P. (1992). Sensory reinnervation after partial removal of the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 316, 32-44.
 36. Song, H.J., and Poo, M.M. (1999). Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 355-363.
 37. Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Marillat, V., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., and Chédotal, A. (2001). Sensory axons response to substrate-bound Slit2 is modulated by laminin and cyclicGMP. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 1048-1058.
 38. Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J.R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M.M., and Hong, K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 423, 990-995.
 39. Niclou, S.P., Jia, L., and Raper, J.A. (2000). Slit2 is a repellent for retinal ganglion

- cell axons. *J. Neurosci.* *20*, 4962-4974.
40. Hummel, T., and Zipursky, S.L. (2004). Afferent induction of olfactory glomeruli requires N-cadherin. *Neuron* *42*, 77-88.
 41. Akins, M.R., Benson, D.L., and Greer, C.A. (2007). Cadherin expression in the developing mouse olfactory system. *J Comp Neurol* *501*, 483-497.
 42. Rhee, J., Buchan, T., Zukerberg, L., Lilien, J., and Balsamo, J. (2007). Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol* *9*, 883-892.
 43. Emerson, M.M., and Van Vactor, D. (2002). Robo is Abl to block N-Cadherin function. *Nat Cell Biol* *4*, E227-229.
 44. Wang, K.H., Brose, K., Arnott, D., Kidd, T., Goodman, C., Henzel, W., and Tessier-Lavigne, M. (1999). Biochemical purification of a mammalian Slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* *96*, 771-784.
 45. Campbell, D.S., Stringham, S.A., Timm, A., Xiao, T., Law, M.Y., Baier, H., Nonet, M.L., and Chien, C.B. (2007). Slit1a inhibits retinal ganglion cell arborization and synaptogenesis via Robo2-dependent and -independent pathways. *Neuron* *55*, 231-245.
 46. Sabatier, C., Plump, A.S., Le, M., Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., Lee, E.Y., and 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.
 47. de Castro, F., Hu, L., Drabkin, H., Sotelo, C., and Chédotal, A. (1999). Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different

secreted Semaphorins. *J. Neurosci.* 19, 4428-4436.

Figure legends

Figure 1: Slit1, Slit2 and Robo2 are expressed in ORN axons

A, coronal section of E13 wild type forehead double immunostained for Robo2 (green) and Robo1 (red). Only Robo2 is expressed in the olfactory nerve (arrowheads). B, Sagittal section of E13 *Robo2*^{+/-} head immunostained with anti-βgalactosidase (green) and anti-OMP (red) antibodies. ORN axons express both markers and project rostrally to the olfactory bulb (OB). C-F, LRR2-hSlit2-AP binding on coronal sections of E13 (C-F) forehead at the level of the olfactory nerve. LRR2-hSlit2-AP binds to olfactory nerves (arrowheads) of wild type (C) and *Robo1*^{-/-} (D) mice, but not of *Robo2*^{-/-} (E) and *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-} embryos. (G-I) Sagittal section of foreheads from E13 *Slit1*^{+/-} (G,H) or *Slit2*^{+/-} (I) mice. Slit1-GFP is highly expressed in the basal telencephalon (Te) and ORN axons labeled by OMP (H) avoid this region. ORN axons are also labeled by GFP (arrowheads in G). ORN axons express both OMP and GFP (arrowheads) and avoid the basal telencephalon where Slit2-GFP is highly expressed. Scale bars: 200 μm (A, C, D, E, F, H, I); 400 μm (B).

Figure 2: ORN axon pathfinding defects in *Slit* and *Robo* mutants

OMP immunolabelling of sagittal (A, B) and coronal (C-F) sections of E16 (A, B) and E18 (C, F) embryos. A, in *Robo1*^{+/-}; *Robo2*^{+/-}, OMP-positive OR axons project rostrally to cover the entire surface of the olfactory bulb (OB). B, in *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-}, only few OMP axons reach the OB, but most of them are coalesce under the forebrain before taking a caudal route or invading the septum (Se). C-F, At E18, wild-type ORN axons (C) cover the whole surface of the OB surface and start forming glomeruli (arrowhead). D, in *Slit1*^{-/-}

; *Slit2*^{-/-} embryos, OMP axons also project to the OB and form glomeruli, but the olfactory nerve is slightly defasciculated (arrowheads). E, F, in *Robo1*^{-/-}; *Robo2*^{-/-} embryos, OMP-positive axons are unable to cover the OB, do not form clear glomeruli and the olfactory nerve is fragmented in smaller fascicles that are spread laterally. In addition, many ORN axons project into the septum (arrowheads). Scale bars: 500 μm.

Figure 3: Slit and Robo expression in E18 Olfactory system

Coronal sections of *Slit1*^{+/-} (A-C, M, N), *Slit2*^{+/-} (D-F), wild-type (G, L), *Robo1*^{+/-} (H), and *Robo2*^{+/-} (I-K, O, P) E18 embryos. A, B, Slit1-GFP is expressed in the olfactory nerve layer (ONL) in the OB and OR neurons in the epithelium. C, Slit1-GFP-positive cells (green) in the olfactory epithelium also express OMP (red). D, E, Slit2-GFP is coexpressed with OMP in the ONL. F, in the olfactory epithelium, the cell bodies of OR neurons and their axons (arrowhead) co-express OMP and GFP. G, double immunostaining for Robo1 (red) and GAP43 (green). Robo1 is not detected in OR neurons. H, likewise, in *Robo1*^{+/-} mice, β-galactosidase is not detected in OMP-positive ORNs. I-K, in *Robo2*^{+/-} embryos, β-galactosidase (I, K) is strongly expressed with OMP (J, K) in OR neurons. Note that some OMP neurons do not co-express β-galactosidase (arrowheads), and *vice versa* (arrow). L, M, OR neurons expressing GFP in *Slit1*^{+/-} mice (L) or β-galactosidase in *Robo2*^{+/-} (M) embryos are also immunoreactive for OR256. N, along the olfactory nerve, p75 expressing cells are also immunoreactive for Robo1. O, in *Slit1*^{+/-} E16 embryo, GFP-positive OR axons are surrounded by Robo1-expressing cells. P, likewise, in *Robo2*^{+/-} E16 embryo, β-galactosidase-positive OR axons are surrounded by Robo1-expressing cells. Scale bars: 500 μm (A, D); 15 μm (C, F, G, H, J, L, N); 10 μm (M); 200 μm (O); 75 μm (P).

Figure 4: OR256 glomeruli duplication in *Slit/Robo* mutants

Co-labeling with anti-OR256, anti-OMP and DAPI on E18 (A-L) and adult (M-P) OB. A-D, in wild-type animals, OR256 axons project to a single lateral glomerulus (arrowhead), and coexpress OMP. E, two OR256 lateral glomeruli (arrowheads) are found on the same OB of a *Slit1*^{-/-} embryos. F, in a *Slit2*^{-/-} OB, the OR256 lateral glomerulus is shifted to a more ventral position. G, H, in the OB of a *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} 3 glomeruli (1-3) were detected (arrowheads) along the lateral surface. I, J, in *Robo1*^{-/-} (I) and *Robo2*^{-/-} mice, only one lateral glomerulus is observed at a normal position. In *Robo1*^{-/-};*Robo2*^{-/-} double mutants, most OMP-positive axons project caudally to the OB, as shown on a coronal section of the telencephalon (K). Note that some of these axons are also OR256⁺ (K, arrowheads). (L) However, some OR256-positive axons reach the OB and form a small lateral glomerulus (arrowhead). M-P, in adults, only one lateral glomerulus is observed in *Slit1*^{+/-} (M), and *Slit1*^{-/-}(N) animals but two lateral glomeruli (1-2 arrowheads) are detected in *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{+/-} OB. Glomerulus 1 is located at the dorso-lateral part of the OB, while glomerulus 2 is 120 µm behind and at the ventro-lateral part. Scale bars: 100 µm.(A, E, F, H, I, J, L); 150 µm (M, N, O).

Supplemental figures

Figure S1: ORN axon pathfinding defects in *Robo2*^{-/-} mice

OMP immunolabelling of coronal sections of E18 *Robo2*^{-/-} head. A, Many OMP axons project to the OB and form glomeruli (arrowhead), but the olfactory nerve is fragmented and the bundles spread all over the cribriform mesenchyme (arrows) and are unable to

cover the OB. B, In addition, many ORN axons project into the septum (arrowheads).
Scale bars: 500 μm .

Figure S2: ORN axons remain ipsilateral in absence of Slit/Robo signaling.

Coronal section of E18 *Robo1^{+/-};Robo2^{+/-}* (A) and *Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}* (B) heads where Dil was injected in the left olfactory bulb (OB). In both cases, ORN labelled retrogradely were only found in the olfactory epithelium (OE) ipsilateral to the injection. VNO: vomeronasal organ. Scale bars: 500 μm .

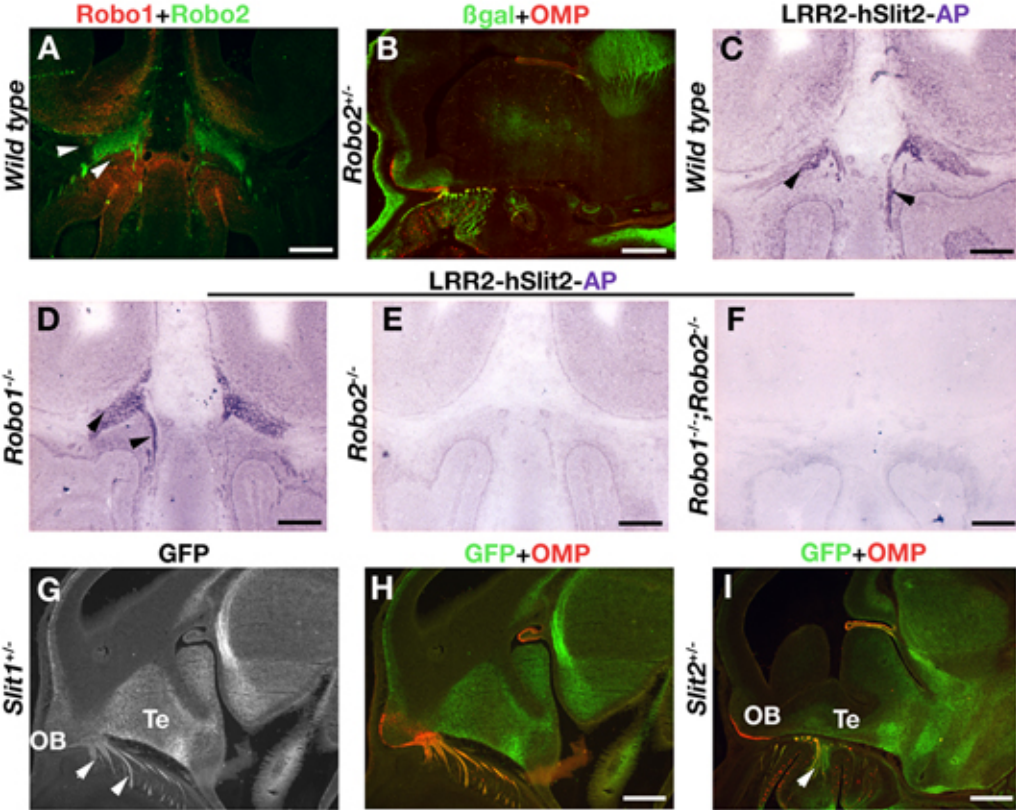
Figure S3: OR256 glomeruli only contains OR256-positive axons

Confocal image of a *Slit1^{-/-};Slit2^{-/-}* E18 lateral glomerulus immunostained with anti OR256 (A) and anti-OMP (B) showing that all the axons in the glomerulus are OR256 positive. Scale bar: 100 μm .

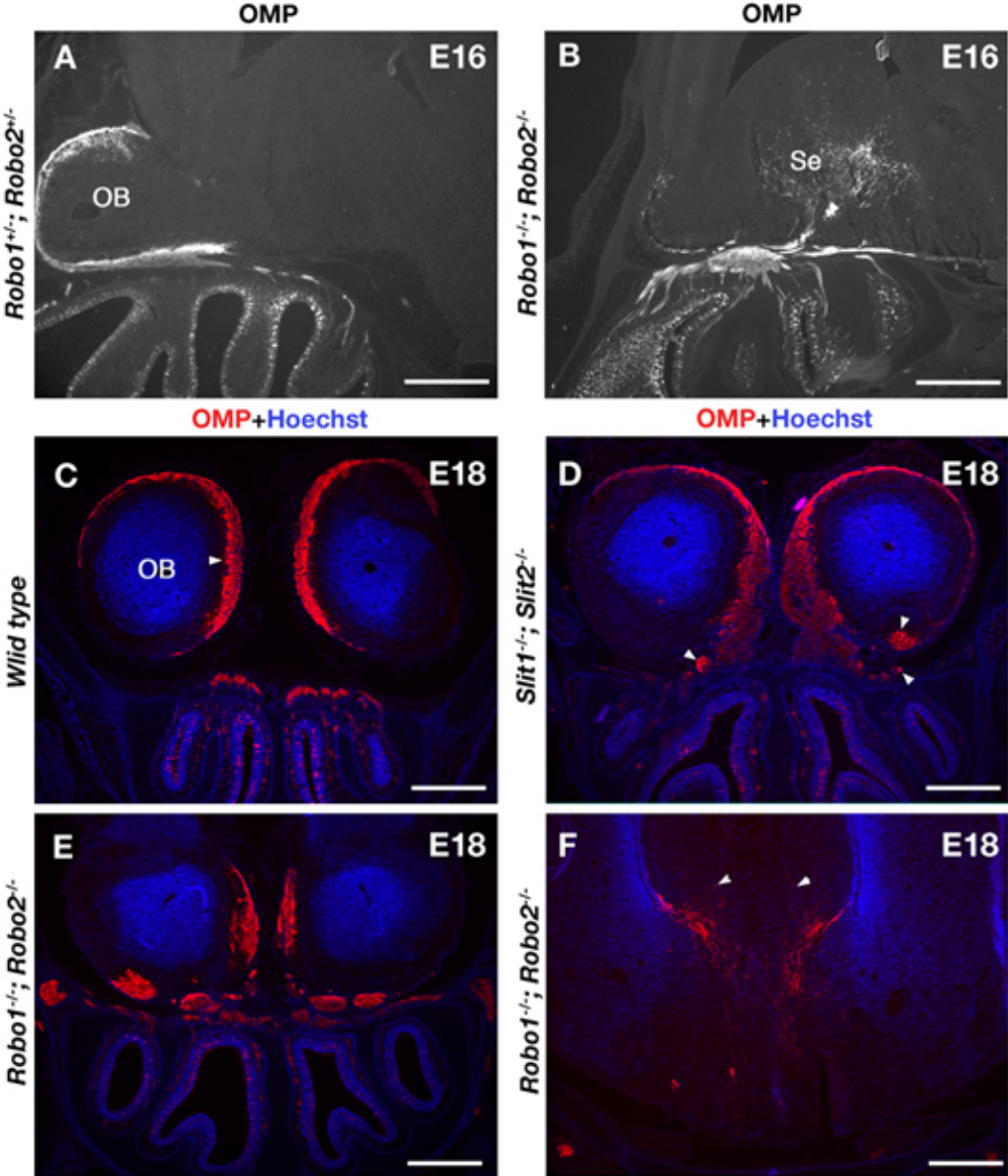
Table1. Mean number of OR256 glomeruli per olfactory bulb in E18 of *Slit* and *Robo* mutants

