HAL
open science

Etude des mécanismes moléculaires contrôlant le développement des projections commissurales

Chloé Dominici

To cite this version:

Chloé Dominici. Etude des mécanismes moléculaires contrôlant le développement des projections commissurales. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066382 . tel-01885492

HAL Id: tel-01885492

https://theses.hal.science/tel-01885492

Submitted on 2 Oct 2018

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.

Thèse de doctorat de l'UPMC

Spécialité
Neurosciences

Ecole doctoral Cerveau – Cognition - Comportement

Présentée par
Chloé Dominici

Pour obtenir le grade de Docteur de l'UPMC

Sujet de la thèse :

Etude des mécanismes moléculaires contrôlant le développement des projections commissurales

Sous la direction d'**Alain Chédotal**

Soutenue le 30 Septembre 2016

Devant le jury composé de :
Dr Frédéric Causeret (Rapporteur)
Dr Alain Chédotal (Directeur de thèse)
Dr Patricia Gaspar (Examinatrice)
Dr Fanny Mann (Rapporteur)
Dr Patrick Mehlen (Examinateur)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION **7**

1 Développement du système nerveux central **9**

1.1 Différenciation cellulaire 9

1.1.1 Les motoneurones *11*

1.1.2 Les commissures cérébrales *19*

1.1.3 La barrière du système nerveux central *27*

1.2 Visualisation des cellules du système nerveux central 29

1.2.1 La transparisation à base de solvants *30*

1.2.2 La transparisation à base de solutions aqueuses *32*

1.2.3 Imager les échantillons transparents *37*

2 Les molécules de guidage axonal **37**

2.1 Les Nétrines 37

2.1.1 Découverte de la Nétrine-1 ..... *39*

2.1.2 Organisation génétique et structure protéique des différentes Nétrines *41*

2.1.3 Les récepteurs de la Nétrine-1 ..... *43*

2.1.4 Rôle de la Nétrine-1 au cours du développement *49*

2.1.5 Conclusion *63*

2.2 Slit et Robo 63

2.2.1 Slit : une molécule répulsive de la plaque du plancher *64*

2.2.2 Les récepteurs Robo *66*

2.2.3 Guidage axonal par Slit et Robo *67*

2.2.4 Rôle de Slit/Robo dans la migration cellulaire *75*

2.2.5 Rôle des fragments protéolytiques de Slit *79*

2.2.6 Robo3 un outil génétique dans l'étude des commissures cérébrales *80*

RESULTATS **81**

Article 1 : en préparation **83**

Article 2 : en préparation **85**

1 L'attraction à la ligne médiane **89**

DISCUSSION 87

1.1 Quels sont les signaux attirant les axones commissuraux ? 89

1.1.1 Shh, un attractant complémentaire de la Nétrine-1 ? 89

1.1.2 Le Vegf à la plaque du plancher 91

1.1.3 Quel est le rôle de la plaque du plancher ? 93

1.1.4 Un trajet aléatoire des axones ? 93

1.2 Rôle de la Nétrine-1 au cours du développement 94

1.2.1 Rôle de la Nétrine-1 à la plaque du plancher 94

1.2.2 La Nétrine-1 dans la glie radiaire et la lame basale 96

1.2.3 Quel est le mode d'action de la Nétrine-1 ? 100

2 La répulsion à la ligne médiane 101

2.1 Robo1 et Robo2 sont-ils les seuls récepteurs des Slits ? 102

2.1.1 Guidage des neurones du pont 104

2.1.2 Phénotypes chez les KO : un défaut secondaire ? 105

3 Conclusions 107

3.1 Moelle épinière 107

3.2 Les noyaux précérébélleux 107

ANNEXES 111

Article 3 : en préparation 113

Article 4 115

BIBLIOGRAPHIE 117

Liste des abréviations

BMP : Bone morphogenetic protein

DAO : Olive accessoire dorsale

DREZ : Dorsal root entry zone

DRG : Dorsal root ganglion

DSCAM : Down-syndrome adhesion molecule

ECN : Noyau cunéiforme externe

EGF : Epidermal growth factor

EXT1 : Exostosin-1

FN : Fibronectine

GDF-7 : Growth differentiation factor 7

GFP : Green fluorescent protein

GPI : glycosylphosphatidylinositol

HGPPS : syndrome de paralysie du regard horizontal avec scoliose progressive

HMC: colonne motrice hypaxiale

Ig : Immunoglobuline

IMF : Funicule intermédiaire

ION : Noyau de l'olive inférieure

IPN : Noyau interpédonculaire

KO : Knockout

LMC : Colonne motrice latérale

LMF : Funicule latéral

LRN : Noyau réticulaire latéral

LRR : Leucine-rich repeats

MAO : Olive accessoire médiane

MEP : Motor exit point

MLF : Funicule médian

MMC : Colonne motrice médiale

MN : Motoneurones

MNd : Motoneurones dorsaux

MNv : Motoneurones ventraux

OI : Olive inférieure

PCR2 : Polycomb repressive complex 2

PGC : Colonne préganglionique

pMN : Motor neural progenitor cells

PN : Noyau pontin

PO : Olive principale

RGM : Repulsive guidance molecule

Robo : Roundabout

SHH : Sonic Hedgehog

SNC : Système nerveux central

TDE : 2,20-thiodiethanol

THF : Tétrahydrofurane

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Introduction

1 Développement du système nerveux central

Les fonctions du cerveau proviennent d'intégrations d'activités précises de différentes structures neurales. Les informations vitales données par le cerveau sont dépendantes du développement de multiples sous régions anatomiques, chacune ayant des spécificités cellulaires et fonctionnelles.

Le système nerveux (SN) est un dérivé ectodermique qui se met en place dès la fin de la gastrulation, sous forme d'un épaississement, la plaque neurale, qui apparaît dans la région dorsale moyenne de l'embryon. La plaque neurale se creuse rapidement en gouttière neurale puis les deux rebords s'élèvent pour se rapprocher l'un de l'autre jusqu'à fusionner dorsalement et former le tube neural. Par la suite, l'axe dorso-ventral est mis en place par l'action de signaux dorso-ventraux et induit ainsi la différenciation cellulaire de cellules souches situées dans la zone ventriculaire du tube neural. Dans cette première partie, nous décrirons le développement des systèmes étudiés dans ce manuscrit.

1.1 Différenciation cellulaire

Dès la fermeture du tube neural, l'identité cellulaire composant le SNC est établie sous l'influence coordonnée de gradients de morphogènes dorsaux ventraux : Bone morphogenetic protein (BMP) et Sonic Hedgehog (SHH) respectivement. Les cellules souches situées dans la zone ventriculaire se différencient et donnent naissance aux cellules gliales et aux neurones. Ces interactions de signaux résultent dans l'établissement de quatre zones longitudinales fondamentales : la plaque du plancher, la plaque basale, la plaque alaire et la plaque du toit (Figure 1). L'ensemble du SNC partage ce plan d'organisation dorso-ventral indépendamment de la position antéro-postérieure. Dans la moelle épinière de la souris, la mise en place de ces zones s'effectue entre E9 et E11 (Liem et al., 1997, 2000; Marcelle et al., 1997). Les neurones produits au niveau de la zone ventriculaire migrent vers la surface piale le long des prolongements des cellules de la glie radiaire. Le gradient de SHH, produit par la notochorde et la plaque du plancher, spécifie l'identité de cinq types de progéniteurs ventraux : p0, p1, p2, pMN et p3. Dorsalement, les gradients des morphogènes BMP4/6/7, GDF7 et WNT permettent la mise en place

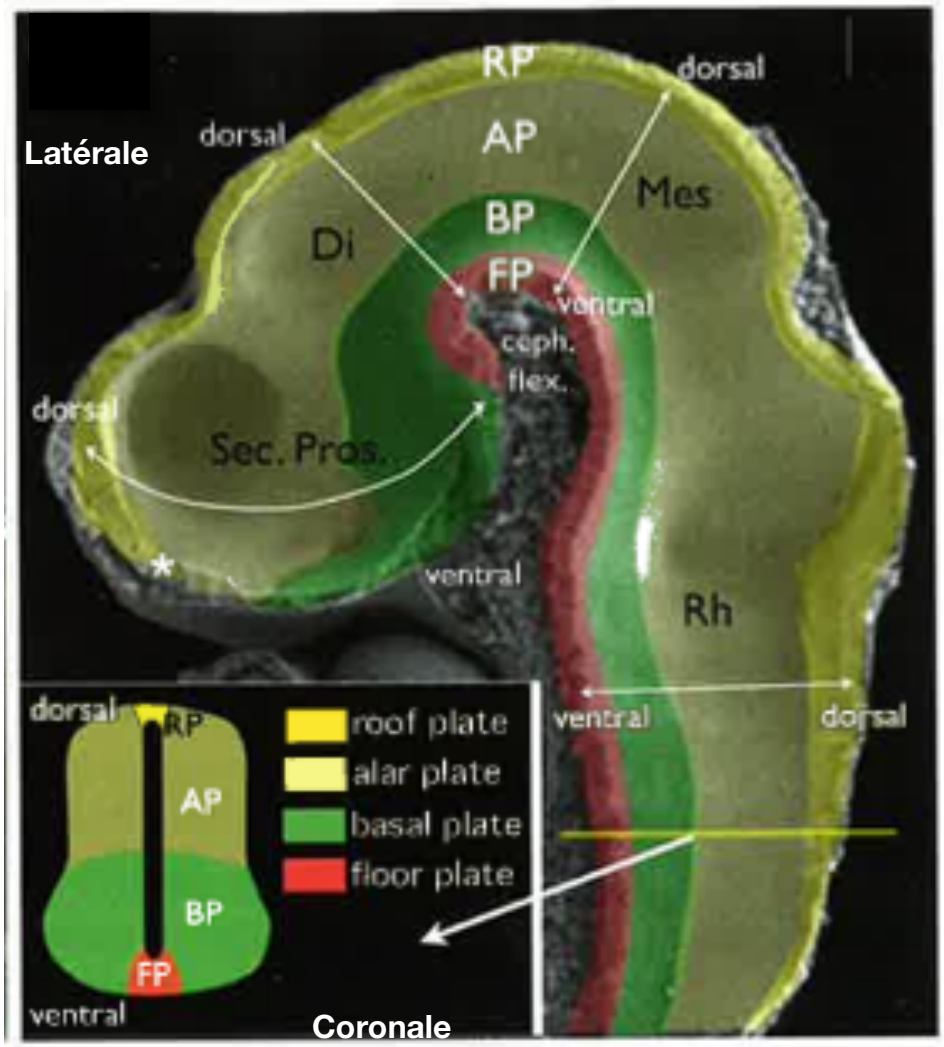


Figure 1: Organisation du système nerveux central
Vue latérale et coronale d'un embryon de souris E9,5 au microscope électronique. RP : Roof Plate (plaque tu toit) ; AP : Alar Plate (plaque alaire) ; BP : Basal Plate (plaque basale) ; FP : Floor Plate (plaque du plancher). Di : Diencéphale ; Mes : Mésencéphale; Rh : Rhombencéphale
(Martínez et al., 2012)

six domaines de progéniteurs dorsaux appelés : dP1, dP2, dP3, dP4, dP5 et dP6 (pour revue: Alaynick, Jessell, & Pfaff, 2011) (Figure 2).

Le tronc cérébral, est quant à lui très clairement organisé selon un axe antéro-postérieur et divisé en segments, appelés «rhombomères », (Lumsden and Keynes, 1989). On compte huit rhombomères qui possèdent chacun une identité cellulaire et moléculaire (notamment l'expression de combinaison de facteurs de transcription) unique (Figure 3).

Les progéniteurs expriment différents facteurs de transcription tout au long de leur différenciation afin de donner naissance à des sous types de neurones et d'interneurones ayant des fonctions spécifiques et exprimant des protéines (récepteurs, canaux etc.) qui leur sont propres. Les progéniteurs pMN donnent naissance aux motoneurones spinaux localisés dans la partie ventro-latérale de la moelle épinière. Les autres progéniteurs se différencient en neurones projetant du côté ipsilatéral et d'autres projetant du côté controlatéral appelés neurones commissuraux. Les commissures cérébrales connectent les parties droite et gauche du SNC. Dans la moelle épinière et le tronc cérébral les axones des neurones commissuraux croisent à la plaque du plancher puis la traversent. Cette dernière est une structure non neuronale composée de cellules gliales. Elle exprime une grande quantité de molécule intervenant dans la différenciation cellulaire ainsi que le guidage des axones commissuraux (Charron et al., 2003; Kennedy et al., 1994; Ruiz de Almodovar et al., 2011). L'ensemble des commissures de la moelle épinière et du tronc cérébral expriment le récepteur Robo3 (Marillat et al., 2004; Sabatier et al., 2004; Yuan et al., 1999). Les neurones commissuraux dorsaux relaient l'information somato-sensorielle tandis que les neurones commissuraux ventraux font partie du circuit moteur projetant vers les motoneurones ou d'autres interneurones (Goulding, 2009; Vallstedt and Kullander, 2013).

1.1.1 Les motoneurones

Les motoneurones (MN) transmettent l'information motrice du SNC aux organes périphériques et aux muscles pour établir un contrôle autonome des fonctions viscérales et pour coordonner les mouvements musculo-squelettiques respectivement. Ils sont situés dans la moelle épinière, le tronc cérébral et le

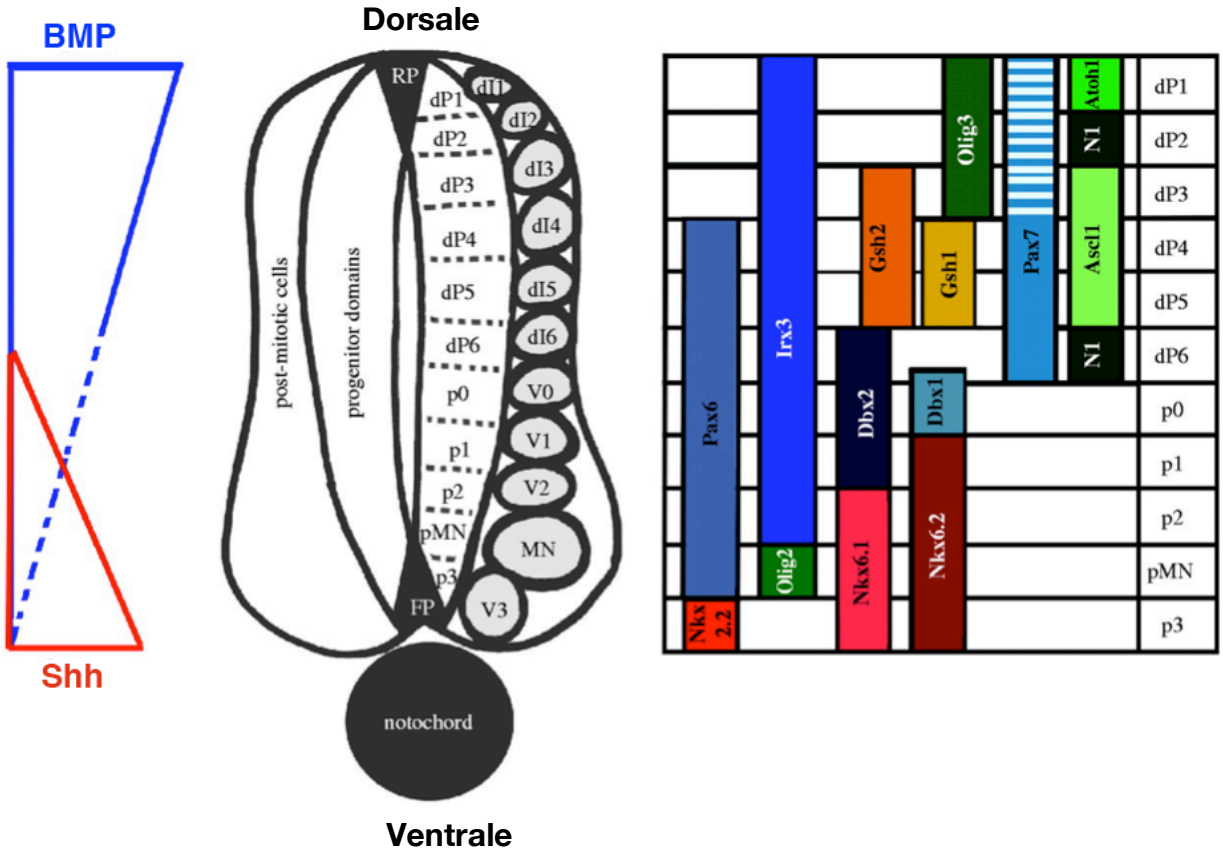


Figure 2: *Patterning* de la moelle épinière
Les progéniteurs de la moelle épinière se différencient sous l'influence d'un gradient de Shh (ventral) et BMP (dorsal). Ils mettent en place cinq types de progéniteurs ventraux : p0, p1, p2, pMN, p3 et six domaines de progéniteurs dorsaux : dP1, dP2, dP3, dP4, dP5, dP6. Les progéniteurs se différencient en neurones (V0, V1, V2, MN; V3, dI1, dI2, dI3, dI4, dI5, dI6) identifiés par l'expression de facteurs de transcription spécifiques.
(Lewis, 2006)