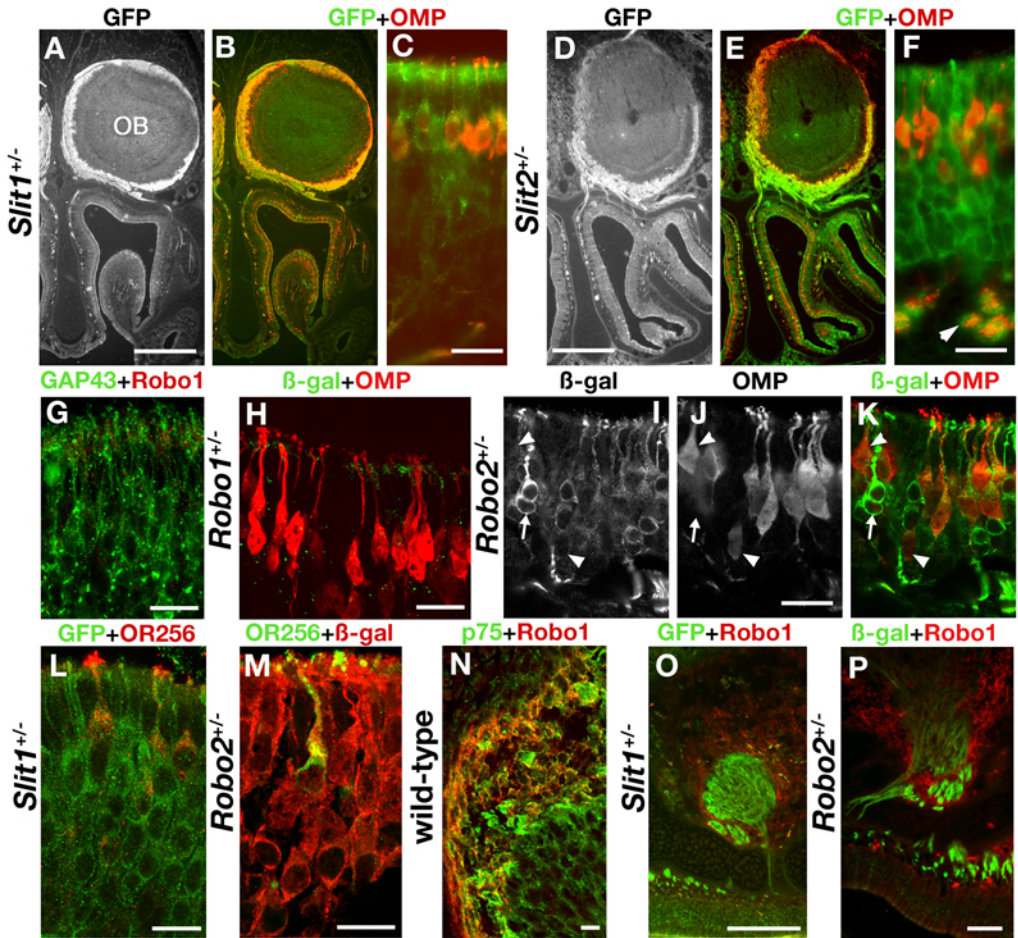
| Slit1;Slit2 (number of OB) | +/+ ;+/+ (8) | +/- ;+/+ (12) | -/- ;+/+ (10) | +/+ ;+/- (4) | +/+ ;-/- (6) | +/- ;-/- (2) | -/- ;+/- (4) | -/- ;-/- (8) |
|---|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Mean number of lateral OR256 glomeruli per OB | 1±0 | 1.1±0.2 | 1.2±0.2 | 1±0 | 1.3±0.2 | 1.5±0.5 | 2±0** | 2,8±0.3** |
| Mean number of medial OR256 glomeruli per OB | 1±0 | 1±0 | 1±0 | 1±0 | 1.3±0.4 | 1±1 | 1.3±0.3 | 1.6±0.2* |
| Robo1;Robo2 | +/+ ;+/+ (8) | +/- ;+/+ (2) | -/- ;+/+ (6) | +/+ ;+/- (6) | +/- ;+/- | +/- ;-/- | -/- ;+/- | -/- ;-/- (6) |
| Mean number of lateral OR256 glomeruli per OB | 1±0 | 1±0 | 1.2±0.2 | 1.2±0.2 | nd | nd | nd | 2.3±0.3* |
| Mean number of medial OR256 glomeruli per OB | 1±0 | 1±0 | 1±0 | 1.3±0.2 | nd | nd | nd | 1.2±0.2 |

nd : not determined ; Mann-Whitney test, *p<0.05 ; **p<0.01

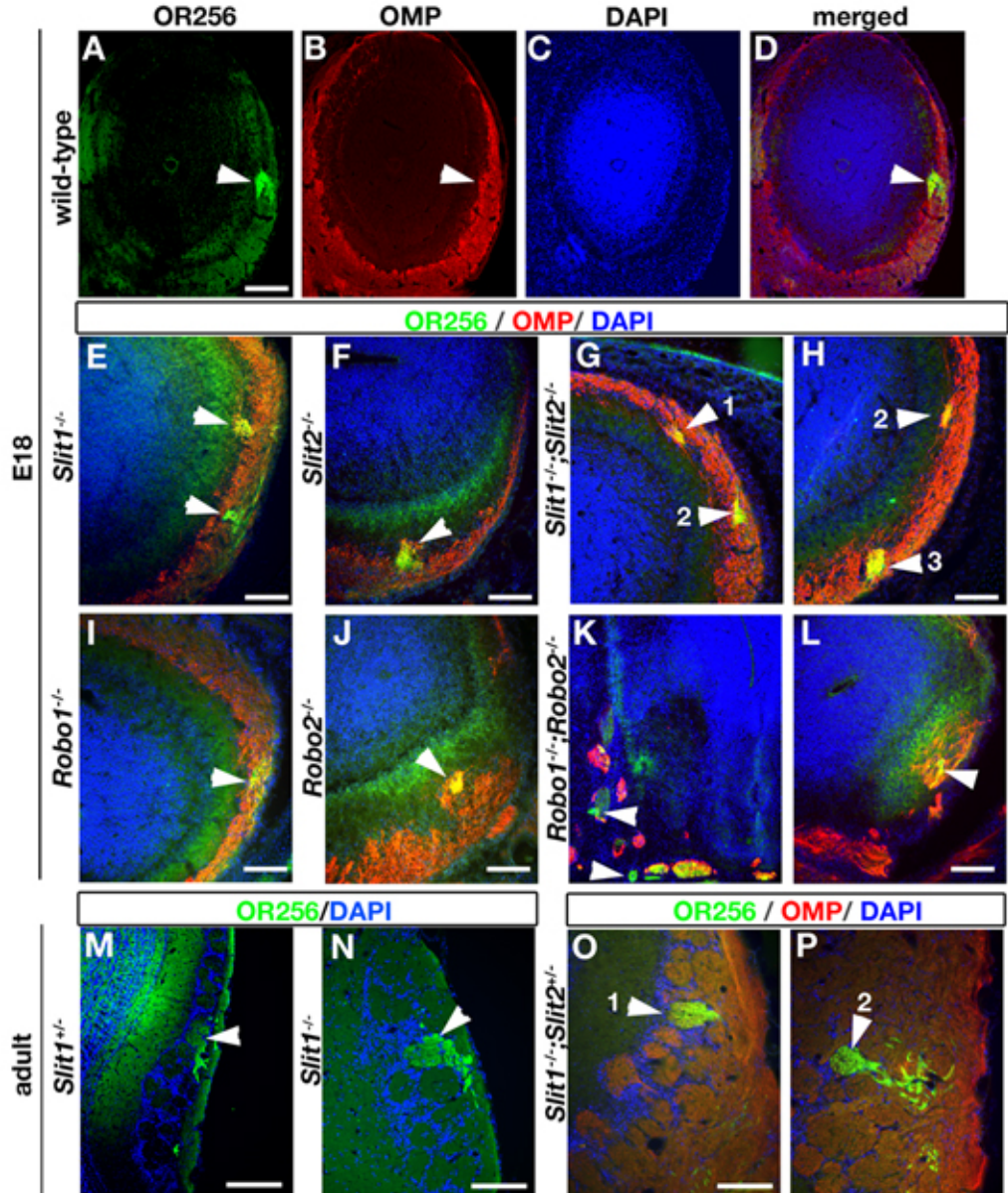


Nguyen-Ba-Charvet et al, Fig 1





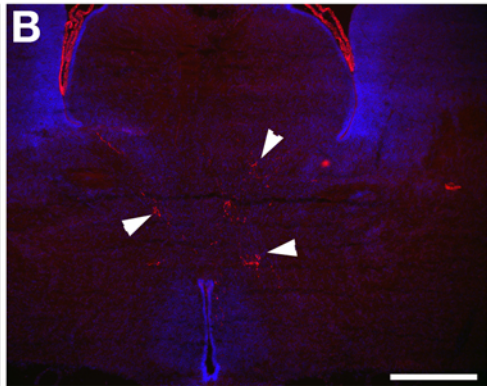
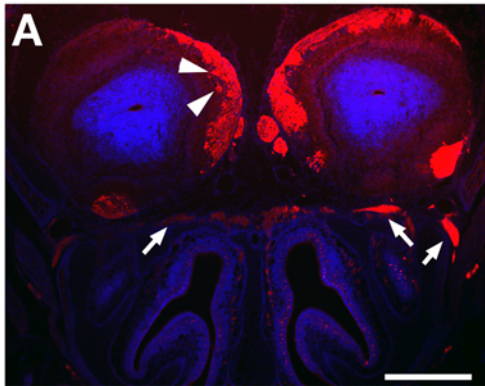
Nguyen-Ba-Charvet et al., fig 3



OMP+Hoechst

OMP+Hoechst

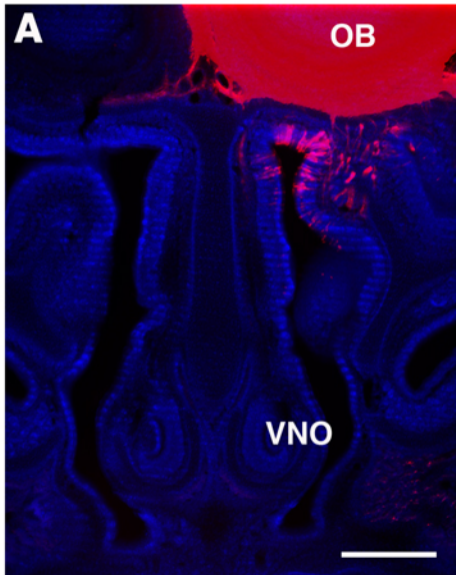
Robo2^{-/-}



Nguyen-Ba-Charvet et al., fig S1

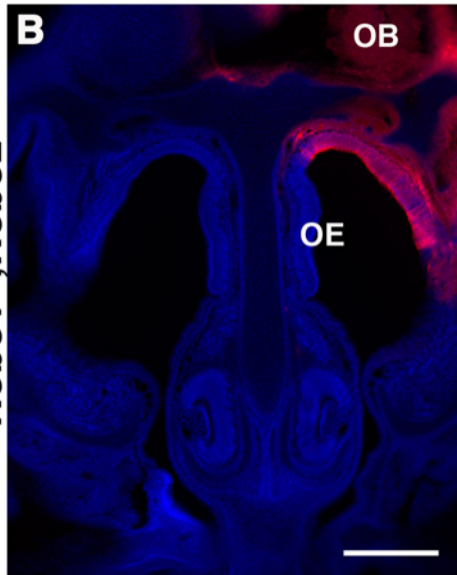
Dil + DAPI

Robo1^{+/-};Robo2^{+/-}



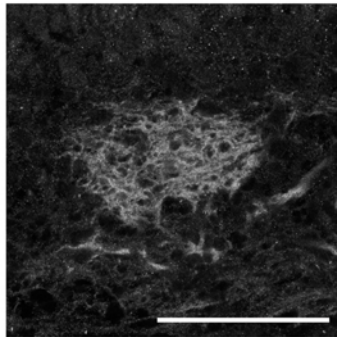
Dil + DAPI

Robo1^{-/-};Robo2^{-/-}

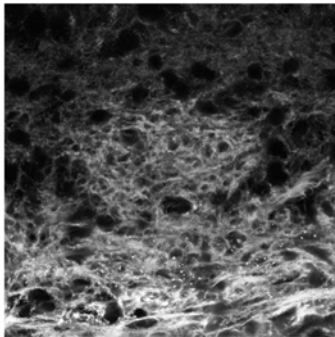


Nguyen-Ba-Charvet et al., Fig S2

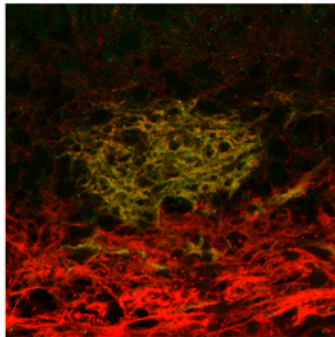
OR256



OMP



OR256 + OMP



Nguyen-Ba-Charvet et al., Fig S3

Le code de la route des axones se complique

Vieri Failli, Thomas di Meglio, Alain Chédotal

Équipe Développement neuronal, CNRS UMR7102, Université Paris 6, 9, quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France.
chedotal@infobiogen.fr

► Pendant le développement embryonnaire, les neurones du système nerveux établissent des milliards de connexions en émettant de longs prolongements, les axones, qui vont croître rapidement dans le cerveau. Cette croissance n'est pas aléatoire, mais précisément orientée, guidée par des molécules situées dans l'environnement cellulaire que traverse l'axone.

Chez la plupart des espèces animales, les moitiés droite et gauche du système nerveux sont presque parfaitement symétriques, organisées en miroir de part et d'autre d'un axe longitudinal appelé aussi ligne médiane. Chez les vertébrés, la

plaque du plancher, constituée de cellules allongées spécialisées, correspond à la partie ventrale de cette ligne médiane. Une des premières décisions que doit prendre un axone en croissance est de traverser ou de ne pas traverser la ligne médiane¹. Qui plus est, un axone qui traverse la ligne médiane (on parle aussi d'axone commissural) ne sera capable de le faire qu'une

¹ Décussation: fait de franchir le plan sagittal médian du névraxe en s'entrecroisant avec les formations similaires, controlatérales. Il existe trois zones principales de décussation: la protubérance annulaire, les pédoncules cérébraux et la zone antérieure de la moelle épinière. C'est au cours de cette décussation que les faisceaux nerveux franchissent la ligne médiane et deviennent controlatéraux par rapport à leur point d'origine.

seule fois. Des recherches génétiques menées chez la drosophile ont conduit à la découverte de plusieurs molécules contrôlant le comportement des axones vis-à-vis de la ligne médiane. Ces travaux ont montré que les cellules de la ligne médiane sécrètent une protéine appelée Slit qui, en se fixant sur son récepteur *Roundabout* (Robo), ancré à l'extrémité des axones en croissance, va les contraindre à s'éloigner de la ligne médiane (→).

Chez les mammifères, y compris chez l'homme, on connaît trois récepteurs Robo (Robo-1-3) et trois protéines

(→) m/s
1999, n° 6-7,
p. 882





Slit (Slit-1-3), toutes exprimées au niveau de la ligne médiane du système nerveux mais aussi dans d'autres organes comme le poumon et le rein. Des expériences, faisant notamment appel à la culture cellulaire, ont montré que l'activité répulsive des molécules Slit pour les axones exprimant Robo est également conservée au cours de l'évolution. On a également observé que ces molécules pouvaient influencer la migration des neurones, des leucocytes (→) et de certaines cellules tumorales ainsi que la croissance des vaisseaux sanguins (angiogenèse) [1]. Un pas important vers la confirmation du rôle essentiel des Slit et des Robo dans le développement du système nerveux des mammifères a été fait récemment grâce à l'étude de plusieurs lignées de souris modifiées génétiquement par la technique de recombinaison homologue de façon à ne plus synthétiser une ou plusieurs de ces molécules Slit ou leurs récepteurs Robo. En l'absence de Slit, l'organisation des projec-

(→) m/s
2002, n° 11,
p. 1075

tions est fortement perturbée dans l'ensemble du système nerveux [2-5]. D'une manière générale, des axones qui, chez les souris normales, évitent la ligne médiane ont un comportement opposé chez les souris déficientes en Slit et traversent cette dernière. Une autre information tirée de l'analyse de ces mutants est l'extrême redondance fonctionnelle des Slit. Ainsi, les projections des neurones du bulbe olfactif, qui poussent latéralement à la surface du cerveau, à distance de la ligne médiane, sont normales chez les souris déficientes en Slit-1 ou en Slit-2. En revanche, ces projections sont désorganisées lorsque l'on inactive chez une même souris les gènes codant pour Slit-1 et Slit-2 [3]. De même, dans la moelle épinière, l'absence de Slit-1, ou de Slit-2 et même simultanément de Slit-1 et de Slit-2 n'empêche pas les axones des neurones commissuraux de croiser la plaque du plancher. Ce n'est que lorsque les trois molécules Slit sont absentes que les projections commissurales se développent anormalement [5]. Que se passe-t-il en

l'absence des récepteurs Robo? À ce jour, seul le phénotype des souris dont un seul gène *Robo* a été inactivé a été analysé et, pour deux d'entre elles, seulement au niveau de la moelle épinière [5, 6]. Les neurones commissuraux médullaires expriment les trois récepteurs Robo à l'approche de la plaque du plancher. Comme chez la drosophile, l'expression de Robo-1 et de Robo-2 augmente fortement une fois la plaque du plancher croisée. De manière plus surprenante, l'expression de Robo-3 (aussi appelé Rig-1) s'estompe peu après la décussation¹ [6]. L'analyse des souris mutantes pour Robo-1 montre que de nombreux axones commissuraux s'arrêtent au niveau de la ligne médiane sans pouvoir la quitter, comme chez les souris déficientes en Slit, ce qui confirme que c'est bien l'interaction Slit/Robo qui permet aux axones de s'éloigner de la plaque du plancher [6]. En revanche, le développement des axones commissuraux apparaît relativement normal chez les souris déficientes en Robo-2. La formation d'autres tissus est cependant

Tout comme l'équilibre social commande le respect des différences individuelles, la mondialisation nécessite le maintien d'une diversité culturelle riche.

En diffusant des articles de qualité en français sur la recherche scientifique médicale, **Médecine/Sciences** contribue à la santé de la francophonie et du savoir.