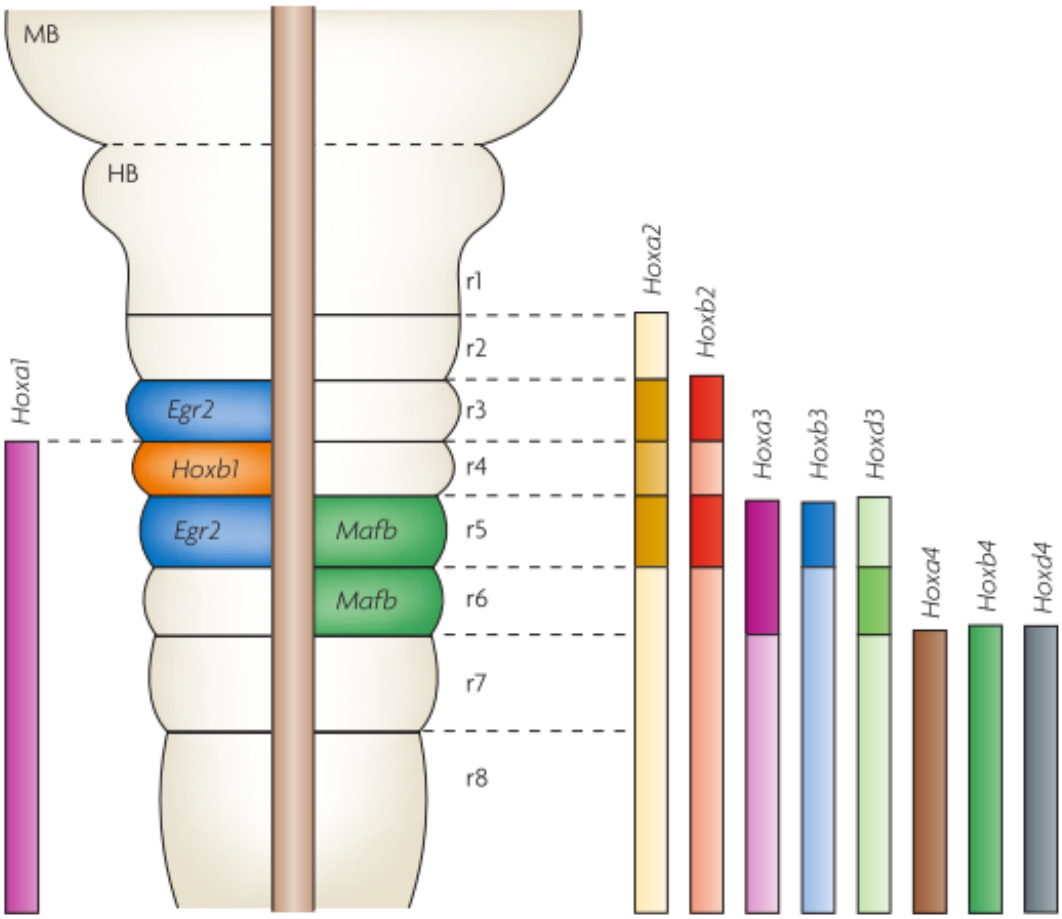


Figure 3: Expression des différents facteurs de transcription dans le tronc cérébral
Schéma d'un tronc cérébral de souris montrant les domaines d'expression de l'ARNm des gènes *Hox, Egr2* (ou *Krox20*) et *Mafb* (ou *Kreisler)* dans les différents rhombomères (r) du tronc cérébral d'un embryon de souris à E11,5. Les barres verticales représentent les domaines d'expression des gènes *Hox*. Les parties les plus sombres indiquent des niveaux d'expression plus élevés. MB : midbrain (mésencéphale) ; HB : hindbrain (tronc cérébral).
(Guthrie, 2007)

mésencéphale et peuvent être regroupés selon la position de leurs corps cellulaires et la trajectoire que suivent leurs axones pour sortir du SNC. Un sous type de MN appelé motoneurones dorsaux (MNd) migre pour se localiser dorsalement et projeter par un point de sortie dorsal. A l'opposé, les motoneurones ventraux (MNv) restent dans la partie ventrale et empruntent un point de sortie ventral (Lumsden and Keynes, 1989) (Figure 4a). Les motoneurones dorsaux et ventraux peuvent ensuite être distingués suivant les muscles qu'ils innervent : somatiques ou viscéraux. Dans le tronc cérébral les motoneurones sont séparés en une série de noyaux, à l'inverse, dans la moelle épinière ils forment des colonne discontinues le long de l'axe rostro-caudal. A l'intérieur d'une même colonnes les motoneurones innervant un même muscle sont organisés en *pool* possédant des propriétés moléculaires et morphologiques qui leurs sont propres (Landmesser L, 1978; Landmesser and Pilar, 1978; Vanderhorst and Holstege, 1997) (Figure 5).

1.1.1.1 Les motoneurones crâniens

Les MN crâniens sont situés dans le tronc cérébral et le mésencéphale, ils commencent à se mettre en place à E11 chez la souris. Leurs cellules cibles se situent du côté ipsilatéral à l'exception du nerf trochléaire dont les axones croisent la ligne médiane. Ils sont caractérisés par leur position axiale mais aussi par les muscles qu'ils innervent.

Les motoneurones somatiques innervent les muscles squelettiques et contrôlent le mouvement des yeux et de la langue. Ils comprennent le noyau oculomoteur (III), le trochléaire (IV), l'abducens (VI), et l'hypoglosse (XII). Les motoneurones viscéraux innervent les ganglions du système nerveux autonome qui innervent les glandes lacrymales et salivaires, les muscles lisses ainsi que les glandes du système pulmonaire, cardiovasculaire et gastro-intestinal. Ils comprennent les motoneurones du noyau facial (VII), du noyau glossopharyngien (IX) et du noyau du nerf vague (X). Pour finir, les motoneurones branchiomoteurs innervent les muscles branchiaux qui contrôlent les mouvements de la mâchoire, de la face, du larynx et du pharynx. Ils regroupent les noyaux du trijumeau (V), du noyau facial (VII) et le noyau spinal accessoire (XI) (Figure 4b,c). Hormis les motoneurones oculomoteurs situés dans le mésencéphale, l'ensemble des nerfs crâniens est positionné dans le tronc cérébral.

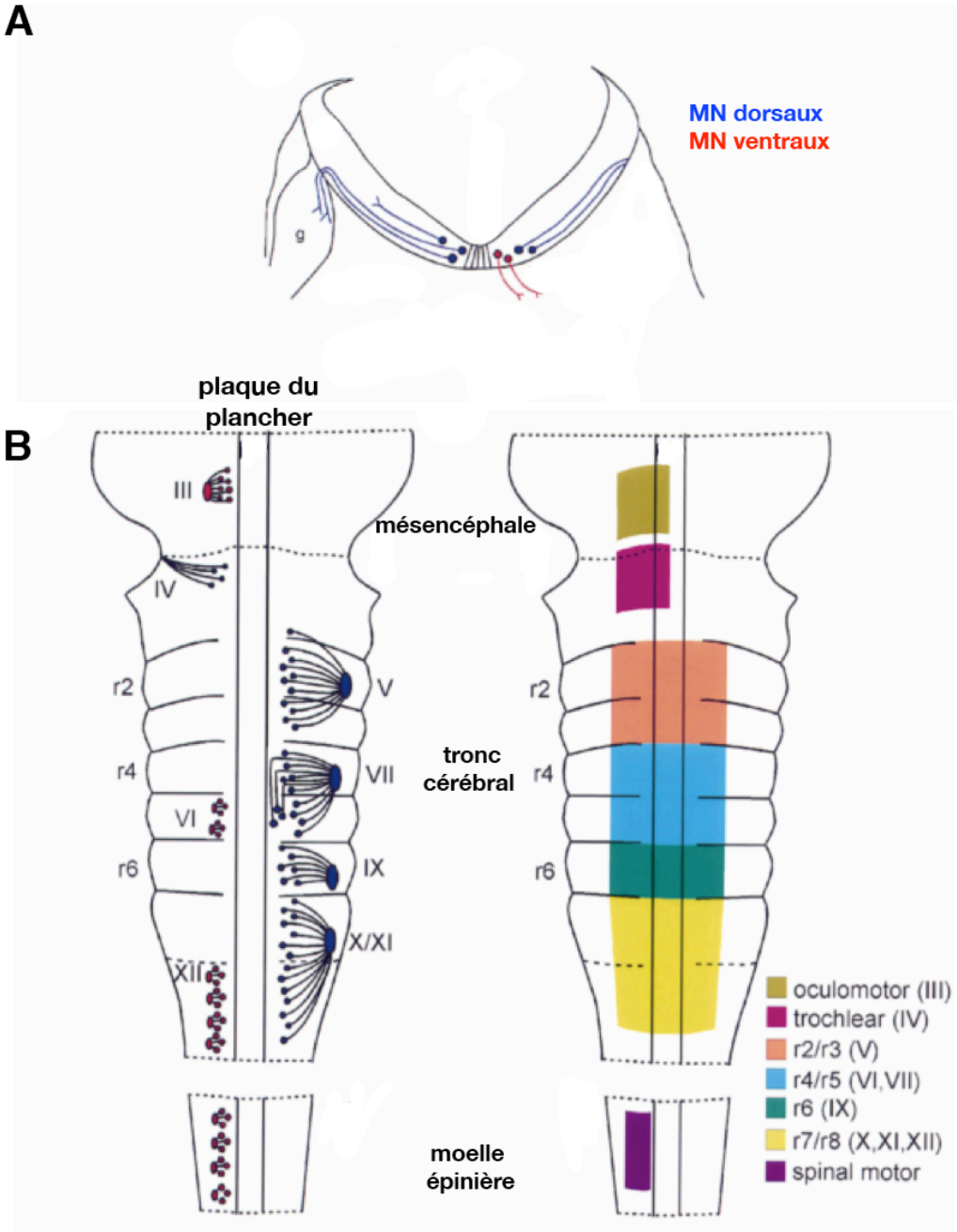


Figure 4 : Organisation des motoneurones crâniens dans le tronc cérébral

(A) Schéma d'une coupe coronale du tronc cérébral d'un embryon de souris montrant le trajet les axones des motoneurones ventraux (rouge) et dorsaux (bleu). g : ganglion trijumeau.

(B) Schéma d'une vue dorsale du tronc cérébral et moelle épinière d'un embryon de souris montrant les motoneurones ventraux (gauche) et les motoneurones dorsaux (droite).

(C) Schéma d'une vue dorsale du tronc cérébral et moelle épinière d'un embryon de souris montrant la localisation des noyaux moteurs dans les différents rhombomères (r). III : oculomoteur ; IV : trochléaire ; V : trijumeau ; VI : abducens ; VII : facial ; IX : glossopharyngien ; X : vague ; XI : accessoire ; XII : hypoglosse.