Le ministère des Relations internationales est fier de soutenir financièrement **Médecine/Sciences** et félicite ses artisans pour leur précieux apport à la communication scientifique en français.

Québec 
Ministère des
Relations
internationales

affectée, notamment celle du rein qui se développe anormalement en l'absence de Robo-2 [7]. C'est cependant des souris déficientes en Robo-3 que sont venus les résultats les plus inattendus: les axones commissuraux de la moelle épinière ne sont plus capables de croiser la plaque du plancher [6]. Qu'en est-il des autres axones commissuraux du cerveau? Notre équipe a étudié plusieurs populations de neurones du tronc cérébral qui envoient des axones dans le cervelet, d'où leur nom de neurones précérébelleux, et ont un rôle important dans le contrôle des mouvements et de l'équilibre [8]. Tous ces neurones projettent leurs axones à travers la plaque du plancher. En outre, pendant le développement, le corps cellulaire de certains neurones précérébelleux va aussi migrer à travers la ligne médiane. Nous avons montré que tous les neurones précérébelleux expriment fortement Robo-3/Rig-1 jusqu'à ce que leurs axones ou leurs corps cellulaires aient croisé la ligne médiane. Chez les souris déficientes en Robo-3, ni les axones des neurones précérébelleux, ni leurs corps cellulaires ne traversent la plaque du plancher [8]. Le phénotype est donc identique à celui qui est observé pour les axones de la moelle épinière. Ces résultats sont surprenants car ils font de Robo-3 un régulateur négatif de l'activité inhibitrice des Slit, ce qui est inhabituel pour un récepteur Robo classique. Le mode d'action de Robo-3 reste hypothétique, mais l'on pense qu'il pourrait bloquer l'activation par Slit des

autres récepteurs Robo. La concentration élevée de Robo-3 sur les axones qui s'approchent de la ligne médiane rendrait ces derniers insensibles à l'action répulsive des Slit. Une fois celle-ci franchie, l'extinction rapide de l'expression de Robo-3 permettrait l'activation des autres récepteurs Robo, contraignant ainsi les axones à s'éloigner de la ligne médiane. Chez les souris déficientes en Robo-3, les axones sont repoussés prématurément et ne peuvent approcher la ligne médiane. Une autre surprise de taille est venue de l'étude génétique d'un syndrome humain rare [9], associant une paralysie des mouvements oculaires horizontaux à une forte scoliose (*horizontal gaze palsy with progressive scoliosis*). Chez ces patients, des analyses d'imagerie cérébrale par RMN (résonance magnétique nucléaire) ont montré une atrophie du noyau abducens, dont les neurones moteurs contrôlent les muscles oculaires responsables des déplacements horizontaux de l'œil. Ces travaux ont aussi mis en évidence une forte atrophie d'un groupe de neurones précérébelleux constituant les noyaux du pont. Enfin, l'analyse de la conduction des informations sensorielles ascendantes proprioceptives (toucher) et des informations motrices descendantes (faisceau corticospinal) a montré que, chez les patients atteints, les axones transmettant ces informations ne traversent pas la ligne médiane contrairement aux individus normaux. L'analyse génétique de dix familles de patients a révélé que tous sont

porteurs de mutations dans le gène codant pour l'homologue humain de Robo-3. Les patients sont tous homozygotes pour l'allèle muté et les individus hétérozygotes sont normaux. Ces résultats confirment donc que l'expression de Robo-3 par les neurones commissuraux est nécessaire au croisement de la ligne médiane et que cette fonction est conservée dans l'évolution. ♦

Axone guidance at the midline gets more complex

RÉFÉRENCES

1. Wang B, Xiao Y, Ding BB, et al. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 2003; 4: 19-29.
2. Bagri A, Marin O, Plump AS, et al. Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 2002; 33: 233-48.
3. Nguyen-Ba-Charvet KT, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Chedotal A. Slit1 and Slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* 2002; 22: 5473-80.
4. Plump AS, Erskine L, Sabatier C, et al. Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 2002; 33: 219-32.
5. Long H, Sabatier C, Ma L, et al. Conserved roles for slit and robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 2004; 42: 213-23.
6. Sabatier C, Plump AS, Ma L, et al. The divergent Robo family protein Rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 2004; 117: 157-69.
7. Grieshammer U, Le MA, Plump AS, et al. Slit2-mediated Robo2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 2004; 6: 709-17.
8. Marillat V, Sabatier C, Failli V, et al. The Slit receptor Rig-1/Robo3 controls the development of precerebellar neurons. *Neuron* 2004; 43: 69-79.
9. Jen JC, Chan WM, Bosley TM, et al. Mutations in a human ROBO gene Disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science* 2004; 304: 1509-13.

NOUVELLE

Trois brins d'ADN dans le centre catalytique des ADN polymérases

Patrick Lestienne

> Depuis plus de 40 ans, on admet que les ADN polymérases ne contiennent que deux brins d'ADN dans leur centre actif : le brin modèle et le brin en cours de synthèse.

Nous montrons dans ce travail qu'à partir d'une amorce formant une triple hélice, il est possible de répliquer de l'ADN en double brin si une certaine instabilité est localisée à proximité du site

d'initiation de la réplication. Par conséquent, les ADN polymérases peuvent accommoder transitoirement trois brins d'ADN au lieu de deux comme cela est communément admis.

Les conséquences portent à la fois sur les systèmes de réparation, voire des mécanismes de réarrangements de l'ADN. Des hypothèses évolu-

Laboratoire de pharmacologie des agents anticancéreux, FRE 2618 CNRS, Institut Bergonié, 229, cours de l'Argonne, 33076 Bordeaux, France. lestienne@bergonie.org

BIBLIOGRAPHIE

- Abercrombie M (1967) Contact inhibition: the phenomenon and its biological implications. *Natl Cancer Inst Monogr* 26:249-277.
- Abercrombie M (1970) Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro* 6:128-142.
- Ackerman SL, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB (1997) The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* 386:838-842.
- Akazawa C, Ishibashi M, Shimizu C, Nakanishi S, Kageyama R (1995) A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal* is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem* 270:8730-8738.
- Alcantara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C (2000) Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development* 127:1359-1372.
- Alder J, Lee KJ, Jessell TM, Hatten ME (1999) Generation of cerebellar granule neurons in vivo by transplantation of BMP-treated neural progenitor cells. *Nat Neurosci* 2:535-540.
- Aletta JM, Greene LA (1988) Growth cone configuration and advance: a time-lapse study using video-enhanced differential interference contrast microscopy. *J Neurosci* 8:1425-1435.
- Aloe L, Levi-Montalcini R (1979) Nerve growth factor induced overgrowth of axotomized superior cervical ganglia in neonatal rats. Similarities and differences with NGF effects in chemically axotomized sympathetic ganglia. *Arch Ital Biol* 117:287-307.
- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-457.
- Altman J, Bayer SA (1978) Prenatal development of the cerebellar system in the rat. II. Cytogenesis and histogenesis of the inferior olive, pontine gray, and the precerebellar reticular nuclei. *J Comp Neurol* 179:49-75.
- Altman J, Bayer SA (1980) Development of the brain stem in the rat. IV. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the pontine region. *J Comp Neurol* 194:905-929.
- Altman J, Bayer SA (1987a) Development of the precerebellar nuclei in the rat: I. The precerebellar neuroepithelium of the rhombencephalon. *J Comp Neurol* 257:477-489.
- Altman J, Bayer SA (1987b) Development of the precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J Comp Neurol* 257:490-512.
- Altman J, Bayer SA (1987c) Development of the precerebellar nuclei in the rat: III. The posterior precerebellar extramural migratory stream and the lateral reticular and external cuneate nuclei. *J Comp Neurol* 257:513-528.
- Altman J, Bayer SA (1987d) Development of the precerebellar nuclei in the rat: IV. The anterior precerebellar extramural migratory stream and the nucleus reticularis tegmenti pontis and the basal pontine gray. *J Comp Neurol* 257:529-552.
- Altman J et Bayer SA (1997) Development of the cerebellar system: in relation to its evolution, structure, and functions. Boca Raton, FL: CRC.
- Ambrosiani J, Armengol JA, Martinez S, Puelles L (1996) The avian inferior olive derives from the alar neuroepithelium of the rhombomeres 7 and 8: an analysis by using chick-quail chimeric embryos. *Neuroreport* 7:1285-1288.
- Amoiridis G, Tzagournissakis M, Christodoulou P, Karampekios S, Latsoudis H, Panou T, Simos P, Plaitakis A (2006) Patients with horizontal gaze palsy and progressive scoliosis due to ROBO3 E319K mutation have both uncrossed and crossed central nervous system pathways and perform normally on neuropsychological testing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:1047-1053.
- Anderson S, Mione M, Yun K, Rubenstein JL (1999) Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons: role of *Dlx* genes in neocortical interneuronogenesis. *Cereb Cortex* 9:646-654.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JLR (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: Dependence on *Dlx* genes. *Science* 278:474-476.
- Andrews W, Liapi A, Plachez C, Camurri L, Zhang J, Mori S, Murakami F, Parnavelas JG, Sundaresan V, Richards LJ (2006) *Robo1* regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. *Development* 133:2243-2252.
- Andrews WD, Barber M, Parnavelas JG (2007) Slit-Robo interactions during cortical development. *J Anat*.
- Anselmo MA, Dalvin S, Prophan P, Komatsuzaki K, Aidlen JT, Schnitzer JJ, Wu JY, Kinane TB (2003) Slit and robo: expression patterns in lung development. *Gene Expr Patterns* 3:13-19.
- Armand J (1982) The origin, course and terminations of corticospinal fibers in various mammals. *Prog Brain Res* 57:329-360.
- Auclair F, Valdes N, Marchand R (1996) Rhombomere-specific origin of branchial and visceral motoneurons of the facial nerve in the rat embryo. *J Comp Neurol* 369:451-461.
- 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.
- Awatramani R, Soriano P, Rodriguez C, Mai JJ, Dymecki SM (2003) Cryptic boundaries in roof plate and choroid plexus identified by intersectional gene activation. *Nat Genet* 35:70-75.
- Azizi SA, Mihailoff GA, Burne RA, Woodward DJ (1981) The pontocerebellar system in the rat: an HRP study. I. Posterior vermis. *J Comp Neurol* 197:543-548.
- Azizi SA, Woodward DJ (1987) Inferior olivary nuclear complex of the rat: morphology and comments on the principles of organization within the olivocerebellar system. *J Comp Neurol* 263:467-484.

- Backer S, Hidalgo-Sanchez M, Offner N, Portales-Casamar E, Debant A, Fort P, Gauthier-Rouviere C, Bloch-Gallego E (2007) Trio controls the mature organization of neuronal clusters in the hindbrain. *J Neurosci* 27:10323-10332.
- Backer S, Sakurai T, Grumet M, Sotelo C, Bloch-Gallego E (2002) Nr-CAM and TAG-1 are expressed in distinct populations of developing precerebellar and cerebellar neurons. *Neuroscience* 113:743-748.
- Bagri A, Marin O, Plump AS, Mak J, Pleasure SJ, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M (2002) Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33:233-248.
- Barallobre MJ, Pascual M, Del Rio JA, Soriano E (2005) The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res Brain Res Rev* 49:22-47.
- Baron-Cohen S (2004) The cognitive neuroscience of autism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:945-948.
- Bashaw GJ, Goodman CS (1999) Chimeric axon guidance receptors: the cytoplasmic domains of slit and netrin receptors specify attraction versus repulsion. *Cell* 97:917-926.
- Bashaw GJ, Kidd T, Murray D, Pawson T, Goodman CS (2000) Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* 101:703-715.
- Bastiani MJ, Raper JA, Goodman CS (1984) Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. III. Selective affinity of the G growth cone for the P cells within the A/P fascicle. *J Neurosci* 4:2311-2328.
- Bate CM (1976) Pioneer neurones in an insect embryo. *Nature* 260:54-56.
- Bates B, Rios M, Trumpp A, Chen C, Fan G, Bishop JM, Jaenisch R (1999) Neurotrophin-3 is required for proper cerebellar development. *Nat Neurosci* 2:115-117.
- Battye R, Stevens A, Jacobs JR (1999) Axon repulsion from the midline of the *Drosophila* CNS requires slit function. *Development* 126:2475-2481.
- Battye R, Stevens A, Perry RL, Jacobs JR (2001) Repellent signaling by Slit requires the leucine-rich repeats. *J Neurosci* 21:4290-4298.
- Bedell VM, Yeo SY, Park KW, Chung J, Seth P, Shivalingappa V, Zhao J, Obara T, Sukhatme VP, Drummond IA, Li DY, Ramchandran R (2005) roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6373-6378.
- Behar TN, Dugich-Djordjevic MM, Li YX, Ma W, Somogyi R, Wen X, Brown E, Scott C, McKay RD, Barker JL (1997) Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur J Neurosci* 9:2561-2570.
- Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Metin C (2005) Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* 25:5691-5699.
- Ben-Arie N, Bellen HJ, Armstrong DL, McCall AE, Gordadze PR, Guo Q, Matzuk MM, Zoghbi HY (1997) Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* 390:169-172.
- Ben-Arie N, Hassan BA, Bermingham NA, Malicki DM, Armstrong D, Matzuk M, Bellen HJ, Zoghbi HY (2000) Functional conservation of atonal and Math1 in the CNS and PNS. *Development* 127:1039-1048.
- Berghuis P, Rajnicsek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urban GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Cauty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T (2007) Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. *Science* 316:1212-1216.
- Bermingham NA, Hassan BA, Price SD, Vollrath MA, Ben-Arie N, Eatock RA, Bellen HJ, Lysakowski A, Zoghbi HY (1999) Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284:1837-1841.
- Bermingham NA, Hassan BA, Wang VY, Fernandez M, Banfi S, Bellen HJ, Fritzsche B, Zoghbi HY (2001) Proprioceptor pathway development is dependent on Math1. *Neuron* 30:411-422.
- Bernhardt RR, Patel CK, Wilson SW, Kuwada JY (1992) Axonal trajectories and distribution of GABAergic spinal neurons in wildtype and mutant zebrafish lacking floor plate cells. *J Comp Neurol* 326:263-272.
- Bhat KM (2005) Slit-roundabout signaling neutralizes netrin-Frazzled-mediated attractant cue to specify the lateral positioning of longitudinal axon pathways. *Genetics* 170:149-159.
- Bhat KM, Gaziova I, Krishnan S (2007) Regulation of Axon guidance by Slit and Netrin signaling in the *Drosophila* ventral nerve cord. *Genetics*.
- Bloch-Gallego E, Ezan F, Tessier-Lavigne M, Sotelo C (1999) Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J Neurosci* 19:4407-4420.
- Bloechlinger S, Karchewski LA, Woolf CJ (2004) Dynamic changes in glypican-1 expression in dorsal root ganglion neurons after peripheral and central axonal injury. *Eur J Neurosci* 19:1119-1132.
- Bonhoeffer F, Huf J (1980) Recognition of cell types by axonal growth cones in vitro. *Nature* 288:162-164.
- Borghesani PR, Peyrin JM, Klein R, Rubin J, Carter AR, Schwartz PM, Luster A, Corfas G, Segal RA (2002) BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development* 129:1435-1442.
- Borrell V, Marin O (2006) Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat Neurosci* 9:1284-1293.
- Bosley TM, Salih MA, Jen JC, Lin DD, Oystreck D, Abu-Amro KK, MacDonald DB, al Zayed Z, al Dhalaan H, Kansu T, Stigsby B, Baloh RW (2005) Neurologic features of horizontal gaze palsy and progressive scoliosis with mutations in ROBO3. *Neurology* 64:1196-1203.
- Bourikas D, Pekarik V, Baeriswyl T, Grunditz A, Sadhu R, Nardo M, Stoeckli ET (2005) Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat Neurosci* 8:297-304.
- Bourrat F, Sotelo C (1988) Migratory pathways and neuritic differentiation of inferior olivary neurons in the rat embryo. Axonal tracing study using the in vitro slab technique. *Brain Res* 467:19-37.