(Varela-Echavarría et al., 1997)

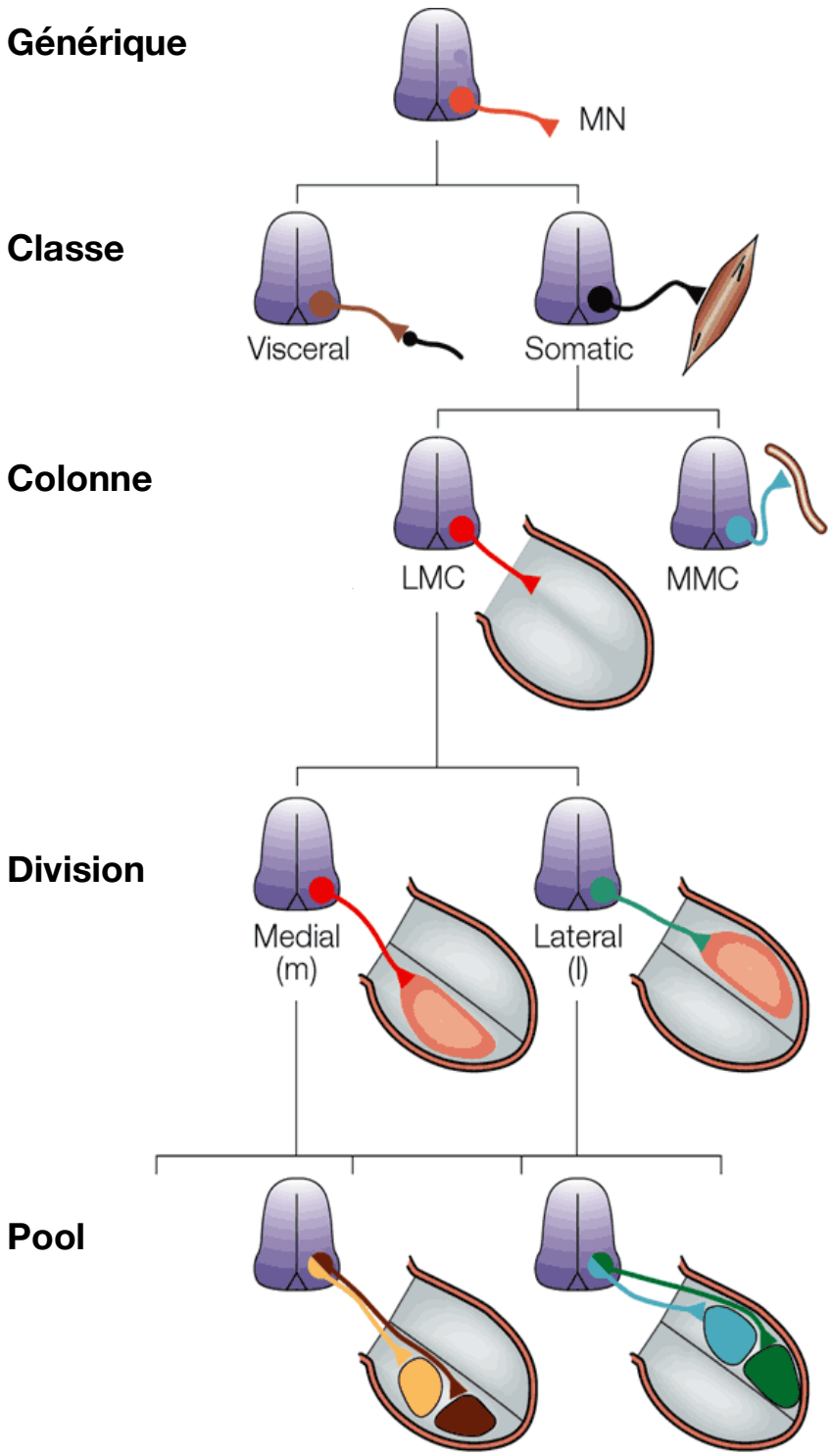


Figure 5 : Hiérarchie de l'identité des motoneurones
Les sous types de MN sont organisés en fonction de la position de leur corps cellulaire et la projection de leurs axones. Les MN peuvent être viscéraux ou somatiques (Class). Ils forment des colonnes discontinues le long de l'axe rostro-caudal, parmi elles, la colonne motrice latérale (LMC) et la colonne motrice médiale (MMC). A l'intérieur même d'une colonne motrice les MN peuvent être subdivisés en fonction de la localisation de leurs corps cellulaire (médian ou latéral). Les MN sont organisés en pool en fonction des muscles qu'ils innervent.

(Jessell, 2000a).
Les motoneurones viscéraux et branchiomoteurs sont des motoneurones dorsaux. Les motoneurones somatiques sont des motoneurones ventraux à l'exception des motoneurones du trochléaire dont les axones empruntent une sortie dorsale.
Les motoneurones crâniens peuvent aussi être distingués par les facteurs de transcriptions qu'ils expriment. Pour exemple, les motoneurones somatiques expriment les facteurs de transcription *Hb9, Islet1, Ilset2, Lhx3* et *Lhx4.* Les motoneurones branchiomoteurs et viscéraux expriment quant à eux *Islet1, Phox2a, Phox2b* et *Tbx20.*

1.1.1.2 Les motoneurones spinaux

Contrairement aux MN crâniens, les MN spinaux forment des colonnes discontinues le long de la moelle épinière. Ils sont composés de MN ventraux et ne contiennent que des MN somatiques et viscéraux (Stifani, 2014). Les motoneurones proviennent des progéniteurs ventraux pMN et commencent à se mettre en place à E9,5 (Alaynick et al., 2011; Jessell, 2000a).
Les MN de la moelle épinière sont regroupés en colonnes et en groupes. Chaque colonne occupe une position définie le long de l'axe rostro-caudal. Il existe quatre colonnes qui innervent des cibles périphériques spécifiques. La colonne motrice latérale (LMC) se situe au niveau des membres et innerve leurs muscles. Les MN de la LMC peuvent être dissociés en deux sous types : les MN latéraux qui projettent dorsalement et innervent les muscles extenseurs et les MN médians qui projettent ventralement pour innerver les muscles fléchisseurs (Landmesser L, 1978; Tosney and Landmesser, 1985). La colonne motrice médiale (MMC) qui innerve les muscles dorsaux est présente tout le long de la moelle épinière (Fetcho, 1987; Gutman et al., 1993). La colonne motrice hypaxiale (HMC) se situe au niveau thoracique et innerve les muscles intercostaux et abdominaux tandis que la colonne préganglionique (PGC) est composée de MN viscéraux dans la partie thoracique et innerve les ganglions sympathiques (Gutman et al., 1993; Prasad and Hollyday, 1991) (Figure 6).

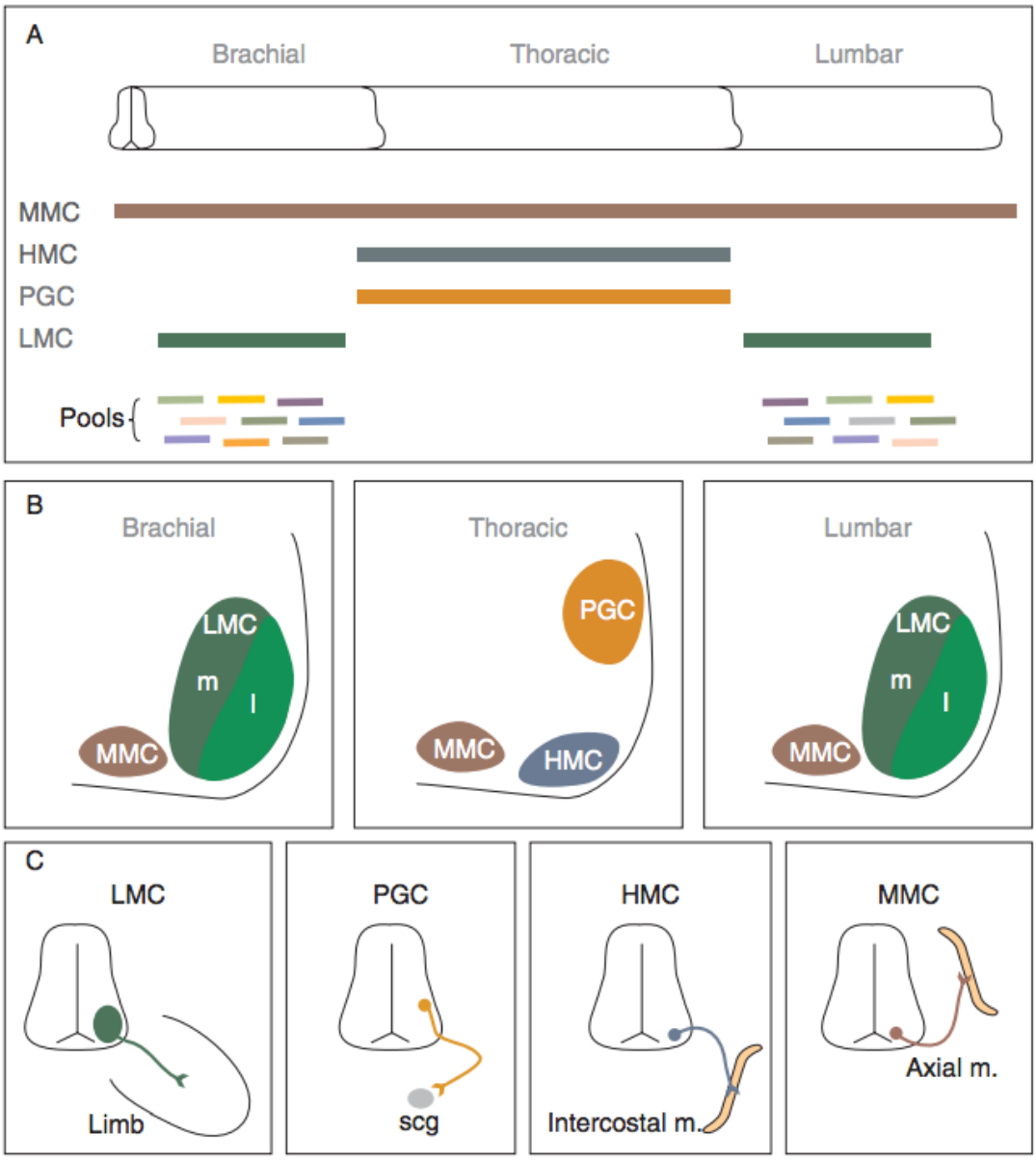


Figure 6 : Organisation des motoneurones spinaux

(A) Schéma d'une moelle épinière de souris montrant la localisation des colonnes motrices le long de l'axe antéro-postérieur. MMC : colonne motrice médiale ; HMC : colonne motrice hypaxiale ; PGC : colonne préganglionique ; LMC : colonne motrice latérale. Les pools de motoneurones sont générés rostro-caudalement dans la moelle épinière.

(B) Schémas de coupes coronales au niveau brachial, thoracique et lombaire montrant la position des colonnes motrices et la subdivision de la LMC médiale (m) et latérale (l).

(C) Trajet des projections des motoneurones à l'intérieur d'une colonne motrice. Les neurones de la LMC projettent dans les membres, les neurones de la PGC dans les ganglions de la chaine sympathique (scg), les neurones de la HMC dans les muscles (m) intercostaux et les neurones de la MMC dans les muscles axiaux.

(Dasen and Jessell, 2009)

1.1.2 Les commissures cérébrales

1.1.2.1 Axones commissuraux de la moelle épinière

Les neurones commissuraux de la moelle épinière projettent leurs axones ventralement tout d'abord à proximité de la surface piale. Ils se détachent de la surface de la moelle épinière lorsqu'ils atteignent la colonne motrice (qui à ce stade de développement est sous la forme d'une masse cellulaire distincte) pour atteindre la plaque du plancher. Une fois la ligne médiane croisée, leurs axones tournent pour projeter longitudinalement vers l'avant ou l'arrière de la moelle épinière (Wentworth, 1984).

1.1.2.2 Le système précérébelleux

Le terme précérébelleux est utilisé pour désigner un ensemble de noyaux envoyant leurs axones principalement, voir exclusivement, vers le cervelet (Sotelo, 2004). Ce dernier trouve son origine dans le rhombomère 1 du tronc cérébral (Wingate and Hatten, 1999). Il joue un rôle crucial dans le contrôle et la planification des mouvements. Le cervelet est considéré comme un régulateur de la fonction motrice plutôt qu'un exécuteur de celle-ci : il contribue à la coordination et à la synchronisation des gestes et à la précision des mouvements. En plus de sa fonction motrice, le cervelet joue un rôle dans le processus cognitif (Middleton and Strick, 1994).

Le système précérébelleux est composé de quatre populations de neurones : le noyau réticulaire latéral (LRN), noyau cunéiforme externe (ECN), le noyau pontin (PN) et le noyau de l'olive inférieure (ION) (Figure7a-c). Tous sont issus de progéniteurs situés dans les lèvres rhombiques qui occupent la région dorsale des bords du quatrième ventricule (voir le paragraphe suivant). Les neurones précérébelleux post-mitotiques migrent tous de manière tangentielle (c'est à dire parallèlement à la surface du tronc cérébral) en direction de la ligne médiane ventrale.

Les neurones précérébelleux sont tous excitateurs. Le LRN, l'ECN et le PN sont connectés aux cellules granulaires du cervelet et leurs terminaisons forment les fibres moussues (Zhan and Ryugo, 2007). Les afférences de l'ION innervent les cellules de Purkinje et la partie terminale de leur axone est appelée fibre grimpante

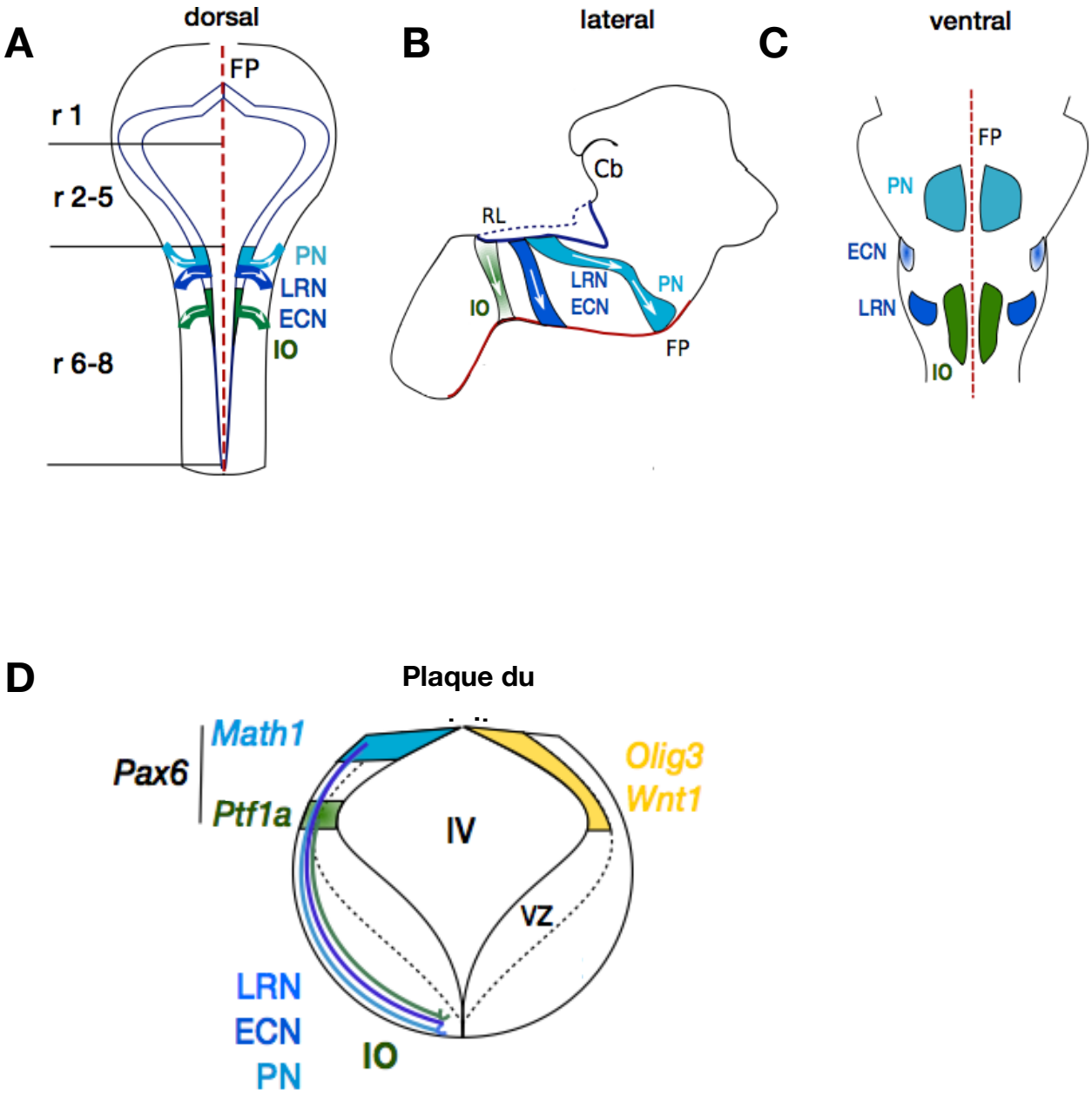


Figure 7 :
(A-C) Voie de migration des neurones précérébelleux.
Schémas d'une vue dorsale (A), latérale (B) et ventrale (C) du tronc cérébral d'embryon de souris. FP : plaque du plancher ; r : rhombomère ; Cb : cervelet.
(D) Expression des facteurs de transcription dans les lèvres rhombiques
Schéma d'une coupe coronale d'embryon de souris montrant l'expression des principaux facteurs de transcription exprimés dans les progéniteurs des neurones précérébelleux. *Olig3* et *Wnt1* sont largement exprimés dans les lèvres rhombiques. *Math1* et *Ptf1a* sont exprimés en amont de *Pax6*. VZ : zone ventriculaire ; IV : quatrième ventricule

(Sotelo et al., 1975). Tous les axones provenant des neurones précérébelleux envoient également des branches collatérales vers les noyaux profonds, qui sont les seuls neurones cérébelleux à projeter en dehors du cervelet (Wiklund et al., 1990).

Le développement des lèvres rhombiques

Durant le développement, les lèvres rhombiques bordent la partie dorsale du quatrième ventricule du tronc cérébral et sont la source de divers types de neurones tels que les neurones précérébelleux et les cellules granulaires du cervelet. Chez la souris, les lèvres rhombiques sont mitotiquement actives entre E10-E17 générant une grande variété de neurones. Des études génétiques et anatomiques ont pu révéler l'ensemble des facteurs de transcription contrôlant la différenciation des progéniteurs des lèvres rhombiques. L'origine du terme lèvre rhombique provient du travail de Wilhelm His (His, 1890) qui décrivit la forme rhomboïde de l'ouverture du tronc cérébral dorsal chez des embryons humains. D'après les observations du flux tangentiel des neurones des lèvres rhombiques jusqu'au tronc cérébral ventral, His et son collègue neuroanatomiste Charles Essick (Essick, 1912) proposèrent que les noyaux ventraux du tronc cérébral, incluant les noyaux précérébelleux, trouvaient leurs origines dorsalement durant le développement. D'autres études anatomiques utilisant des marquages isotopiques chez le rat suivirent (Altman and Bayer, 1987). Des preuves expérimentales ont permis par la suite de prouver l'origine dorsale des noyaux précérébelleux grâce à l'ablation des lèvres rhombiques chez le poulet (Harkmark, 1954) et chez des chimères caille-poulet chez lesquelles le neuroépithélium de caille a été transplanté et tracé chez un embryon de poulet (Tan and Douarin, 1991; Wingate and Hatten, 1999). L'ensemble de ses résultats permis de décrire pour la première fois la migration dorso-ventral des neurones précérébelleux pendant de développement. De plus, ces résultats ont permis de relier les différents domaines des lèvres rhombiques avec la segmentation rhombomérique du tronc cérébral. Chez la souris, le cervelet est issu du rhombomère 1 (lèvres rhombiques supérieures) (Wingate and Hatten, 1999) et les neurones précérébelleux sont issus des rhombomères 6 à 8 (lèvres rhombiques inférieures) (Farago et al., 1980; Okada et al., 2007). Grâce à l'avancée de la génétique moléculaire, il a été possible d'identifier les différentes populations