- Bourrat F, Sotelo C (1990a) Early development of the rat precerebellar system: migratory routes, selective aggregation and neuritic differentiation of the inferior olive and lateral reticular nucleus neurons. An overview. *Arch Ital Biol* 128:151-170.
- Bourrat F, Sotelo C (1990b) Migratory pathways and selective aggregation of the lateral reticular neurons in the rat embryo: a horseradish peroxidase in vitro study, with special reference to migration patterns of the precerebellar nuclei. *J Comp Neurol* 294:1-13.
- Bourrat F, Sotelo C (1991) Relationships between neuronal birthdates and cytoarchitecture in the rat inferior olivary complex. *J Comp Neurol* 313:509-521.
- Bouziques C, Morel M, Triller A, Dahan M (2007) Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11251-11256.
- Bovolenta P, Dodd J (1990) Guidance of commissural growth cones at the floor plate in embryonic rat spinal cord. *Development* 109:435-447.
- Bovolenta P, Dodd J (1991) Perturbation of neuronal differentiation and axon guidance in the spinal cord of mouse embryos lacking a floor plate: analysis of Danforth's short-tail mutation. *Development* 113:625-639.
- Bovolenta P, Marti E (2005) Introduction: unexpected roles for morphogens in the development and regeneration of the CNS. *J Neurobiol* 64:321-323.
- Braisted JE, Catalano SM, Stimac R, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Shatz CJ, O'Leary DD (2000) Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J Neurosci* 20:5792-5801.
- Brankatschk M, Dickson BJ (2006) Netrins guide *Drosophila* commissural axons at short range. *Nat Neurosci* 9:188-194.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.
- Brittis PA, Lu Q, Flanagan JG (2002) Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target. *Cell* 110:223-235.
- Brodal A, Kawamura K (1980) Olivocerebellar projection: a review. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 64:IVIII, 1-140.
- Brodal P (1979) The pontocerebellar projection in the rhesus monkey: an experimental study with retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* 4:193-208.
- Brodal P, Bjaalie JG (1992) Organization of the pontine nuclei. *Neurosci Res* 13:83-118.
- 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.
- Brose K, Tessier-Lavigne M (2000) Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol* 10:95-102.
- Brown WS, Jeeves MA, Dietrich R, Burnison DS (1999) Bilateral field advantage and evoked potential interhemispheric transmission in commissurotomy and callosal agenesis. *Neuropsychologia* 37:1165-1180.
- Brown WS, Thrasher ED, Paul LK (2001) Interhemispheric Stroop effects in partial and complete agenesis of the corpus callosum. *J Int Neuropsychol Soc* 7:302-311.
- Brunet I, Di Nardo AA, Sonnier L, Beurdeley M, Prochiantz A (2007) The topological role of homeoproteins in the developing central nervous system. *Trends Neurosci* 30:260-267.
- Brunet I, Weigl C, Piper M, Trembleau A, Volovitch M, Harris W, Prochiantz A, Holt C (2005) The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438:94-98.
- Brunjes PC, Frazier LL (1986) Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. *Brain Res* 396:1-45.
- Buck KB, Zheng JQ (2002) Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *J Neurosci* 22:9358-9367.
- Bulow HE, Hobert O (2004) Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development. *Neuron* 41:723-736.
- Butler SJ, Dodd J (2003) A role for BMP heterodimers in roof plate-mediated repulsion of commissural axons. *Neuron* 38:389-401.
- Cajal S.R. y. (1890). A quelle époque apparaissent les expansions des cellules nerveuses de la moelle épinière du poulet? *Anatomomischer Anzeiger* 21-22, 609-639.
- Cajal S.R. y. (1898) Estructura del kiasma optico y teoria general de los entrecruzamientos de las vias nerviosas, *Rev Trim Micrografica* 3, pp. 15-65.
- Cajal S.R. y. (1909). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, Édition française. Maloine, Paris.
- Cajal S.R. y. (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Maloine, Paris.
- Cambronero F, Puelles L (2000) Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. *J Comp Neurol* 427:522-545.
- Campbell DS, Stringham SA, Timm A, Xiao T, Law MY, Baier H, Nonet ML, Chien CB (2007) Slit1a Inhibits Retinal Ganglion Cell Arborization and Synaptogenesis via Robo2-Dependent and -Independent Pathways. *Neuron* 55:231-245.
- Campbell K, Gotz M (2002) Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25:235-238.
- Camurri L, Mambetisaeva E, Davies D, Parnavelas J, Sundaresan V, Andrews W (2005) Evidence for the existence of two Robo3 isoforms with divergent biochemical properties. *Mol Cell Neurosci* 30:485-493.
- Camurri L, Mambetisaeva E, Sundaresan V (2004) Rig-1 a new member of Robo family genes exhibits distinct pattern of expression during mouse development. *Gene Expr Patterns* 4:99-103.
- Carmeliet P, Tessier-Lavigne M (2005) Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436:193-200.

- Caroni P, Schwab ME (1988) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1:85-96.
- Caton A, Hacker A, Naeem A, Livet J, Maina F, Bladt F, Klein R, Birchmeier C, Guthrie S (2000) The branchial arches and HGF are growth-promoting and chemoattractant for cranial motor axons. *Development* 127:1751-1766.
- Causeret F, Danne F, Ezan F, Sotelo C, Bloch-Gallego E (2002) Slit antagonizes netrin-1 attractive effects during the migration of inferior olivary neurons. *Dev Biol* 246:429-440.
- Causeret F, Hidalgo-Sanchez M, Fort P, Backer S, Popoff MR, Gauthier-Rouviere C, Bloch-Gallego E (2004) Distinct roles of Rac1/Cdc42 and Rho/Rock for axon outgrowth and nucleokinesis of precerebellar neurons toward netrin 1. *Development* 131:2841-2852.
- Chalasanani SH, Sabelko KA, Sunshine MJ, Littman DR, Raper JA (2003) A chemokine, SDF-1, reduces the effectiveness of multiple axonal repellents and is required for normal axon pathfinding. *J Neurosci* 23:1360-1371.
- Challa AK, Beattie CE, Seeger MA (2001) Identification and characterization of roundabout orthologs in zebrafish. *Mech Dev* 101:249-253.
- Challacombe JF, Snow DM, Letourneau PC (1996) Actin filament bundles are required for microtubule reorientation during growth cone turning to avoid an inhibitory guidance cue. *J Cell Sci* 109 (Pt 8):2031-2040.
- Challacombe JF, Snow DM, Letourneau PC (1997) Dynamic microtubule ends are required for growth cone turning to avoid an inhibitory guidance cue. *J Neurosci* 17:3085-3095.
- Chan SSY, Zheng H, Su MW, Wilk R, Killeen MT, Hedgecock EM, Culotti JG (1996) UNC-40, a C-elegans homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 87:187-195.
- Charrasse S, Comunale F, Fortier M, Portales-Casamar E, Debant A, Gauthier-Rouviere C (2007) M-cadherin activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF trio during myoblast fusion. *Mol Biol Cell* 18:1734-1743.
- Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M (2003) The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* 113:11-23.
- Charron F, Tessier-Lavigne M (2005) Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 132:2251-2262.
- Chedotal A, Bloch-Gallego E, Sotelo C (1997) The embryonic cerebellum contains topographic cues that guide developing inferior olivary axons. *Development* 124:861-870.
- Chedotal A, Kerjan G, Moreau-Fauvarque C (2005) The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. *Cell Death Differ* 12:1044-1056.
- Chedotal A, Sotelo C (1992) Early Development of Olivocerebellar Projections in the Fetal Rat Using CGRP Immunocytochemistry. *Eur J Neurosci* 4:1159-1179.
- Chen H, Bagri A, Zupicich JA, Zou Y, Stoeckli E, Pleasure SJ, Lowenstein DH, Skarnes WC, Chedotal A, Tessier-Lavigne M (2000a) Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25:43-56.
- Chen H, Chédotal A, He ZG, Goodman CS, 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.
- Chen J-h, Wen L, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (2001a) The N-terminal leucine-rich regions in slit are sufficient to repel olfactory bulb axons and subventricular zone neurons. *The Journal of Neuroscience* 21:1548-1556.
- Chen J-H, Wu W, Li H, Fagaly T, Zhou L, Wu JY, Rao Y (2000b) Embryonic expression and extracellular secretion of *Xenopus* Slit. *Neurosci* 96:231-236.
- Chen JH, Wen L, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (2001b) The N-terminal leucine-rich regions in Slit are sufficient to repel olfactory bulb axons and subventricular zone neurons. *J Neurosci* 21:1548-1556.
- Cheng HJ, Nakamoto M, Bergemann AD, Flanagan JG (1995) Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82:371-381.
- Chinnasamy D, Rudd R, Velakoulis D (2006) A case of schizophrenia with complete agenesis of the corpus callosum. *Australas Psychiatry* 14:327-330.
- Cho JH, Lepine M, Andrews W, Parnavelas J, Cloutier JF (2007) Requirement for Slit-1 and Robo-2 in zonal segregation of olfactory sensory neuron axons in the main olfactory bulb. *J Neurosci* 27:9094-9104.
- Choi YJ. (2003) Function of commissureless and related genes in *Drosophila* neural development. PhD thesis. Ohio St. Univ.
- Cicirata F, Zappala A, Serapide MF, Parenti R, Panto MR, Paz C (2005) Different pontine projections to the two sides of the cerebellum. *Brain Res Brain Res Rev* 49:280-294.
- Clark K, Hammond E, Rabbitts P (2002) Temporal and spatial expression of two isoforms of the Dutt1/Robo1 gene in mouse development. *FEBS Lett* 523:12-16.
- Colamarino SA, Tessier-Lavigne M (1995a) The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81:621-629.
- Colamarino SA, Tessier-Lavigne M (1995b) The role of the floor plate in axon guidance. *Annu Rev Neurosci* 18:497-529.
- Colavita A, Culotti JG (1998) Suppressors of ectopic UNC-5 growth cone steering identify eight genes involved in axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 194:72-85.
- Condron B (2002) Gene expression is required for correct axon guidance. *Current Biology* 12:1665.
- Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, Moyse E, Chédotal A, Mehlen P (2000) Netrin-1 mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosin A2b receptor. *Nature* 407:747-750.

- Cox EC, Muller B, Bonhoeffer F (1990) Axonal guidance in the chick visual system: posterior tectal membranes induce collapse of growth cones from the temporal retina. *Neuron* 4:31-37.
- Dalkic E, Kuscu C, Sucularli C, Aydin IT, Akcali KC, Konu O (2006) Alternatively spliced Robo2 isoforms in zebrafish and rat. *Dev Genes Evol* 216:555-563.
- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996) Early olfactory fiber projections and cell migration into the rat telencephalon. *Int J Dev Neurosci* 14:853-866.
- de Castro F, Hu L, Drabkin H, Sotelo C, Chédotal A (1999) Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted Semaphorins. *The Journal of Neuroscience* 19:4428-4436.
- de Diego I, Kyriakopoulou K, Karagozeos D, Wassef M (2002) Multiple influences on the migration of precerebellar neurons in the caudal medulla. *Development* 129:297-306.
- De Zeeuw CI, Simpson JI, Hoogenraad CC, Galjart N, Koekoek SK, Ruigrok TJ (1998) Microcircuitry and function of the inferior olive. *Trends Neurosci* 21:391-400.
- Deiner MS, Sretavan DW (1999) Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin-1- and DCC-deficient mice. *J Neurosci* 19:9900-9912.
- Denaxa M, Kyriakopoulou K, Theodorakis K, Trichas G, Vidaki M, Takeda Y, Watanabe K, Karagozeos D (2005) The adhesion molecule TAG-1 is required for proper migration of the superficial migratory stream in the medulla but not of cortical interneurons. *Dev Biol* 288:87-99.
- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.
- Desclin JC (1974) Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat. *Brain Res* 77:365-384.
- Dickson BJ, Gilestro GF (2006) Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:651-675.
- Dodd J, Morton SB, Karagozeos D, Yamamoto M, Jessell TM (1988) Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* 1:105-116.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14895-14900.
- Doherty P, Walsh FS (1994) Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. *Curr Opin Neurobiol* 4:49-55.
- Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Loschinger J, Noda M, Bonhoeffer F (1995) In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82:359-370.
- Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG, Jr., Bladt F, Birchmeier C, Barres BA, Tessier-Lavigne M (1996) Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 17:1157-1172.
- Eccles J, Llinas R, Sasaki K (1964) Excitation of Cerebellar Purkinje Cells by the Climbing Fibres. *Nature* 203:245-246.
- Eddison M, Toole L, Bell E, Wingate RJ (2004) Segmental identity and cerebellar granule cell induction in rhombomere 1. *BMC Biol* 2:14.
- Edelman GM (1985) Cell adhesion molecule expression and the regulation of morphogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50:877-889.
- Ellenberger C, Jr., Hanaway J, Netsky MG (1969) Embryogenesis of the inferior olivary nucleus in the rat: a radioautographic study and a re-evaluation of the rhombic lip. *J Comp Neurol* 137:71-79.
- Encinas JA, Kikuchi K, Chédotal A, de Castro F, Goodman CS, Kimura T (1999) Cloning, expression, and genetic mapping of Sema W, a member of the semaphorin family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2491-2496.
- Endris V, Wogatzky B, Leimer U, Bartsch D, Zatyka M, Latif F, Maher ER, Tariverdian G, Kirsch S, Karch D, Rappold GA (2002) The novel Rho-GTPase activating gene MEGAP/ srGAP3 has a putative role in severe mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11754-11759.
- Engelkamp D (2002) Cloning of three mouse Unc5 genes and their expression patterns at mid-gestation. *Mech Dev* 118:191-197.
- Engelkamp D, Rashbass P, Seawright A, van Heyningen V (1999) Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* 126:3585-3596.
- Englund C, Kowalczyk T, Daza RA, Dagan A, Lau C, Rose MF, Hevner RF (2006) Unipolar brush cells of the cerebellum are produced in the rhombic lip and migrate through developing white matter. *J Neurosci* 26:9184-9195.
- Englund C, Steneberg P, Falileeva L, Xylourgidis N, Samakovlis C (2002) Attractive and repulsive functions of Slit are mediated by different receptors in the Drosophila trachea. *Development* 129:4941-4951.
- Erskine L, Herrera E (2007) The retinal ganglion cell axon's journey: Insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 308:1-14.
- Erskine L, Williams SE, Brose K, Kidd T, Rachel RA, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Mason CA (2000) Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robos and slits. *J Neurosci* 20:4975-4982.
- Essik CR (1912). The development of the nuclei pontis and the nucleus arcuatus in man. *Am J Anat* 13, 25-54.
- Essik CR (1912). The development of the nuclei pontis and the nucleus arcuatus in man. *Am J Anat* 13, 25-54.
- Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, Bozon M, Rougon G, Grumet M, Puschel AW, Sanes JR, Castellani V (2005) Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48:63-75.

- Fan X, Labrador JP, Hing H, Bashaw GJ (2003) Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* 40:113-127.
- Farago AF, Awatramani RB, Dymecki SM (2006) Assembly of the brainstem cochlear nuclear complex is revealed by intersectional and subtractive genetic fate maps. *Neuron* 50:205-218.
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386:796-804.
- Fields RD, Itoh K (1996) Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19:473-480.
- Filbin MT (2003) Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 4:703-713.
- Finger S. (1994) *Origins of neuroscience: a history of explorations into brain function*. Oxford: Oxford University Press.
- Fink AJ, Englund C, Daza RA, Pham D, Lau C, Nivison M, Kowalczyk T, Hevner RF (2006) Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J Neurosci* 26:3066-3076.
- Fitzgerald M, Kwiat GC, Middleton J, Pini A (1993) Ventral spinal cord inhibition of neurite outgrowth from embryonic rat dorsal root ganglia. *Development* 117:1377-1384.
- Fitzli D, Stoeckli ET, Kunz S, Siribour K, Rader C, Kunz B, Kozlov SV, Buchstaller A, Lane RP, Suter DM, Dreyer WJ, Sonderegger P (2000) A direct interaction of axonin-1 with NgCAM-related cell adhesion molecule (NrCAM) results in guidance, but not growth of commissural axons. *The Journal of Cell Biology* 149:951-968.
- Flanagan JG (1999) Life on the road. *Nature* 401:747-748.
- Fricke C, Lee J-S, Geiger-Rudolph S, Bonhoeffer F, Chien C-B (2001) *astray*, a zebrafish roundabout homolog required for retinal axon guidance. *Science* 292:507-510.
- Fujisawa H (2004) Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J Neurobiol* 59:24-33.
- Funfschilling U, Reichardt LF (2002) Cre-mediated recombination in rhombic lip derivatives. *Genesis* 33:160-169.
- Furrer MP, Kim S, Wolf B, Chiba A (2003) Robo and Frazzled/DCC mediate dendritic guidance at the CNS midline. *Nat Neurosci* 6:223-230.
- Garbe DS, Bashaw GJ (2007) Independent functions of Slit-Robo repulsion and Netrin-Frazzled attraction regulate axon crossing at the midline in *Drosophila*. *J Neurosci* 27:3584-3592.
- Gall FJ, Spürzheim G. (1810) *Anatomie et physiologie du système nerveux en général et du cerveau en particulier, avec les observations sur la possibilité de reconnaître plusieurs dispositions intellectuelles et morales de l'homme et des animaux par la configuration de leur tête*. Paris: Schoell.
- Gavalas A, Davenne M, Lumsden A, Chambon P, Rijli FM (1997) Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* 124:3693-3702.
- Gavalas A, Krumlauf R (2000) Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Curr Opin Genet Dev* 10:380-386.
- Gazzaniga MS (2005) Forty-five years of split-brain research and still going strong. *Nat Rev Neurosci* 6:653-659.
- Georgiou M, Tear G (2002) Commissureless is required both in commissural neurones and midline cells for axon guidance across the midline. *Development* 129:2947-2956.
- Georgiou M, Tear G (2003) The N-terminal and transmembrane domains of Commissureless are necessary for its function and trafficking within neurons. *Mech Dev* 120:1009-1019.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM (2000) Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1823-1828.
- Ghose A, Van Vactor D (2002) GAPs in Slit-Robo signaling. *Bioessays* 24:401-404.
- Ghosh A, Antonini A, McConnell SK, Shatz CJ (1990) Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature* 347:179-181.
- Ghosh A, Shatz CJ (1993) A role for subplate neurons in the patterning of connections from thalamus to neocortex. *Development* 117:1031-1047.
- Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levengood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M (2000) Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25:29-41.
- Gilthorpe JD, Papantoniou EK, Chedotal A, Lumsden A, Wingate RJ (2002) The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Development* 129:4719-4728.
- Gitai Z, Yu TW, Lundquist EA, Tessier-Lavigne M, Bargmann CI (2003) The netrin receptor UNC-40/DCC stimulates axon attraction and outgrowth through enabled and, in parallel, Rac and UNC-115/AbLIM. *Neuron* 37:53-65.
- Godenschwege TA, Simpson JH, Shan X, Bashaw GJ, Goodman CS, Murphey RK (2002) Ectopic expression in the giant fiber system of *Drosophila* reveals distinct roles for roundabout (Robo), Robo2, and Robo3 in dendritic guidance and synaptic connectivity. *J Neurosci* 22:3117-3129.
- Goldberg DJ, Burmeister DW (1986) Stages in axon formation: observations of growth of *Aplysia* axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *J Cell Biol* 103:1921-1931.
- Goodman CS, Bastiani MJ, Doe CQ, du Lac S, Helfand SL, Kuwada JY, Thomas JB (1984) Cell recognition during neuronal development. *Science* 225:1271-1279.
- Gordon-Weeks PR (2004) Microtubules and growth cone function. *J Neurobiol* 58:70-83.
- Gordon-Weeks PR, Fischer I (2000) MAP1B expression and microtubule stability in growing and regenerating axons. *Microsc Res Tech* 48:63-74.
- Gould BB (1979) The organization of afferents to the cerebellar cortex in the cat: projections from the deep cerebellar nuclei. *J Comp Neurol* 184:27-42.

- Gould BB (1980) Organization of afferents from the brain stem nuclei to the cerebellar cortex in the cat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 62:v-viii, 1-90.
- Grenningloh G, Goodman CS (1992) Pathway recognition by neuronal growth cones: genetic analysis of neural cell adhesion molecules in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 2:42-47.
- Grieshammer U, Ma L, Plump AS, Wang F, Tessier-Lavigne M, Martin GR (2004) SLIT2-Mediated ROBO2 Signaling Restricts Kidney Induction to a Single Site. *Dev Cell* 6:709-717.
- Guan CB, Xu HT, Jin M, Yuan XB, Poo MM (2007) Long-range Ca²⁺ signaling from growth cone to soma mediates reversal of neuronal migration induced by slit-2. *Cell* 129:385-395.
- Gundersen RW, Barrett JN (1979) Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science* 206:1079-1080.
- Guthrie S, Pini A (1995) Chemorepulsion of developing motor axons by the floor plate. *Neuron* 14:1117-1130.
- Gwyn DG, Nicholson GP, Flumerfelt BA (1977) The inferior olivary nucleus of the rat: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 174:489-520.
- Hallonet M, Alvarado-Mallart RM (1997) The chick/quail chimeric system: a model for early cerebellar development. *Perspect Dev Neurobiol* 5:17-31.
- Halloran MC, Kalil K (1994) Dynamic behaviors of growth cones extending in the corpus callosum of living cortical brain slices observed with video microscopy. *The Journal of Neuroscience* 14:2161-2177.
- Hamelin M, Zhou Y, Su MW, Scott IM, Culotti JG (1993) Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally. *Nature* 364:327-330.
- Hammond R, Vivancos V, Naeem A, Chilton J, Mambitisaeva E, Andrews W, Sundaresan V, Guthrie S (2005) Slit-mediated repulsion is a key regulator of motor axon pathfinding in the hindbrain. *Development* 132:4483-4495.
- Hao JC, Yu TW, Fujisawa K, Culotti JG, Gengyo-Ando K, Mitani S, Moulder G, Barstead R, Tessier-Lavigne M, Bargmann CI (2001) *C. elegans* slit acts in midline, dorsal-ventral, and anterior-posterior guidance via the SAX-3/Robo receptor. *Neuron* 32:25-38.
- Harkmark W (1954) Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons; a morphological and experimental investigation on chick embryos. *J Comp Neurol* 100:115-209.
- Harris R, Sabatelli LM, Seeger MA (1996) Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: Identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* 17:217-228.
- Harrison, R.G. (1910). The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exp. Zool.* 9, 787–848.
- Hatta K (1992) Role of the floor plate in axonal patterning in the zebrafish CNS. *Neuron* 9:629-642.
- Hatta K, Kimmel CB, Ho RK, Walker C (1991) The cyclops mutation blocks specification of the floor plate of the zebrafish central nervous system. *Nature* 350:339-341.
- Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22:511-539.
- Hatten ME (2002) New directions in neuronal migration. *Science* 297:1660-1663.
- He ZG, Tessier-Lavigne M (1997) Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90:739-751.
- Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH (1990) The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4:61-85.
- Heffner CD, Lumsden AGS, O'Leary DDM (1990) Target control of collateral extension and directional axon growth in the mammalian brain. *Science* 247:217-220.
- Helms AW, Johnson JE (1998) Progenitors of dorsal commissural interneurons are defined by MATH1 expression. *Development* 125:919-928.
- Hemond SG, Glover JC (1993) Clonal patterns of cell proliferation, migration, and dispersal in the brainstem of the chicken embryo. *J Neurosci* 13:1387-1402.
- Hentschel HG, van Ooyen A (1999) Models of axon guidance and bundling during development. *Proc Biol Sci* 266:2231-2238.
- Hinds JW, Hinds PL (1972) Reconstruction of dendritic growth cones in neonatal mouse olfactory bulb. *J Neurocytol* 1:169-187.
- Hirata T, Fujisawa H, Wu JY, Rao Y (2001) Short-range guidance of olfactory bulb axons is independent of repulsive factor slit. *J Neurosci* 21:2373-2379.
- Hivert B, Liu Z, Chuang J-Y, Doherty P, Sundaresan V (2002) Robo1 and Robo2 are homophilic binding molecules that promote axonal growth. *Mol Cell Neurosci* 21:534-545.
- His W (1890). Die entwicklung des menschlichen rautenhirns vom ende des ersten bis zum beginn des dritten monats. I. Verlängertes Mark. *Abh Kön Sächs Ges d Wiss, Mat Phys Kl* 29, 1-74.
- Ho RK, Ball EE, Goodman CS (1983) Muscle pioneers: large mesodermal cells that erect a scaffold for developing muscles and motoneurons in grasshopper embryos. *Nature* 301:66-69.
- Hohenester E, Hussain S, Howitt JA (2006) Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors. *Biochem Soc Trans* 34:418-421.
- Holmes G, Niswander L (2001) Expression of slit-2 and slit-3 during chick development. *Dev Dyn* 222:301-307.
- Holmes GP, Negus K, Burridge L, Raman S, Algar E, Yamada T, Little MH (1998) Distinct but overlapping expression patterns of two vertebrate slit homologs implies functional roles in CNS development and organogenesis. *Mech Dev* 79:57-72.
- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo M-m, Tessier-Lavigne M, Stein EL (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97:927-941.

- Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, Watanabe M, Bito H, Terashima T, Wright CV, Kawaguchi Y, Nakao K, Nabeshima Y (2005) Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron* 47:201-213.
- Howitt JA, Clout NJ, Hohenester E (2004) Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit. *EMBO Journal* 23:4406-4412.
- Hsouna A, Kim YS, VanBerkum MF (2003) Abelson tyrosine kinase is required to transduce midline repulsive cues. *J Neurobiol* 57:15-30.
- Hu H (1999) Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 23:703-711.
- Hu H (2001) Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nat Neurosci* 4:695-701.
- Hu H, Li M, Labrador JP, McEwen J, Lai EC, Goodman CS, Bashaw GJ (2005) Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4613-4618.
- Hu H, Rutishauser U (1996) A septum-derived chemorepulsive factor for migrating olfactory interneuron precursors. *Neuron* 16:933-940.
- Hu Z, Yue X, Shi G, Yue Y, Crockett DP, Blair-Flynn J, Reuhl K, Tessarollo L, Zhou R (2003) Corpus callosum deficiency in transgenic mice expressing a truncated ephrin-A receptor. *J Neurosci* 23:10963-10970.
- Humniecki L, Gorn M, Suchting S, Poulson R, Bicknell R (2002) Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* 79:547-552.
- Hummel T, Schimmelpfeng K, Klambt C (1999) Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Dev Biol* 209:381-398.
- Hussain SA, Piper M, Fukuhara N, Strohlic L, Cho G, Howitt JA, Ahmed Y, Powell AK, Turnbull JE, Holt CE, Hohenester E (2006) A molecular mechanism for the heparan sulfate dependence of slit-robo signaling. *J Biol Chem* 281:39693-39698.
- Hutson LD, Chien CB (2002) Pathfinding and error correction by retinal axons: the role of *astray/robo2*. *Neuron* 33:205-217.
- Hutson LD, Jurynek MJ, Yeo SY, Okamoto H, Chien CB (2003) Two divergent slit1 genes in zebrafish. *Dev Dyn* 228:358-369.
- 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.
- Inatani M, Irie F, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y (2003) Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science* 302:1044-1046.
- Ing B, Shteiman-Kotler A, Castelli M, Henry P, Pak Y, Stewart B, Boulianne GL, Rotin D (2007) Regulation of Commissureless by the ubiquitin ligase D^{Nedd4} is required for neuromuscular synaptogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 27:481-496.
- Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM (1992) UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9:873-881.
- Itoh A, Miyabayashi T, Ohno M, Sakano S (1998) Cloning and expressions of three mammalian homologues of *Drosophila* slit suggest possible roles for slit in the formation and maintenance of the nervous system. *Molecular Brain Research* 62:175-186.
- Jacobs JR, Goodman CS (1989a) Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. I. A glial scaffold appears before the first growth cones. *J Neurosci* 9:2402-2411.
- Jacobs JR, Goodman CS (1989b) Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. II. Behavior of pioneer growth cones. *J Neurosci* 9:2412-2422.
- Jalink K, Eichholtz T, Postma FR, van Corven EJ, Moolenaar WH (1993) Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action. *Cell Growth Differ* 4:247-255.
- Jankovski A, Garcia C, Soriano E, Sotelo C (1998) Proliferation, migration and differentiation of neuronal progenitor cells in the adult mouse subventricular zone surgically separated from its olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience* 10:3853-3868.
- Jeeves MA, Simpson DA, Geffen G (1979) Functional consequences of the transcallosal removal of intraventricular tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 42:134-142.
- Jen J, Coulin CJ, Bosley TM, Salih MA, Sabatti C, Nelson SF, Baloh RW (2002) Familial horizontal gaze palsy with progressive scoliosis maps to chromosome 11q23-25. *Neurology* 59:432-435.
- Jen JC et al. (2004) Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science* 304:1509-1513.
- Jessell TM, Bovolenta P, Placzek M, Tessier-Lavigne M, Dodd J (1989) Polarity and patterning in the neural tube: the origin and function of the floor plate. *Ciba Found Symp* 144:255-276; discussion 276-280, 290-255.
- Jiang Y, Liu MT, Gershon MD (2003) Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol* 258:364-384.
- Jin Z, Zhang J, Klar A, Chedotal A, Rao Y, Cepko CL, Bao Z-Z (2003) *Irx4*-mediated regulation of *Slit1* expression contributes to the definition of early axonal paths inside the retina. *Development* 130:1037-1048.

- Johnson KG, Ghose A, Epstein E, Lincecum J, O'Connor MB, Van Vactor D (2004) Axonal heparan sulfate proteoglycans regulate the distribution and efficiency of the repellent slit during midline axon guidance. *Current Biology* 14:499-504.
- Kadison SR, Kaprielian Z (2004) Diversity of contralateral commissural projections in the embryonic rodent spinal cord. *J Comp Neurol* 472:411-422.
- Kadison SR, Murakami F, Matisse MP, Kaprielian Z (2006) The role of floor plate contact in the elaboration of contralateral commissural projections within the embryonic mouse spinal cord. *Dev Biol* 296:499-513.
- Kalil K, Szebenyi G, Dent EW (2000) Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching. *Journal of Neurobiology* 44:145-158.
- Kappers C.U.A. (1947) *Anatomie comparée du système nerveux*, Paris ; Masson.
- Kapfhammer JP, Grunewald BE, Raper JA (1986) The selective inhibition of growth cone extension by specific neurites in culture. *J Neurosci* 6:2527-2534.
- Kapfhammer JP, Raper JA (1987) Collapse of growth cone structure on contact with specific neurites in culture. *The Journal of Neuroscience* 7:201-212.
- Kawakami A, Kitsukawa T, Takagi S, Fujisawa H (1996) Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *Journal of Neurobiology* 29:1-17.
- Kawasaki T, Ito K, Hirata T (2006) Netrin 1 regulates ventral tangential migration of guidepost neurons in the lateral olfactory tract. *Development* 133:845-853.
- Kawauchi D, Taniguchi H, Watanabe H, Saito T, Murakami F (2006) Direct visualization of nucleogenesis by precerebellar neurons: involvement of ventricle-directed, radial fibre-associated migration. *Development* 133:1113-1123.
- Keeble TR, Halford MM, Seaman C, Kee N, Macheda M, Anderson RB, Stacker SA, Cooper HM (2006) The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci* 26:5840-5848.
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SSY, Culotti JG, Tessier-Lavigne M (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87:175-185.
- Keleman K, Dickson BJ (2001) Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* 32:605-617.
- 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.
- Keleman K, Ribeiro C, Dickson BJ (2005) Comm function in commissural axon guidance: cell-autonomous sorting of Robo in vivo. *Nat Neurosci* 8:156-163.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78:425-435.
- Kennedy TE, Wang H, Marshall W, Tessier-Lavigne M (2006) Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord. *J Neurosci* 26:8866-8874.
- Keshishian H, Bentley D (1983) Embryogenesis of peripheral nerve pathways in grasshopper legs. I. The initial nerve pathway to the CNS. *Dev Biol* 96:89-102.
- Keynes R, Cook G (1990) Cell-cell repulsion: clues from the growth cone? *Cell* 62:609-610.
- Keynes RJ, Stern CD (1984) Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature* 310:786-789.
- Kidd T, Bland KS, Goodman CS (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96:785-794.
- Kidd T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear G (1998a) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92:205-215.
- Kidd T, Russell C, Goodman CS, Tear G (1998b) Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* 20:25-33.
- Kingsbury BF (1930) The developmental significance of the floor plate of the brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 50:177-207.
- Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T, Fujisawa H (1997) Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19:995-1005.
- Klein R (2004) Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 16:580-589.
- Klein RS, Rubin JB, Gibson HD, DeHaan EN, Alvarez-Hernandez X, Segal RA, Luster AD (2001) SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *PG - Development* 128.
- Klose M, Bentley D (1989) Transient pioneer neurons are essential for formation of an embryonic peripheral nerve. *Science* 245:982-984.
- Knoll B, Schmidt H, Andrews W, Guthrie S, Pini A, Sundaresan V, Drescher U (2003) On the topographic targeting of basal vomeronasal axons through Slit-mediated chemorepulsion. *Development* 130:5073-5082.
- Kolodkin AL, Ginty DD (1997) Steering clear of semaphorins: neuropilins sound the retreat. *Neuron* 19:1159-1162.
- Kolodziej PA, Timpe LC, Mitchell KJ, Fried SR, Goodman CS, Jan LY, Jan YN (1996) frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87:197-204.
- Korey CA, Van Vactor D (2000) From the growth cone surface to the cytoskeleton: one journey, many paths. *J Neurobiol* 44:184-193.