neuronales composant les neurones précérébelleux (Dymecki and Tomasiewicz, 1998; Zinyk et al., 1998). *Olig3* et le facteur de transcription le plus largement exprimé, il est important pour la formation de tous les noyaux précérébelleux et délimite ainsi le territoire des lèvres rhombiques (Figure 7d). La dissection moléculaire de compartiments distincts des lèvres rhombiques permis de mettre en évidence l'expression de *Wnt1* sous forme de gradient dorso-ventral (Rodriguez and Dymecki, 2000). Ce dernier n'est pas exprimé dans l'ensemble des progéniteurs des lèvres rhombiques, pointant ainsi l'existence d'autres subdivisions génétiques. Le facteur de transcription *Math1 (Atoh1)* est exprimé très précocement dans les lèvres rhombique à partir de E9,5 (Akazawa et al., 1995) et permet la spécification des cellules des fibres moussues projetant à l'intérieur du territoire *Wnt1* ventral. En son absence, toutes les fibres moussues sont incapables de se mettre en place générant ainsi des défauts secondaires de l'olive inférieure (Bermingham et al., 2001; Machold and Fishell, 2005; Wang et al., 2005). La formation de l'olive inférieure est dépendante de l'expression de *Ptf1a* et de *Olig3* dans les progéniteurs des lèvres rhombiques (Liu et al., 2008; Storm et al., 2009; Yamada et al., 2007a). Pour finir, le facteur de transcription *Pax6* agit en amont afin de réguler les domaines des progéniteurs *Math1* et *Ptf1a* (Landsberg et al., 2005).

L'olive inférieure

L'olive inférieure (OI) est située dans la partie la plus caudale du tronc cérébral, juste au dessus du faisceau corticospinal. Elle reçoit des projections en provenance de structures variées, notamment la moelle épinière, le noyau rouge, le colliculus supérieur, le cortex et les noyaux profonds du cervelet. L'olive inférieure projette sur les cellules de Purkinje du cervelet controlatéral via le pédoncule cérébelleux inférieur. Les précurseurs des neurones olivaires sont générés entre E9-E11 et expriment le facteur de transcription *Ptf1a* (Pancreas specific transcription factor, 1a) (Yamada et al., 2007b). Les neurones olivaires migrent vers la plaque du plancher mais ne la franchissent pas et seuls leurs axones se projettent vers le cervelet controlatéral. Durant leur migration, les neurones olivaires expriment différents facteurs de transcription tel que *Foxp2* (Lai, 2003) et Brn3b (Bloch-Gallego et al., 1999; Fedtsova and Turner, 1995).

Chez tous les vertébrés, l'olive inférieure est subdivisée en trois sous noyaux principaux : l'olive accessoire médiane (MAO), l'olive accessoire dorsale (DAO) et l'olive principale (PO) (Azizi and Woodward, 1987) (Figure 8a). D'autres subdivisions anatomiques, de taille et de morphologie variables selon les espèces, ont été identifiées : la MAO est composée de trois sous noyaux a, b et c, d'un noyau β et d'un capuchon dorsal, la P0 est composée de lamelles dorsales et ventrales (Azizi and Woodward, 1987). Il a été montré que les neurones des différents sous-noyaux olivaires naissent à des âges spécifiques (Bourrat and Sotelo, 1991) qu'ils expriment des combinaisons uniques de protéines (Wassef et al., 1992) et qu'ils se projettent sur des groupes distincts de cellules de Purkinje, regroupés en bandes ou zones sagittales (Buisseret-Delmas and Angaut, 1993). Il semble donc exister un lien entre la date de naissance des neurones olivaires dans les lèvres rhombiques et l'organisation topographique de leurs projections.

Les neurones pontiques

Le pont (PN) est la plus grande source de fibres moussues chez les mammifères (Brodal and Bjaalie, 1992) et un relais essentiel entre le cortex et le cervelet. Les afférences du PN trouvent leur origine dans les aires motrices, prémotrices, somato-sensorielles et visuelles du cortex ipsilatéral. Le pont reçoit aussi des informations d'afférences subcorticales, principalement de structures impliquées dans les voies visuelles telles que le tectum et le colliculus supérieur. Pour finir, il reçoit des projections issues des noyaux profonds du cervelet. Les efférences du PN sont principalement controlatérales (Serapide et al., 2002) et atteignent le cervelet via le pédoncule cérébelleux moyen. Chez la souris, la migration des neurones du pont s'effectue en plusieurs étapes entre E13,5 et E17,5 (Wang et al., 2005). Dans un premier temps, les neurones entreprennent une courte migration ventrale dans les rhombomères 6 à 8 (étape 1). Puis, les neurones du pont migrent rostralement, le long de l'axe antéro-postérieur (étape 2). Durant cette étape, les neurones traversent les rhombomères 4 et 5 et passent ainsi au dessus du noyau moteur du nerf facial (VII). Ils continuent leur migration dans le rhombomère 3 jusqu'à la racine du nerf trijumeau (V). C'est à ce niveau (étape 3) que les neurones pontins changent soudainement de direction pour migrer ventralement jusqu'à la plaque du plancher

A

B

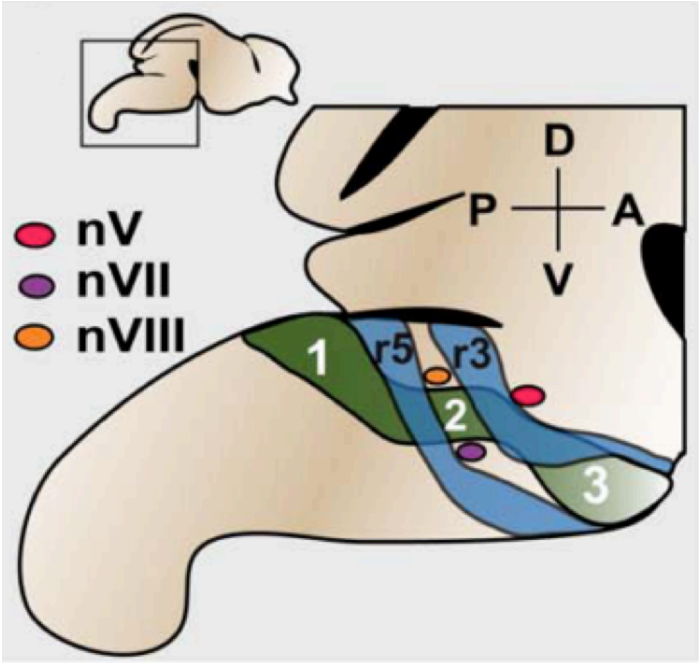


Figure 8 :
(A) Subdivision des différents noyaux olivaires
Schéma d'une coupe coronale du complexe olivaire représentant les sous noyaux olivaires. (Di Meglio et al. 2008)
(B) Voie de migration des neurones du pont
Schéma d'une vue latérale d'un embryon de souris montrant la migration des neurones du pont en trois phases (Geisen et al., 2008) : une migration ventrale (1) , rostrale le long de l'axe antéro-postérieur (2) puis un changement soudain de direction pour migrer ventralement jusqu'à la plaque du plancher (3). nV : noyau trijumeau ; nVII : noyau moteur facial : nVIII : noyau vestibulo-cochléaire. (Geisen et al., 2008)

(Geisen et al., 2008) (Figure 8b). La majorité des neurones s'arrêtent à la ligne médiane, mais une petite partie la traverse (Kawauchi et al., 2006). Les neurones PN vont ensuite migrer radiairement à l'intérieur du tronc cérébral et s'agréger en plusieurs noyaux (Kawauchi et al., 2006). Leurs axones traversent la ligne médiane et se projettent dans le cervelet controlatéral. Durant leur migration, les neurones PN traversent différents rhombomères et expriment des marqueurs moléculaires qui leur sont propres tel que le gène à homéoboîte *Barhl1* (Li et al., 2004). De plus, l'intégration des signaux de guidage reçus lors de leur migration est régulée par des mécanismes épigénétiques (Di Meglio et al., 2013). Ezh2 est membre du complexe polycomb PCR2 (Polycomb Repressive Complex 2) dont le rôle principal est de triméthyler l'histone H3 sur sa lysine 27. Cela entraîne une extinction de la transcription (Margueron and Reinberg, 2011). Ezh2 est exprimé dans les précurseurs des lèvres rhombiques et permet la bonne topographie des neurones pontiques en migration en maintenant la distribution des signaux attractifs et/ou répulsifs (Di Meglio et al., 2013). Les mécanismes qui contrôlent les différentes étapes de la migration des neurones pontins restent largement inconnus et nous y reviendrons dans une partie ultérieure.

Le noyau réticulaire latéral et le cunéiforme externe

Le LRN et l'ECN ont comme particularité d'innerver le cervelet ipsilatéral. Le LRN est divisé en trois sous noyaux : le parvocellulaire, le magnocellulaire et le sous-trigéminé. Il reçoit principalement des informations en provenance des pattes postérieures et antérieures de la moelle épinière contrôlant la posture du corps et la motricité fine, mais aussi de régions du tronc ainsi que du cortex somato-sensoriel. L'ECN reçoit des afférences des pattes avant et de la moelle épinière cervicale correspondant aux informations proprioceptives. Les neurones de ces deux noyaux présentent la particularité de naître dans les lèvres rhombiques situées du côté opposé de leur position finale et ils migrent donc à travers la plaque du plancher.