- Koster RW, Fraser SE (2001) Direct imaging of in vivo neuronal migration in the developing cerebellum. *Current Biology* 11:1858-1863.
- Kraut R, Zinn K (2004) Roundabout 2 regulates migration of sensory neurons by signaling in trans. *Current Biology* 14:1319-1329.
- Kooy FH (1917) The inferior olive in vertebrates. *Folia Neurobiol* 10, 205-369.
- Kriegstein AR, Noctor SC (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* 27:392-399.
- Krizhanovsky V, Ben-Arie N (2006) A novel role for the choroid plexus in BMP-mediated inhibition of differentiation of cerebellar neural progenitors. *Mech Dev* 123:67-75.
- Krushel LA, Prieto AL, Cunningham BA, Edelman GM (1993) Expression patterns of the cell adhesion molecule Nr-CAM during histogenesis of the chick nervous system. *Neuroscience* 53:797-812.
- Kyriakopoulou K, de Diego I, Wassef M, Karagogeos D (2002) A combination of chain and neurophilic migration involving the adhesion molecule TAG-1 in the caudal medulla. *Development* 129:287-296.
- Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM (2001) Neuronal migration. *Mech Dev* 105:47-56.
- Landsberg RL, Awatramani RB, Hunter NL, Farago AF, DiPietrantonio HJ, Rodriguez CI, Dymecki SM (2005) Hindbrain rhombic lip is comprised of discrete progenitor cell populations allocated by Pax6. *Neuron* 48:933-947.
- Lanier LM, Gates MA, Witke W, Menzies AS, Wehman AM, Macklis JD, Kwiatkowski D, Soriano P, Gertler FB (1999) Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* 22:313-325.
- Larsell, O. (1970) *The Comparative Anatomy and Histology of the Cerebellum from Monotremes Through Apes*. Jansen J. editor. Minneapolis: University of Minnesota Press. pp. 3-269.
- Lebrand C, Dent EW, Strasser GA, Lanier LM, Krause M, Svitkina TM, Borisy GG, Gertler FB (2004) Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron* 42:37-49.
- Lee JS, Chien CB (2004) When sugars guide axons: insights from heparan sulphate proteoglycan mutants. *Nat Rev Genet* 5:923-935.
- Lee JS, Ray R, Chien CB (2001) Cloning and expression of three zebrafish roundabout homologs suggest roles in axon guidance and cell migration. *Dev Dyn* 221:216-230.
- Lentz SI, Miner JH, Sanes JR, Snider WD (1997) Distribution of the ten known laminin chains in the pathways and targets of developing sensory axons. *J Comp Neurol* 378:547-561.
- Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M (1997) Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386:833-838.
- Letourneau PC (1975) Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev Biol* 44:92-101.
- Leung-Hagesteijn C, Spence AM, Stern BD, Zhou Y, Su MW, Hedgecock EM, Culotti JG (1992) UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71:289-299.
- Lewis AK, Bridgman PC (1992) Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol* 119:1219-1243.
- Li H-s, Chen J-h, Wu W, Fagaly T, Zhou L, Yuan W, Dupuis S, Jiang Z-h, Nash W, Gick C, Ornitz DM, Wu JY, Rao Y (1999) Vertebrate Slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* 96:807-818.
- Li Q, Shirabe K, Thisse C, Thisse B, Okamoto H, Masai I, Kuwada JY (2005) Chemokine signaling guides axons within the retina in zebrafish. *J Neurosci* 25:1711-1717.
- Li S, Price SM, Cahill H, Ryugo DK, Shen MM, Xiang M (2002a) Hearing loss caused by progressive degeneration of cochlear hair cells in mice deficient for the Barhl1 homeobox gene. *Development* 129:3523-3532.
- Li S, Qiu F, Xu A, Price SM, Xiang M (2004) Barhl1 regulates migration and survival of cerebellar granule cells by controlling expression of the neurotrophin-3 gene. *J Neurosci* 24:3104-3114.
- Li X, Meriane M, Triki I, Shekarabi M, Kennedy TE, Larose L, Lamarche-Vane N (2002b) The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism. *J Biol Chem* 277:37788-37797.
- Li X, Saint-Cyr-Proulx E, Aktories K, Lamarche-Vane N (2002c) Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277:15207-15214.
- Liang Y, Annan RS, Carr SA, Popp S, Mevissen M, Margolis RK, Margolis RU (1999) Mammalian homologues of the *Drosophila* slit protein are ligands of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in brain. *Journal of Biological Chemistry* 274:17885-17892.
- Lin CH, Espreafico EM, Mooseker MS, Forscher P (1996) Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron* 16:769-782.
- Lin L, Isacson O (2006) Axonal growth regulation of fetal and embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons by Netrin-1 and Slits. *Stem Cells* 24:2504-2513.
- Lindwall C, Fothergill T, Richards LJ (2007) Commissure formation in the mammalian forebrain. *Curr Opin Neurobiol* 17:3-14.
- Little M, Rumballe B, Georgas K, Yamada T, Teasdale RD (2002) Conserved modularity and potential for alternate splicing in mouse and human Slit genes. *Int J Dev Biol* 46:385-391.
- Liu G, Rao Y (2003) Neuronal migration from the forebrain to the olfactory bulb requires a new attractant persistent in the olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience* 23:6651-6659.

- Liu J, Zhang L, Wang D, Shen H, Jiang M, Mei P, Hayden PS, Sedor JR, Hu H (2003) Congenital diaphragmatic hernia, kidney agenesis and cardiac defects associated with Slit3-deficiency in mice. *Mech Dev* 120:1059-1070.
- Liu Z, Patel K, Schmidt H, Andrews W, Pini A, Sundaresan V (2004) Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding. *Mol Cell Neurosci* 26:232-240.
- Liu ZJ, Herlyn M (2003) Slit-Robo: neuronal guides signal in tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 4:1-2.
- Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO Journal* 20:2715-2722.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Long H, Sabatier C, Le M, Plump A, Yuan W, Ornitz DM, Tamada A, Murakami F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M (2004) Conserved roles for slit and robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42:213-223.
- Lopez-Bendito G, Cautinat A, Sanchez JA, Bielle F, Flames N, Garratt AN, Talmage DA, Role LW, Charnay P, Marin O, Garel S (2006) Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125:127-142.
- Lu W et al. (2007) Disruption of ROBO2 is associated with urinary tract anomalies and confers risk of vesicoureteral reflux. *Am J Hum Genet* 80:616-632.
- Lumsden A (1990) The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends Neurosci* 13:329-335.
- Lumsden A, Krumlauf R (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274:1109-1115.
- Lumsden AG, Davies AM (1983) Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* 306:786-788.
- Lumsden AGS, Davies AM (1986) Chemotropic effect of specific target epithelium in the development of the mammalian central nervous system. *Nature* 323:538-539.
- Lundstrom A, Gallio M, Englund C, Steneberg P, Hemphala J, Aspenstrom P, Keleman K, Falileeva L, Dickson BJ, Samakovlis C (2004) Vilse, a conserved Rac/Cdc42 GAP mediating Robo repulsion in tracheal cells and axons. *Genes Dev* 18:2161-2171.
- Luo Y, Raible D, Raper JA (1993) Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75:217-227.
- Luo Y, Raper JA (1994) Inhibitory factors controlling growth cone motility and guidance. *Curr Opin Neurobiol* 4:648-654.
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.
- Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M, Zou Y (2003) Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 302:1984-1988.
- Ma L, Tessier-Lavigne M (2007) Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons. *J Neurosci* 27:6843-6851.
- MacDonald DB, Streletz LJ, Al-Zayed Z, Abdool S, Stigsby B (2004) Intraoperative neurophysiologic discovery of uncrossed sensory and motor pathways in a patient with horizontal gaze palsy and scoliosis. *Clin Neurophysiol* 115:576-582.
- Machold R, Fishell G (2005) Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron* 48:17-24.
- Mallavarapu A, Mitchison T (1999) Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J Cell Biol* 146:1097-1106.
- Mambetisaeva ET, Andrews W, Camurri L, Annan A, Sundaresan V (2005) Robo family of proteins exhibit differential expression in mouse spinal cord and Robo-Slit interaction is required for midline crossing in vertebrate spinal cord. *Dev Dyn* 233:41-51.
- Maness PF, Schachner M (2007) Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 10:19-26.
- Manitt C, Colicos MA, Thompson KM, Rousselle E, Peterson AC, Kennedy TE (2001) Widespread expression of netrin-1 by neurons and oligodendrocytes in the adult mammalian spinal cord. *J Neurosci* 21:3911-3922.
- Marillat V, Cases O, Nguyen-Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chédotal A (2002) Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* 442:130-155.
- Marillat V, Sabatier C, Failli V, Matsunaga E, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chédotal A (2004) The Slit receptor Rig-1/Robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. *Neuron* 43:1-20.
- Marin F, Puelles L (1995) Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur J Neurosci* 7:1714-1738.
- Marin O, Baker J, Puelles L, Rubenstein JL (2002) Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development* 129:761-773.
- Marin O, Plump AS, Flames N, Sanchez-Camacho C, Tessier-Lavigne M, Rubenstein JLR (2003) Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130:1889-1901.
- Marin O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nature Reviews Neuroscience* 2:780-790.
- Marin O, Rubenstein JLR (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 25:441-483.
- Marion JF, Yang C, Caqueret A, Boucher F, Michaud JL (2005) Sim1 and Sim2 are required for the correct targeting of mammillary body axons. *Development* 132:5527-5537.

- Maskery S, Shinbrot T (2005) Deterministic and stochastic elements of axonal guidance. *Annu Rev Biomed Eng* 7:187-221.
- Mason HA, Ito S, Corfas G (2001) Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *The Journal of Neuroscience* 21:7654-7663.
- Matise MP, Lustig M, Sakurai T, Grumet M, Joyner AL (1999) Ventral midline cells are required for the local control of commissural axon guidance in the mouse spinal cord. *Development* 126:3649-3659.
- Matsumoto Y, Irie F, Inatani M, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y (2007) Netrin-1/DCC signaling in commissural axon guidance requires cell-autonomous expression of heparan sulfate. *J Neurosci* 27:4342-4350.
- Matsushita M, Hosoya Y, Ikeda M (1979) Anatomical organization of the spinocerebellar system in the cat, as studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 184:81-106.
- McFarlane S, McNeill L, Holt CE (1995) FGF signaling and target recognition in the developing *Xenopus* visual system. *Neuron* 15:1017-1028.
- McGovern VL, Seeger MA (2003) Mosaic analysis reveals a cell-autonomous, neuronal requirement for Commissureless in the *Drosophila* CNS. *Dev Genes Evol* 213:500-504.
- Meerwaldt JD (1983) Disturbances of spatial perception in a patient with agenesis of the corpus callosum. *Neuropsychologia* 21:161-165.
- Mendes SW, Henkemeyer M, Liebl DJ (2006) Multiple Eph receptors and B-class ephrins regulate midline crossing of corpus callosum fibers in the developing mouse forebrain. *J Neurosci* 26:882-892.
- Metin C, Baudoin JP, Rakic S, Parnavelas JG (2006) Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 23:894-900.
- Metin C, Deleglise D, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M (1997) A role for netrin-1 in the guidance of cortical efferents. *Development* 124:5063-5074.
- Miale IL, Sidman RL (1961) An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 4:277-296.
- Mihailoff GA (1993) Cerebellar nuclear projections from the basilar pontine nuclei and nucleus reticularis tegmenti pontis as demonstrated with PHA-L tracing in the rat. *J Comp Neurol* 330:130-146.
- Mihailoff GA (1994) Identification of pontocerebellar axon collateral synaptic boutons in the rat cerebellar nuclei. *Brain Res* 648:313-318.
- Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ (1996) Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17:203-215.
- Morlot C, Thielens NM, Ravelli RB, Hemrika W, Romijn RA, Gros P, Cusack S, McCarthy AA (2007) Structural insights into the Slit-Robo complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14923-14928.
- Moutard ML, Kieffer V, Feingold J, Kieffer F, Lewin F, Adamsbaum C, Gelot A, Campistol IPJ, van Bogaert P, Andre M, Ponsot G (2003) Agenesis of corpus callosum: prenatal diagnosis and prognosis. *Childs Nerv Syst* 19:471-476.
- Mueller BK (1999) Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annual Review of Neuroscience* 22:351-388.
- Murase S, Horwitz AF (2002) Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 22:3568-3579.
- Murray MJ, Whittington PM (1999) Effects of roundabout on growth cone dynamics, filopodial length, and growth cone morphology at the midline and throughout the neuropile. *J Neurosci* 19:7901-7912.
- Myat A, Henry P, McCabe V, Flintoft L, Rotin D, Tear G (2002) *Drosophila* Nedd4, a ubiquitin ligase, is recruited by Commissureless to control cell surface levels of the roundabout receptor. *Neuron* 35:447-459.
- Nakagawa S, Brennan C, Johnson KG, Shewan D, Harris WA, Holt CE (2000) Ephrin-B regulates the ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. *Neuron* 25:599-610.
- Nery S, Fishell G, Corbin JG (2002) The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* 5:1279-1287.
- Nguyen-Ba-Charvet KT, Brose K, Marillat V, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chédotal A (2001) Sensory axons response to substrate-bound Slit2 is modulated by laminin and cyclicGMP. *Molecular and Cellular Neuroscience* 17:1048-1058.
- Nguyen-Ba-Charvet KT, Picard-Riera N, Tessier-Lavigne M, Baron-Van Evercooren A, Sotelo C, Chedotal A (2004) Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 24:1497-1506.
- Nguyen-Ba-Charvet KT, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Chedotal A (2002a) Slit1 and slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* 22:5473-5480.
- Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Ma L, Wang KH, Marillat V, Sotelo C, Tessier-Lavigne M, Chedotal A (2001) Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *J Neurosci* 21:4281-4289.
- Nguyen Ba-Charvet KT, Brose K, Marillat V, Kidd T, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Chédotal A (1999) Slit2-mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22:463-473.
- Nichols DH, Bruce LL (2006) Migratory routes and fates of cells transcribing the *Wnt-1* gene in the murine hindbrain. *Dev Dyn* 235:285-300.
- Niclou SP, Jia L, Raper JA (2000) Slit2 is a repellent for retinal ganglion cell axons. *J Neurosci* 20:4962-4974.
- Niederreither K, Vermot J, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P (2000) Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* 127:75-85.
- Nieuwenhuys R (1967) Comparative anatomy of the cerebellum. *Prog Brain Res* 25:1-93.

- Nishida K, Flanagan JG, Nakamoto M (2002) Domain-specific olivocerebellar projection regulated by the EphA-ephrin-A interaction. *Development* 129:5647-5658.
- Nissen UV, Mochida H, Glover JC (2005) Development of projection-specific interneurons and projection neurons in the embryonic mouse and rat spinal cord. *J Comp Neurol* 483:30-47.
- Nural HF, Todd Farmer W, Mastick GS (2007) The Slit receptor Robo1 is predominantly expressed via the Dutt1 alternative promoter in pioneer neurons in the embryonic mouse brain and spinal cord. *Gene Expr Patterns*.
- Nusslein-Volhard C, Wiechaus E, Kluding H (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Archives of Developmental Biology* 193:267-283.
- O'Connor R, Tessier-Lavigne M (1999) Identification of maxillary factor, a maxillary process-derived chemoattractant for developing trigeminal sensory axons. *Neuron* 24:165-178.
- O'Connor TP, Duerr JS, Bentley D (1990) Pioneer growth cone steering decisions mediated by single filopodial contacts in situ. *J Neurosci* 10:3935-3946.
- O'Leary DDM, Heffner CD, Kutka L, Lopez-Mascaraque L, Missias A, Reinoso BS (1991) A target-derived chemoattractant controls the development of the corticopontine projection by a novel mechanism of axon targeting. *Development Supp* 2:123-130.
- Oakley RA, Tosney KW (1993) Contact-mediated mechanisms of motor axon segmentation. *J Neurosci* 13:3773-3792.
- Obata J, Yano M, Mimura H, Goto T, Nakayama R, Mibu Y, Oka C, Kawaichi M (2001) p48 subunit of mouse PTF1 binds to RBP-Jkappa/CBF-1, the intracellular mediator of Notch signalling, and is expressed in the neural tube of early stage embryos. *Genes to cell* 6:345-360.
- Okabe S, Hirokawa N (1991) Actin dynamics in growth cones. *J Neurosci* 11:1918-1929.
- 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.
- Okada T, Keino-Masu K, Masu M (2007) Migration and nucleogenesis of mouse precerebellar neurons visualized by in utero electroporation of a green fluorescent protein gene. *Neurosci Res* 57:40-49.
- Ono K, Asou H, Yamada M, Tokunaga A (1992) Gradient expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) in the pontine migratory stream of fetal rats. *Neurosci Res* 15:221-223.
- Ono K, Kawamura K (1990) Mode of neuronal migration of the pontine stream in fetal mice. *Anat Embryol (Berl)* 182:11-19.
- Ono K, Yasui Y, Ikenaka K (2004) Lower rhombic lip-derived cells undergo transmedian tangential migration followed by radial migration in the chick embryo brainstem. *Eur J Neurosci* 20:914-922.
- Orioli D, Henkemeyer M, Lemke G, Klein R, Pawson T (1996) Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation. *EMBO Journal* 15:6035-6049.
- Oster SF, Bodeker MO, He F, Sretavan DW (2003) Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development. *Development* 130:775-784.
- Palay S. L. et Chan-Palay V. (1974) *Cerebellar cortex. Cytology and organization*. New York.
- Palka J, Whitlock KE, Murray MA (1992) Guidepost cells. *Curr Opin Neurobiol* 2:48-54.
- Park KW, Morrison CM, Sorensen LK, Jones CA, Rao Y, Chien CB, Wu JY, Urness LD, Li DY (2003) Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev Biol* 261:251-267.
- Parsons L, Harris KL, Turner K, Whittington PM (2003) Roundabout gene family functions during sensory axon guidance in the drosophila embryo are mediated by both Slit-dependent and Slit-independent mechanisms. *Dev Biol* 264:363-375.
- Patel K, Nash JA, Itoh A, Liu Z, Sundaresan V, Pini A (2001) Slit proteins are not dominant chemorepellents for olfactory tract and spinal motor axons. *Development* 128:5031-5037.
- Patel NH, Snow PM, Goodman CS (1987) Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48:975-988.
- Paul LK, Brown WS, Adolphs R, Tyszka JM, Richards LJ, Mukherjee P, Sherr EH (2007) Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci* 8:287-299.
- Pierce ET (1966) Histogenesis of the nuclei griseum pontis, corporis pontobulbaris and reticularis tegmenti pontis (Bechterew) in the mouse. An autoradiographic study. *J Comp Neurol* 126:219-254.
- Pierce ET (1973) Time of origin of neurons in the brain stem of the mouse. *Prog Brain Res* 40:53-65.
- Pini A (1993) Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system. *Science* 261:34-98.
- Placzek M, Tessier-Lavigne M, Yamada T, Dodd J, Jessell TM (1990) Guidance of developing axons by diffusible chemoattractants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:279-289.
- Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, Mason CA, Tessier-Lavigne M (2002) Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33:219-232.
- Polinsky M, Balazovich K, Tosney KW (2000) Identification of an invariant response: stable contact with schwann cells induces veil extension in sensory growth cones. *J Neurosci* 20:1044-1055.
- Pourquie O, Corbel C, Le Caer JP, Rossier J, Le Douarin NM (1992) BEN, a surface glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, is expressed in a variety of developing systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5261-5265.
- Prasad A, Fernandis AZ, Rao Y, Ganju RK (2004) Slit protein-mediated inhibition of CXCR4-induced chemotactic and chemoinvasive signaling pathways in breast cancer cells. *J Biol Chem* 279:9115-9124.
- Prasad A, Qamri Z, Wu J, Ganju RK (2007) Pivotal Advance: Slit-2/Robo-1 modulates the CXCL12/CXCR4-induced chemotaxis of T cells. *J Leukoc Biol*.

- Pratt T, Conway CD, Tian NM, Price DJ, Mason JO (2006) Heparan sulphation patterns generated by specific heparan sulfotransferase enzymes direct distinct aspects of retinal axon guidance at the optic chiasm. *J Neurosci* 26:6911-6923.
- Qin L, Wine-Lee L, Ahn KJ, Crenshaw EB, 3rd (2006) Genetic analyses demonstrate that bone morphogenetic protein signaling is required for embryonic cerebellar development. *J Neurosci* 26:1896-1905.
- Rabacchi SA, Solowska JM, Kruk B, Luo Y, Raper JA, Baird DH (1999) Collapsin-1/semaphorin-III/D is regulated developmentally in purkinje cells and collapses pontocerebellar mossy fiber neuronal growth cones. *The Journal of Neuroscience* 19:4437-4448.
- Rajagopalan S, Nicolas E, Vivancos V, Berger J, Dickson BJ (2000a) Crossing the midline: roles and regulation of Robo receptors. *Neuron* 28:767-777.
- Rajagopalan S, Vivancos V, Nicolas E, Dickson BJ (2000b) Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* 103:1033-1045.
- Rakic P (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* 33:471-476.
- Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145:61-83.
- Rakic P (1990) Principles of neural cell migration. *Experientia* 46:882-891.
- Raper JA, Bastiani M, Goodman CS (1983a) Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. II. Selective fasciculation onto specific axonal pathways. *J Neurosci* 3:31-41.
- Raper JA, Bastiani MJ, Goodman CS (1983b) Guidance of neuronal growth cones: selective fasciculation in the grasshopper embryo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 2:587-598.
- Raper JA, Bastiani MJ, Goodman CS (1984) Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. IV. The effects of ablating the A and P axons upon the behavior of the G growth cone. *J Neurosci* 4:2329-2345.
- Rash BG, Richards LJ (2001) A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum. *J Comp Neurol* 434:147-157.
- Rhee J, Buchan T, Zukerberg L, Lilien J, Balsamo J (2007) Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol*.
- Rhee J, Mahfooz NS, Arregui C, Lilien J, Balsamo J, VanBerkum MF (2002) Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nat Cell Biol* 4:798-805.
- Rhiner C, Gysi S, Frohli E, Hengartner MO, Hajnal A (2005) Syndecan regulates cell migration and axon guidance in *C. elegans*. *Development* 132:4621-4633.
- Richards LJ, Koester SE, Tuttle R, O'Leary DD (1997) Directed growth of early cortical axons is influenced by a chemoattractant released from an intermediate target. *J Neurosci* 17:2445-2458.
- Ringstedt T, Braisted JE, Brose K, Kidd T, Goodman C, Tessier-Lavigne M, O'Leary DD (2000) Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon. *J Neurosci* 20:4983-4991.
- Rivas RJ, Hatten ME (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:981-989.
- Rodriguez CI, Dymecki SM (2000) Origin of the precerebellar system. *Neuron* 27:475-486.
- Ronca F, Andersen JS, Paech V, Margolis RU (2001a) Characterization of Slit protein interactions with glypican-1. *Journal of Biological Chemistry* 276:29141-29147.
- Rossi A, Catala M, Biancheri R, Di Comite R, Tortori-Donati P (2004) MR imaging of brain-stem hypoplasia in horizontal gaze palsy with progressive scoliosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 25:1046-1048.
- Rothberg JM, Artavanis-Tsakonas S (1992) Modularity of the Slit protein characterization of a conserved carboxy-terminal sequence in secreted proteins and a motif implicated in extracellular protein interactions. *Journal of Molecular Biology* 227:367-370.
- Rothberg JM, Hartley DA, Walther Z, Artavanis-Tsakonas S (1988) slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* 55:1047-1059.
- Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S (1990) Slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes and Development* 4:2169-2187.
- Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A (1995) Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *The Journal of Comparative Neurology* 351:51-61.
- Rutishauser U (1993) Adhesion molecules of the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 3:709-715.
- Rutishauser U (2000) Defining a role and mechanism for IgCAM function in vertebrate axon guidance. *J Cell Biol* 149:757-760.
- Ryder EF, Cepko CL (1994) Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* 12:1011-1028.
- 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.
- Saha B, Hari P, Huilgol D, Tole S (2007) Dual role for LIM-homeodomain gene Lhx2 in the formation of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* 27:2290-2297.
- Sahay A, Kim CH, Sepkuty JP, Cho E, Hugarir RL, Ginty DD, Kolodkin AL (2005) Secreted semaphorins modulate synaptic transmission in the adult hippocampus. *J Neurosci* 25:3613-3620.
- Sahay A, Molliver ME, Ginty DD, Kolodkin AL (2003) Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J Neurosci* 23:6671-6680.

- Sang Q, Wu J, Rao Y, Hsueh YP, Tan SS (2002) Slit promotes branching and elongation of neurites of interneurons but not projection neurons from the developing telencephalon. *Mol Cell Neurosci* 21:250-265.
- Santiago-Martinez E, Soplop NH, Kramer SG (2006) Lateral positioning at the dorsal midline: Slit and Roundabout receptors guide *Drosophila* heart cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12441-12446.
- Sato M, Lopez-Mascaraque L, Heffner CD, O'Leary DD (1994) Action of a diffusible target-derived chemoattractant on cortical axon branch induction and directed growth. *Neuron* 13:791-803.
- Sato Y, Hirata T, Ogawa M, Fujisawa H (1998) Requirement for early-generated neurons recognized by monoclonal antibody Lot1 in the formation of lateral olfactory tract. *J Neurosci* 18:7800-7810.
- Sauerwein H, Lassonde MC (1983) Intra- and interhemispheric processing of visual information in callosal agenesis. *Neuropsychologia* 21:167-171.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A (2006) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-632.
- Schaar BT, McConnell SK (2005) Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13652-13657.
- Schaefer AW, Kabir N, Forscher P (2002a) Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J Cell Biol* 158:139-152.
- Schaefer AW, Kamei Y, Kamiguchi H, Wong EV, Rapoport I, Kirchhausen T, Beach CM, Landreth G, Lemmon SK, Lemmon V (2002b) L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J Cell Biol* 157:1223-1232.
- Schild RF (1970) On the inferior olive of the albino rat. *J Comp Neurol* 140:255-260.
- Schimmelpfeng K, Gogel S, Klambt C (2001) The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration. *Mechanisms of Development* 106:25-36.
- Schoenemann PT, Sheehan MJ, Glotzer LD (2005) Prefrontal white matter volume is disproportionately larger in humans than in other primates. *Nat Neurosci* 8:242-252.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1989) Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338:161-164.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1994) Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and neural cell adhesion molecule (NCAM)-immunoreactivity in development of the forebrain and reproductive system. *Ann Endocrinol (Paris)* 55:235-241.
- Schwartz GA, Kostek C, Bless EP, Ahmad N, Tobet SA (2001) Deleted in colorectal cancer (DCC) regulates the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the basal forebrain. *J Neurosci* 21:911-919.
- Schwartz PM, Levy RL, Borghesani PR, Segal RA (1998) Cerebellar pathology in BDNF $-/-$ mice: the classic view of neurotrophins is changing. *Mol Psychiatry* 3:116-120.
- Schwob JE, Price JL (1984) The development of axonal connections in the central olfactory system of rats. *The Journal of Comparative Neurology* 223:177-202.
- Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10:409-426.
- Seeger MA, Beattie CE (1999) Attraction versus repulsion: modular receptors make the difference in axon guidance. *Cell* 97:821-824.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001-1014.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424.
- Shekarabi M, Kennedy TE (2002) The netrin-1 receptor DCC promotes filopodia formation and cell spreading by activating Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Neurosci* 19:1-17.
- Shekarabi M, Moore SW, Tritsch NX, Morris SJ, Bouchard JF, Kennedy TE (2005) Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion. *J Neurosci* 25:3132-3141.
- Shen Y, Hansel C, Linden DJ (2002a) Glutamate release during LTD at cerebellar climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Nat Neurosci* 5:725-726.
- Shen Y, Mani S, Donovan SL, Schwob JE, Meiri KF (2002b) Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J Neurosci* 22:239-247.
- Shevell MI (2002) Clinical and diagnostic profile of agenesis of the corpus callosum. *J Child Neurol* 17:896-900.
- Shiga T, Oppenheim RW (1991) Immunolocalization studies of putative guidance molecules used by axons and growth cones of intersegmental interneurons in the chick embryo spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* 310:234-252.
- Shinoda Y, Sugiuchi Y, Futami T, Izawa R (1992) Axon collaterals of mossy fibers from the pontine nucleus in the cerebellar dentate nucleus. *J Neurophysiol* 67:547-560.
- Shirasaki R, Katsumata R, Murakami F (1998) Change in chemoattractant responsiveness of developing axons at an intermediate target. *Science* 279:105-107.
- Shirasaki R, Mirzayan C, Tessier-Lavigne M, Murakami F (1996) Guidance of circumferentially growing axons by netrin-dependent and -independent floor plate chemotropism in the vertebrate brain. *Neuron* 17:1079-1088.
- Shirasaki R, Tamada A, Katsumata R, Murakami F (1995) Guidance of cerebellofugal axons in the rat embryo: directed growth toward the floor plate and subsequent elongation along the longitudinal axis. *Neuron* 14:961-972.

- Shu T, Ayala R, Nguyen MD, Xie Z, Gleeson JG, Tsai LH (2004) Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* 44:263-277.
- Shu T, Butz KG, Plachez C, Gronostajski RM, Richards LJ (2003a) Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nfia knock-out mice. *J Neurosci* 23:203-212.
- Shu T, Li Y, Keller A, Richards LJ (2003b) The glial sling is a migratory population of developing neurons. *Development* 130:2929-2937.
- Shu T, Richards LJ (2001) Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum. *The Journal of Neuroscience* 21:2749-2758.
- Shu T, Sundaresan V, McCarthy MM, Richards LJ (2003c) Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline in vivo. *J Neurosci* 23:8176-8184.
- Shu T, Valentino KM, Seaman C, Cooper HM, Richards LJ (2000) Expression of the netrin-1 receptor, deleted in colorectal cancer (DCC), is largely confined to projecting neurons in the developing forebrain. *J Comp Neurol* 416:201-212.
- Silver J (1993) Glia-neuron interactions at the midline of the developing mammalian brain and spinal cord. *Perspect Dev Neurobiol* 1:227-236.
- Silver J, Lorenz SE, Wahlsten D, Coughlin J (1982) Axonal guidance during development of the great cerebral commissures: descriptive and experimental studies, in vivo, on the role of preformed glial pathways. *J Comp Neurol* 210:10-29.
- Silver J, Ogawa MY (1983) Postnatally induced formation of the corpus callosum in acallosal mice on glia-coated cellulose bridges. *Science* 220:1067-1069.
- Simionato E, Barrios N, Duloquin L, Boissonneau E, Lecorre P, Agnes F (2007) The Drosophila RNA-binding protein ELAV is required for commissural axon midline crossing via control of commissureless mRNA expression in neurons. *Dev Biol* 301:166-177.
- Simpson JH, Bland KS, Fetter RD, Goodman CS (2000a) Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* 103:1019-1032.
- Simpson JH, Kidd T, Bland KS, Goodman CS (2000b) Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28:753-766.
- Smith KM, Ohkubo Y, Maragnoli ME, Rasin MR, Schwartz ML, Sestan N, Vaccarino FM (2006) Midline radial glia translocation and corpus callosum formation require FGF signaling. *Nat Neurosci* 9:787-797.
- Snow PM, Bieber AJ, Goodman CS (1989) Fasciclin III: a novel homophilic adhesion molecule in Drosophila. *Cell* 59:313-323.
- Solowska JM, Mazurek A, Weinberger L, Baird DH (2002) Pontocerebellar axon guidance: neuropilin-1- and semaphorin 3A-sensitivity gradients across basilar pontine nuclei and semaphorin 3A variation across cerebellum. *Mol Cell Neurosci* 21:266-284.
- Song H, Poo M (2001) The cell biology of neuronal navigation. *Nature Cell Biology* 3:E81-E88.
- Sonnenfeld MJ, Jacobs JR (1994) Mesectodermal cell fate analysis in Drosophila midline mutants. *Mech Dev* 46:3-13.
- Sotelo C (2002) The chemotactic hypothesis of Cajal: a century behind. *Prog Brain Res* 136:11-20.
- Sotelo C, Bourrat F, Triller A (1984) Postnatal development of the inferior olivary complex in the rat. II. Topographic organization of the immature olivocerebellar projection. *J Comp Neurol* 222:177-199.
- Soussi-Yanicostas N, de Castro F, Julliard K, Perfettini I, Chédotal A, Petit C (2002) Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell* 109:217-228.
- Sperry RW (1963) Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50:703-710.
- Steigemann P, Molitor A, Fellert S, Jackle H, Vorbruggen G (2004) Heparan sulfate proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by slit/robo signaling. *Current Biology* 14:225-230.
- 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.
- Steketee MB, Tosney KW (1999) Contact with isolated sclerotome cells steers sensory growth cones by altering distinct elements of extension. *J Neurosci* 19:3495-3506.
- Stevens A, Jacobs JR (2002) Integrins regulate responsiveness to slit repellent signals. *J Neurosci* 22:4448-4455.
- Stirling RV, Dunlop SA (1995) The dance of the growth cones--where to next? *Trends Neurosci* 18:111-115.
- Stoeckli ET, Landmesser LT (1995) Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14:1165-1179.
- Stoeckli ET, Landmesser LT (1998) Axon guidance at choice points. *Curr Opin Neurobiol* 8:73-79.
- Stoeckli ET, Sonderegger P, Pollerberg GE, Landmesser LT (1997) Interference with axonin-1 and NrCAM interactions unmasks a floor-plate activity inhibitory for commissural axons. *Neuron* 18:209-221.
- Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J (1987) Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327:239-242.
- Strickland P, Shin GC, Plump A, Tessier-Lavigne M, Hinck L (2006) Slit2 and netrin 1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis. *Development* 133:823-832.
- Studer M, Lumsden A, Ariza-McNaughton L, Bradley A, Krumlauf R (1996) Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature* 384:630-634.
- Suchting S, Heal P, Tahtis K, Stewart LM, Bicknell R (2005) Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration. *Faseb J* 19:121-123.