Le cervelet

Le cervelet peut être subdivisé en différentes structures. Le cortex cérébelleux, dont les sillons concentriques lui donnent un aspect multi folié, et la substance blanche

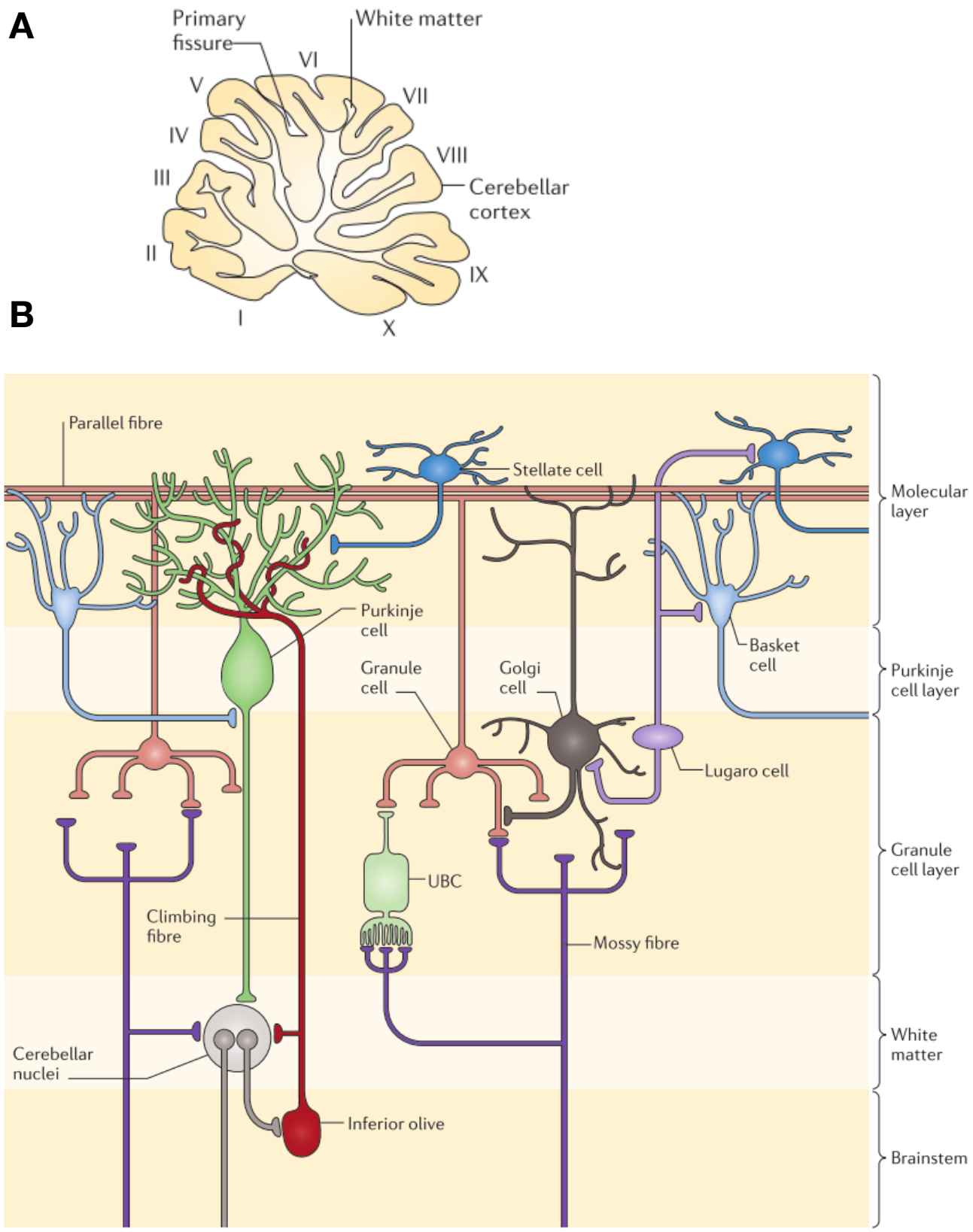


Figure 9 : Anatomie du cervelet et architecture cellulaire
(A) Schéma d'une coupe sagittale de cervelet**.**
(B) Schéma de l'organisation cellulaire du cervelet
(Cerminara et al., 2015)

(située en dessous de ce dernier) qui contient les noyaux profonds : dentelés, fastigiaux et interposés. Le cortex cérébelleux est composé de trois différentes couches cellulaires (Figure 9). La couche granulaire est la couche la plus interne, elle comprend notamment les cellules granulaires, excitatrices, les cellules de Golgi et de Lugaro, inhibitrices et les cellules de la glie de Bergmann dont les prolongements s'étendent vers la surface du cervelet. La couche intermédiaire contient uniquement les corps cellulaires des cellules de Purkinje. Pour finir, la couche la plus externe, ou couche moléculaire, contient l'arbre dendritique des cellules de Purkinje ainsi que les axones des cellules granulaires appelés fibres parallèles. On y trouve également deux types de neurones inhibiteurs : les cellules étoilées et les cellules en corbeille. Les fibres parallèles, les axones des cellules granulaires, contactent les interneurones inhibiteurs et le compartiment distale des dendrites des cellules de Purkinje dans la couche moléculaire. En outre, les cellules de Purkinje sont innervées par les fibres grimpantes de l'olive inférieure (décrit dans le paragraphe suivant), ainsi que par les axones des interneurones inhibiteurs de la couche moléculaire, qui vont moduler l'activation générée par les autres afférences. Les cellules de Purkinje envoient leurs axones inhibiteurs sur les neurones des noyaux profonds, des noyaux vestibulaires, et des noyaux adjacents (y compris les noyaux parabrachial, prepositus hypoglosse et du tractus solitaire) (De Camilli et al., 1984). Les cellules de Golgi permettent de moduler les synapses entre les fibres moussues et les cellules granulaires en envoyant des signaux inhibiteurs aux dendrites des cellules granulaires.

1.1.3 La barrière du système nerveux central

Au cours du développement, une barrière physique qui entoure le tube neural se crée entre le SNC et périphérique (Erickson and Couchman, 2000; Timpl and Brown, 1996). Cette barrière, localisée au dessous de la pie-mère est appelée lame basale et est riche en laminine et contient les pieds des cellules de la glie radiaire (Rossiter and Fraher, 1990) (Figure 10a). Les points d'entrée des projections sensorielles ou DREZ pour « dorsal root entry zone » et de sortie des projections motrices ou MEP pour « motor exit point » sont caractérisées par une cassure de la lame basale afin de permettre aux axones d'atteindre leurs cellules cibles (Fraher et al., 2007). Au

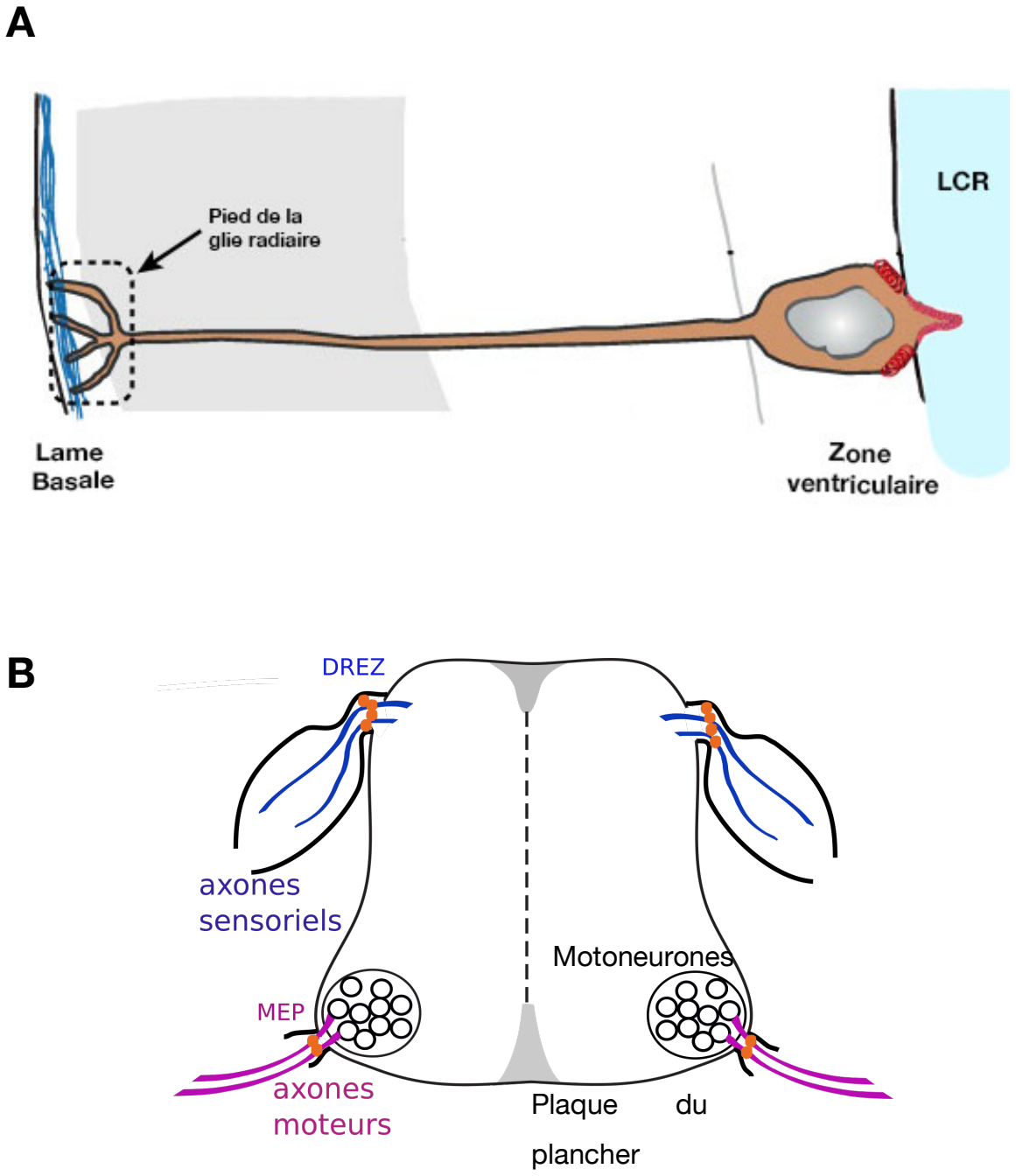


Figure 10 :
(A) La lame basale
La lame basale forme une barrière entre le SNC et le SNP. La glie radiaire, dont le corps cellulaire est en contact avec le liquide céphalo-rachidien (LCR), présente une morphologie radiaire avec de longs prolongements s'étendant de la zone ventriculaire jusqu'à la lame basale. (D'après Famulski et al. 2013)
(B) Points de sortie des axones moteurs et sensoriels dans la moelle épinière
Schéma d'une coupe coronale de moelle épinière d'embryon de souris. Les axones sensoriels (bleu) entrent dans la moelle épinière par la DREZ et les axones moteurs (rose) sortent par la MEP. Les cellules de capsule frontalière (orange) empêchent la migration des motoneurones en dehors du SNC.