- Sugisaki N, Hirata T, Naruse I, Kawakami A, Kitsukawa T, Fujisawa H (1996) Positional cues that are strictly localized in the telencephalon induce preferential growth of mitral cell axons. *Journal of Neurobiology* 29:127-137.
- Sundaresan V, Roberts I, Bateman A, Bankier A, Sheppard M, Hobbs C, Xiong J, Minna J, Latif F, Lerman M, Rabbitts P (1998) The DUTT1 gene, a novel NCAM family member is expressed in developing murine neural tissues and has an unusually broad pattern of expression. *Molecular and Cellular Neuroscience* 11:29-35.
- Suter DM, Forscher P (2000) Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *Journal of Neurobiology* 44:97-113.
- Suter DM, Pollerberg GE, Buchstaller A, Giger RJ, Dreyer WJ, Sonderegger P (1995) Binding between the neural cell adhesion molecules axonin-1 and Nr-CAM/Bravo is involved in neuron-glia interaction. *J Cell Biol* 131:1067-1081.
- Suzuki SC, Inoue T, Kimura Y, Tanaka T, Takeichi M (1997) Neuronal circuits are subdivided by differential expression of type-II classic cadherins in postnatal mouse brains. *Mol Cell Neurosci* 9:433-447.
- Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, Fujisawa H, Strittmatter SM (1999) Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99:59-69.
- Tamada A, Shirasaki R, Murakami F (1995) Floor plate chemoattracts crossed axons and chemorepels uncrossed axons in the vertebrate brain. *Neuron* 14:1083-1093.
- Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM (1999) Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99:71-80.
- Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17:8313-8323.
- Tan K, Le Douarin NM (1991) Development of the nuclei and cell migration in the medulla oblongata. Application of the quail-chick chimera system. *Anat Embryol (Berl)* 183:321-343.
- Tanaka DH, Maekawa K, Yanagawa Y, Obata K, Murakami F (2006) Multidirectional and multizonal tangential migration of GABAergic interneurons in the developing cerebral cortex. *Development* 133:2167-2176.
- Tanaka E, Ho T, Kirschner MW (1995) The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J Cell Biol* 128:139-155.
- Tanaka EM, Kirschner MW (1991) Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *J Cell Biol* 115:345-363.
- Tanaka T, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Gleeson JG (2004) Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol* 165:709-721.
- Taniguchi H, Tamada A, Kennedy T, Murakami F (2002) Crossing the Ventral Midline Causes Neurons to Change Their Response to Floor Plate and Alar Plate Attractive Cues during Transmedian Migration. *Dev Biol* 249:321.
- Tanno T, Takenaka S, Tsuyama S (2004) Expression and function of Slit1alpha, a novel alternative splicing product for slit1. *J Biochem (Tokyo)* 136:575-581.
- Taylor TD, Robichaux MB, Garrity PA (2004) Compartmentalization of visual centers in the Drosophila brain requires Slit and Robo proteins. *Development* 131:5935-5945.
- Tear G, Harris R, Sutaria S, Kilomanski K, Goodman CS, Seeger MA (1996) commissureless controls growth cone guidance across the CNS midline in Drosophila and encodes a novel membrane protein. *Neuron* 16:501-514.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.
- Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AG, Dodd J, Jessell TM (1988) Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336:775-778.
- Thomas JB, Bastiani MJ, Bate M, Goodman CS (1984) From grasshopper to Drosophila: a common plan for neuronal development. *Nature* 310:203-207.
- Thompson H, Barker D, Camand O, Erskine L (2006a) Slits contribute to the guidance of retinal ganglion cell axons in the mammalian optic tract. *Dev Biol* 296:476-484.
- Thompson H, Camand O, Barker D, Erskine L (2006b) Slit proteins regulate distinct aspects of retinal ganglion cell axon guidance within dorsal and ventral retina. *J Neurosci* 26:8082-8091.
- Tolbert DL, Bantli H, Bloedel JR (1978) Multiple branching of cerebellar efferent projections in cats. *Exp Brain Res* 31:305-316.
- Trousse F, Esteve P, Bovolenta P (2001) Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. *J Neurosci* 21:1292-1301.
- Tsai NP, Bi J, Wei LN (2007) The adaptor Grb7 links netrin-1 signaling to regulation of mRNA translation. *EMBO Journal* 26:1522-1531.
- Van der Want JJ, Wiklund L, Guegan M, Ruigrok T, Voogd J (1989) Anterograde tracing of the rat olivocerebellar system with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). Demonstration of climbing fiber collateral innervation of the cerebellar nuclei. *J Comp Neurol* 288:1-18.
- Van Vactor D (1998) Adhesion and signaling in axonal fasciculation. *Current Opinion in Neurobiology* 8:80-86.
- Vargesson N, Luria V, Messina I, Erskine L, Laufer E (2001) Expression patterns of Slit and Robo family members during vertebrate limb development. *Mech Dev* 106:175-180.
- Vilz TO, Moepps B, Engele J, Molly S, Littman DR, Schilling K (2005) The SDF-1/CXCR4 pathway and the development of the cerebellar system. *Eur J Neurosci* 22:1831-1839.

- Walsh FS, Doherty P (1997) Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in axon growth and guidance. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13:425-456.
- Walter J, Henke-Fahle S, Bonhoeffer F (1987a) Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development* 101:909-913.
- Walter J, Kern-Veits B, Huf J, Stolze B, Bonhoeffer F (1987b) Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development* 101:685-696.
- Wang B, Xiao Y, Ding BB, Zhang N, Yuan X, Gui L, Qian KX, Duan S, Chen Z, Rao Y, Geng JG (2003) Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 4:19-29.
- Wang H, Tessier-Lavigne M (1999) En passant neurotrophic action of an intermediate axonal target in the developing mammalian CNS. *Nature* 401:765-769.
- Wang KH, Brose K, Arnott D, Kidd T, Goodman CS, Henzel W, Tessier-Lavigne M (1999) Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell* 96:771-784.
- Wang L, Dani J, Godement P, Marcus R, Mason C (1995) Crossed and uncrossed retinal axons respond differently to cells of the optic chiasm midline in vitro. *Neuron* 15:1349-1364.
- Wang VY, Rose MF, Zoghbi HY (2005) Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron* 48:31-43.
- Wang Y, Zhang J, Mori S, Nathans J (2006) Axonal growth and guidance defects in Frizzled3 knock-out mice: a comparison of diffusion tensor magnetic resonance imaging, neurofilament staining, and genetically directed cell labeling. *J Neurosci* 26:355-364.
- Ward M, McCann C, DeWulf M, Wu JY, Rao Y (2003) Distinguishing between directional guidance and motility regulation in neuronal migration. *J Neurosci* 23:5170-5177.
- Wassef M, Chedotal A, Cholley B, Thomasset M, Heizmann CW, Sotelo C (1992) Development of the olivocerebellar projection in the rat: I. Transient biochemical compartmentation of the inferior olive. *J Comp Neurol* 323:519-536.
- Watari-Goshima N, Ogura K, Wolf FW, Goshima Y, Garriga G (2007) *C. elegans* VAB-8 and UNC-73 regulate the SAX-3 receptor to direct cell and growth-cone migrations. *Nat Neurosci* 10:169-176.
- Wehrle R, Camand E, Chedotal A, Sotelo C, Dusart I (2005) Expression of netrin-1, slit-1 and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions. *Eur J Neurosci* 22:2134-2144.
- Whitford KL, Marillat V, Stein E, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Chédotal A, Ghosh A (2002) Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron* 33:47-61.
- Whitworth RH, Jr., Haines DE (1986) The inferior olive of *Saimiri sciureus*: olivocerebellar projections to the anterior lobe. *Brain Res* 372:55-71.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18:779-791.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110:385-397.
- Williams SE, Grumet M, Colman DR, Henkemeyer M, Mason CA, Sakurai T (2006) A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. *Neuron* 50:535-547.
- Williams SE, Mann F, Erskine L, Sakurai T, Wei S, Rossi DJ, Gale NW, Holt CE, Mason CA, Henkemeyer M (2003) Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron* 39:919-935.
- Williams SE, Mason CA, Herrera E (2004) The optic chiasm as a midline choice point. *Curr Opin Neurobiol* 14:51-60.
- Willis T (1664). *Cerebri Anatomiae: Cui Accessi Nervorum Descriptio et Usus*. Schagen
- Wills Z, Bateman J, Korey CA, Comer A, Van Vactor D (1999) The tyrosine kinase Abl and its substrate enabled collaborate with the receptor phosphatase Dlar to control motor axon guidance. *Neuron* 22:301-312.
- Winberg ML, Noordermeer JN, Tamagnone L, Comoglio PM, Spriggs MK, Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1998) Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95:903-916.
- Wingate RJ, Hatten ME (1999) The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development* 126:4395-4404.
- Wizenmann A, Thanos S, von Boxberg Y, Bonhoeffer F (1993) Differential reaction of crossing and non-crossing rat retinal axons on cell membrane preparations from the chiasm midline: an in vitro study. *Development* 117:725-735.
- Wolfer DP, Henahan-Beatty A, Stoeckli ET, Sonderegger P, Lipp HP (1994) Distribution of TAG-1/axonin-1 in fibre tracts and migratory streams of the developing mouse nervous system. *J Comp Neurol* 345:1-32.
- Wong K, Ren XR, Huang YZ, Xie Y, Liu G, Saito H, Tang H, Wen L, Brady-Kalnay SM, Mei L, Wu JY, Xiong WC, Rao Y (2001) Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107:209-221.
- Wu JY, Feng L, Park H-T, Havlioglu N, Wen L, Tang H, Bacon KB, Jiang Z-h, Zhang X-c, Rao Y (2001a) The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature* 410:948-952.
- Wu JY, Feng L, Park HT, Havlioglu N, Wen L, Tang H, Bacon KB, Jiang Z, Zhang X, Rao Y (2001b) The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature* 410:948-952.
- Wu W, Wong K, Chen J-h, Jiang Z-h, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (1999) Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400:331-336.
- Xian J, Aitchison A, Bobrow L, Corbett G, Pannell R, Rabbitts T, Rabbitts P (2004) Targeted disruption of the 3p12 gene, *Dutt1/Robo1*, predisposes mice to lung adenocarcinomas and lymphomas with methylation of the gene promoter. *Cancer Res* 64:6432-6437.

- Xian J, Clark KJ, Fordham R, Pannell R, Rabbitts TH, Rabbitts PH (2001) Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the *Dutt1/Robo1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 4:4.
- Xiang M, Gan L, Zhou L, Klein WH, Nathans J (1996) Targeted deletion of the mouse POU domain gene *Brn-3a* causes selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11950-11955.
- Xie Z, Sanada K, Samuels BA, Shih H, Tsai LH (2003) Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell* 114:469-482.
- Yacubova E, Komuro H (2003) Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration. *Cell Biochem Biophys* 37:213-234.
- Yaginuma H, Oppenheim RW (1991) An experimental analysis of in vivo guidance cues used by axons of spinal interneurons in the chick embryo: evidence for chemotropism and related guidance mechanisms. *J Neurosci* 11:2598-2613.
- Yamamoto M, Fujinuma M, Hirano S, Hayakawa Y, Clagett-Dame M, Zhang J, McCaffery P (2005) Retinoic acid influences the development of the inferior olivary nucleus in the rodent. *Dev Biol* 280:421-433.
- Yamamoto M, Zhang J, Smith D, Hayakawa Y, McCaffery P (2003) A critical period for retinoic acid teratogenesis and loss of neurophilic migration of pontine nuclei neurons. *Mech Dev* 120:701-709.
- Yates PA, Roskies AL, McLaughlin T, O'Leary DD (2001) Topographic-specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal map development. *J Neurosci* 21:8548-8563.
- Yee KT, Simon HH, Tessier-Lavigne M, O'Leary DM (1999) Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. *Neuron* 24:607-622.
- Yeo SY, Little MH, Yamada T, Miyashita T, Halloran MC, Kuwada JY, Huh TL, Okamoto H (2001) Overexpression of a Slit homologue impairs convergent extension of the mesoderm and causes cyclopia in embryonic zebrafish. *Dev Biol* 230:1-17.
- Yoshida K, Tobet SA, Crandall JE, Jimenez TP, Schwarting GA (1995) The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. *The Journal of Neuroscience* 15:7769-7777.
- Yoshikawa S, McKinnon RD, Kokel M, Thomas JB (2003) Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* 422:583-588.
- Yu TW, Hao JC, Lim W, Tessier-Lavigne M, Bargmann CI (2002) Shared receptors in axon guidance: SAX-3/Robo signals via UNC-34/Enabled and a Netrin-independent UNC-40/DCC function. *Nat Neurosci* 5:1147-1154.
- Yuan S-SF, Cox LA, Dasika GK, Lee EY-HP (1999a) Cloning and functional studies of a novel gene aberrantly expressed in RB-deficient embryos. *Developmental Biology* 207:62-75.
- Yuan W, Rao Y, Babiuk RP, Greer J, Wu JY, Ornitz DM (2003a) A genetic model for a central (septum transversum) congenital diaphragmatic hernia in mice lacking Slit3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5217-5222.
- Yuan W, Zhou L, Chen J-h, Wu JY, Rao Y, Ornitz DM (1999b) The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Developmental Biology* 212:290-306.
- Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003b) Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol* 5:38-45.
- Yue Y, Grossmann B, Galetzka D, Zechner U, Haaf T (2006) Isolation and differential expression of two isoforms of the ROBO2/Robo2 axon guidance receptor gene in humans and mice. *Genomics*.
- Zallen JA, Yi BA, Bargmann CI (1998) The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in *C-elegans*. *Cell* 92:217-227.
- Zhang J, Smith D, Yamamoto M, Ma L, McCaffery P (2003) The meninges is a source of retinoic acid for the late-developing hindbrain. *J Neurosci* 23:7610-7620.
- Zheng JQ, Felder M, Connor JA, Poo MM (1994) Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* 368:140-144.
- Zhou Q, Anderson DJ (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109:61-73.
- Zhu Y, Khan K, Guthrie S (2003) Signals from the cerebellum guide the pathfinding of inferior olivary axons. *Dev Biol* 257:233-248.
- Zhu Y, Li H-s, Zhou L, Wu JY, Rao Y (1999) Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* 23:473-485.
- Zhu Y, Yu T, Zhang XC, Nagasawa T, Wu JY, Rao Y (2002) Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat Neurosci* 5:719-720.
- Zinn K, McAllister L, Goodman CS (1988) Sequence analysis and neuronal expression of fasciclin I in grasshopper and *Drosophila*. *Cell* 53:577-587.
- 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.

RESUME

Le cerveau des vertébrés est constitué de milliards de neurones agencés de façon symétrique par rapport à la ligne médiane. Les deux régions du système nerveux droite et gauche séparées par cet axe longitudinal sont interconnectées par des faisceaux commissuraux. Une des premières décisions que doit prendre un neurone en migration ou un axone en croissance est de croiser ou non la ligne médiane. Ce processus hautement régulé dépend de leur sensibilité à l'action de plusieurs familles de molécules de guidage, attractives ou répulsives, situées dans cette région. Des recherches menées chez les invertébrés ont conduit à la découverte de plusieurs molécules contrôlant le comportement des axones vis-à-vis de la ligne médiane, dont les molécules sécrétées Slits et leurs récepteurs membranaires Roundabouts (Robos). Nos travaux contribuent à confirmer *in vivo* la conservation de la fonction de ce système de guidage chez les vertébrés.

Ce travail de thèse porte essentiellement sur l'analyse du développement de plusieurs systèmes neuronaux chez les souris déficientes pour un ou plusieurs des gènes *slits* ou *robos*. Il confirme que Robo1 et Robo2 sont essentiels au contrôle exercé par les Slits sur le croisement de la ligne médiane par plusieurs faisceaux d'axones du télencéphale. En l'absence conjointe de ces récepteurs, des défauts de guidage très similaires à ceux décrits chez les souris déficientes en Slit1/Slit2 surviennent. En effet, des projections telles que le tractus olfactif latéral ou les axones corticofuges ne répondent plus à l'effet répulsif des Slits exprimés au niveau médian. Elles se mettent à croiser anormalement la ligne médiane en formant plusieurs commissures ectopiques. Par ailleurs, les axones commissuraux formant le corps calleux ne sont plus canalisés par les Slits à travers la ligne médiane et ne parviennent pas à la franchir correctement.

Nous avons également analysé le développement de plusieurs populations de neurones précérébelleux (NPC) du tronc cérébral. Ces neurones sont tous générés au niveau des lèvres rhombiques dorsales et migrent tangentiellement vers la plaque du plancher formant la ligne médiane ventrale. Leurs axones vont tous la franchir et progresser vers la moitié du cervelet opposée, alors que le comportement de leurs corps cellulaires varie en fonction de la population neuronale considérée : ils vont soit s'arrêter ventralement avant la ligne médiane, soit la croiser. Nous avons démontré que Robo3 (aussi appelé Rig1) coopère avec le système attractif Nétrine1/DCC pour permettre aux NPC de migrer ventralement et franchir la plaque du plancher. Par ailleurs, les Slits exprimés dans cette région agissent en interaction avec Robo1 et Robo2 pour empêcher les neurones du pont en migration longitudinale de venir croiser la plaque du plancher trop précocement ou pour déclencher l'arrêt et le positionnement des neurones olivaires avant la ligne médiane. En revanche, sous l'action de Robo3, l'activité de ces récepteurs répulsifs semble inhibée dans les neurones du noyau réticulaire latéral en migration. Ceci explique que ces derniers aient la capacité de franchir entièrement la plaque du plancher.

Ainsi, ces résultats démontrent, pour la première fois, que le système Slit/Robo contrôle la capacité des neurones à migration tangentielle de croiser ou non la ligne médiane