niveau de ces points de sortie se trouvent des cellules appelées cellules de capsules frontalières qui sont des dérivées des crêtes neurales et expriment le facteur de transcription *Krox20* (Golding and Cohen, 1997; Wilkinson et al., 1989) (Figure 10b). Elles permettent le confinement des motoneurones dans le SNC, leur ablation s'accompagne d'une migration ectopique des neurones moteurs en dehors du SNC (Vermeren et al., 2003).

1.2 Visualisation des cellules du système nerveux central

Durant des siècles, les anatomistes ont tenté de comprendre l'anatomie complexe du cerveau. Pendant des centaines d'années cette structure est restée un mystère jusqu'à ce que Ramon y Cajal identifie et décrive les cellules du cerveau grâce la technique de marquage de Golgi. Depuis, beaucoup de nouvelles techniques ont permis de caractériser les réseaux neuronaux par immunomarquage ou par approche transgénique permettant de marquer des populations de neurones spécifiques exprimant le produit d'un gène rapporteur. Cependant, toutes ces techniques nécessitent d'effectuer de fines coupes du cerveau. Les coupes histologiques ne permettent pas d'obtenir des informations spatiales complètes et peuvent donc induire de mauvaises interprétations.

Les embryons de diverses espèces d'invertébrés, telle que la Drosophile ou *C.elegans*, ou même de certains vertébrés comme les poissons zèbres ou le Xénope sont optiquement transparents. Il est donc possible de visualiser et reconstruire des faisceaux d'axones et leurs arborisations en utilisant des transgènes spécifiques ou des immunomarquages sur les embryons entier (Hampel et al., 2011; Pan et al., 2011). Cette technique a permis de faciliter la caractérisation des phénotypes chez des mutants ayant des défauts de guidage axonal.

Cependant, chez la souris les cerveaux ne possèdent pas cette propriété et la visualisation des réseaux neuronaux entiers sur un cerveau intact a longtemps été impossible. L'aspect translucide des embryons et des cerveaux est dû à une mauvaise diffusion de la lumière à l'intérieur de l'échantillon. La lumière, au lieu de traverser le tissu est déviée par réflexion avec les molécules, membranes, organelles et cellules à l'intérieur du tissu.

Ces dernières années, beaucoup de laboratoires ont tenté de résoudre ce problème et ont développé diverses techniques permettant de rendre transparent un tissu entier. Toutes les techniques de transparisation reposent sur l'équilibre de l'indice de réfraction à l'intérieur de l'échantillon afin de réduire la diffusion de la lumière. Deux approches majeurs ont vu le jour : la transparisation à l'aide de solvants et la transparisation à partir de solutions aqueuses (Figure 11) (Richardson and Lichtman, 2015).

1.2.1 La transparisation à base de solvants

La transparisation à base de solvants comprend deux étapes. La première étape consiste en une déshydratation du tissu associée à une solubilisation des lipides. La deuxième étape est une élimination additionnelle des lipides et la transparisation du tissu en ajustant son indice de réfraction à celui des protéines fixées. Différents solvants ont été testés pour la déshydratation ou l'étape de transparisation (Becker et al., 2012; Peters, 1961). Le méthanol ou le tétrahydrofurane (THF) sont les solutions les plus communément utilisées pour la déshydratation (Becker et al., 2012; Dodt et al., 2007; Ertürk et al., 2011, 2012; Spalteholz, 1914). Ces solutions enlèvent non seulement l'eau des échantillons mais aussi une partie des lipides. Les protéines déshydratées ont un indice de réfraction supérieur à celui de l'eau ou des lipides (supérieur à 1,5). C'est pour cette raison que l'étape de déshydratation doit être suivie de l'incubation dans un second agent permettant d'éliminer les lipides restant de et s'intercaler de façon homogène à l'intérieur du tissu. Son indice de réfraction doit être le même que celui du tissu déshydraté le rendant ainsi transparent. Les solutions utilisées durant cette étape sont l'alcool benzylique, le benzoate de benzyle, le dichlorométhane ou le di-benzyle éther (Becker et al., 2012; Dodt et al., 2007; Ertürk et al., 2011, 2012; Spalteholz, 1914; Steinke and Wolff, 2001). Une limite majeure de la transparisation à base de solvant est que la déshydratation élimine les molécules d'eau de l'échantillon qui sont nécessaires au maintient de l'émission d'une majorité de protéines fluorescentes telle que la « green fluorescent protein » (GFP).

Cette technique de transparisation a pour avantage de fonctionner sur une grande variété de tissus, d'être peu couteuse, facile et rapide. Toutefois, elle nécessite

Solvant	Composition	Temps	Atération du tissu	Conservation fluorecence endogène	Détergeant	Conservation des lipides	Toxicité	reférence
BABB	Benzyl-alcohol/benzylbenzoate	Jours	Rétréssisemenr	Non	Non	Non	+++	Dodt et al., 2007
3DISCO	Dichloromethane/dibenzylether	Heures	Rétrésissement	non	non	non	++	Ertürk et al, 2012
immertion simple								
sucrose	sucrose	1 jour	rétréssisement	oui	triton (2%)	non	non	Tsai et al., 2009
Focus Clear	diatrizoic	heures-jours	non	oui	tween	oui	non	Chiang et al., 2002
ClearT	formamide	heures-jours	non	non	non	oui	non	Kuwajima et al., 2013
SeeDB	fructose/thioglycerol	jours	non	oui	non	oui	non	Ke et al., 2016
FRUIT	fructose/thioglycerol/urée	jours	légére extention	oui	non	oui	non	Hou et al., 2015
Hyperhydratation								
Scale A2	ureé 10%/glycérol	semaines	extention	oui	triton (0.1%)	non	non	Hama et al., 2011
Scale U2	urée 30%/glycérol	mois	non	oui	triton (0.1%)	non	non	Hama et al., 2011
CUBIC	urée/50% sucrose	jours	extention	oui	triton 50%	non	non	Susaki et al., 2014
inclusion en hydrogèl								
CLARITY	Focus clear/ 80% glycerole	jours	extention	oui	SDS 8%	non	non	Chung et al., 2013
PACT	histodenz	ours-semaine	extention	oui	SDS 8%	non	non	Yang et al., 2014

Figure 11 : Tableau comparatif des différentes techniques de tranparisation
(D'apres Richardson & Lichtman 2015)

l'utilisation de produits toxiques, elle réduit considérablement la taille des échantillons (jusqu'à 50% (Becker et al., 2012)) et son incompatibilité avec des protéines fluorescentes endogènes réduit ses champs d'utilisation (Figure 12a). Néanmoins, un nouveau protocole de transparisation à base de solvant n'altérant pas avec la taille des échantillons a permit d'améliorer cette technique de transparisation (Renier et al., 2016).

1.2.2 La transparisation à base de solutions aqueuses

La non préservation de la fluorescence endogène et le souhait de mieux conserver la structure des tissus ont poussé les chercheurs à trouver une technique de transparisation à base de solutions aqueuses. Toutes ces techniques utilisent un des trois mécanismes suivant pour homogénéiser la diffusion de la lumière:

- Simple immersion: une immersion passive de l'échantillon dans une solution dont l'indice de réfraction coïncide avec celui du tissu.
- Hyperhydratation : un retrait des lipides suivis d'une hydratation de l'échantillon pour abaisser l'indice de réfraction du tissu.
- Inclusion en hydrogel : un retrait actif ou passif du lipide suivi d'une immersion dans une solution ayant un indice de réfraction approprié.

1.2.2.1 Simple immersion

La transparisation par immersion passive dans des solutions à fort indice de réfraction est efficace pour les échantillons de petite taille. La majorité des liquides de montage microscope sont à base de glycérol avec un indice de réfraction élevé (entre 1,40 et 1,44) et sont capables de transmettre un léger effet de transparisation sur des tissus fins. Dans la technique de transparisation par immersion passive, l'échantillon est placé dans une solution aqueuse d'indice de réfraction élevé et permet de transpariser graduellement le tissu. Le sucrose (Tsai et al., 2009), le fructose (Costantini et al., 2015; Ke et al., 2013a), le glycérol (Meglinski et al., 2003) le 2,20-thiodiethanol (TDE) (Aoyagi et al., 2015; Hou et al., 2015; Staudt et al., 2007) et la formamide (Kuwajima et al., 2013) ont tous été testés. Généralement, un indice

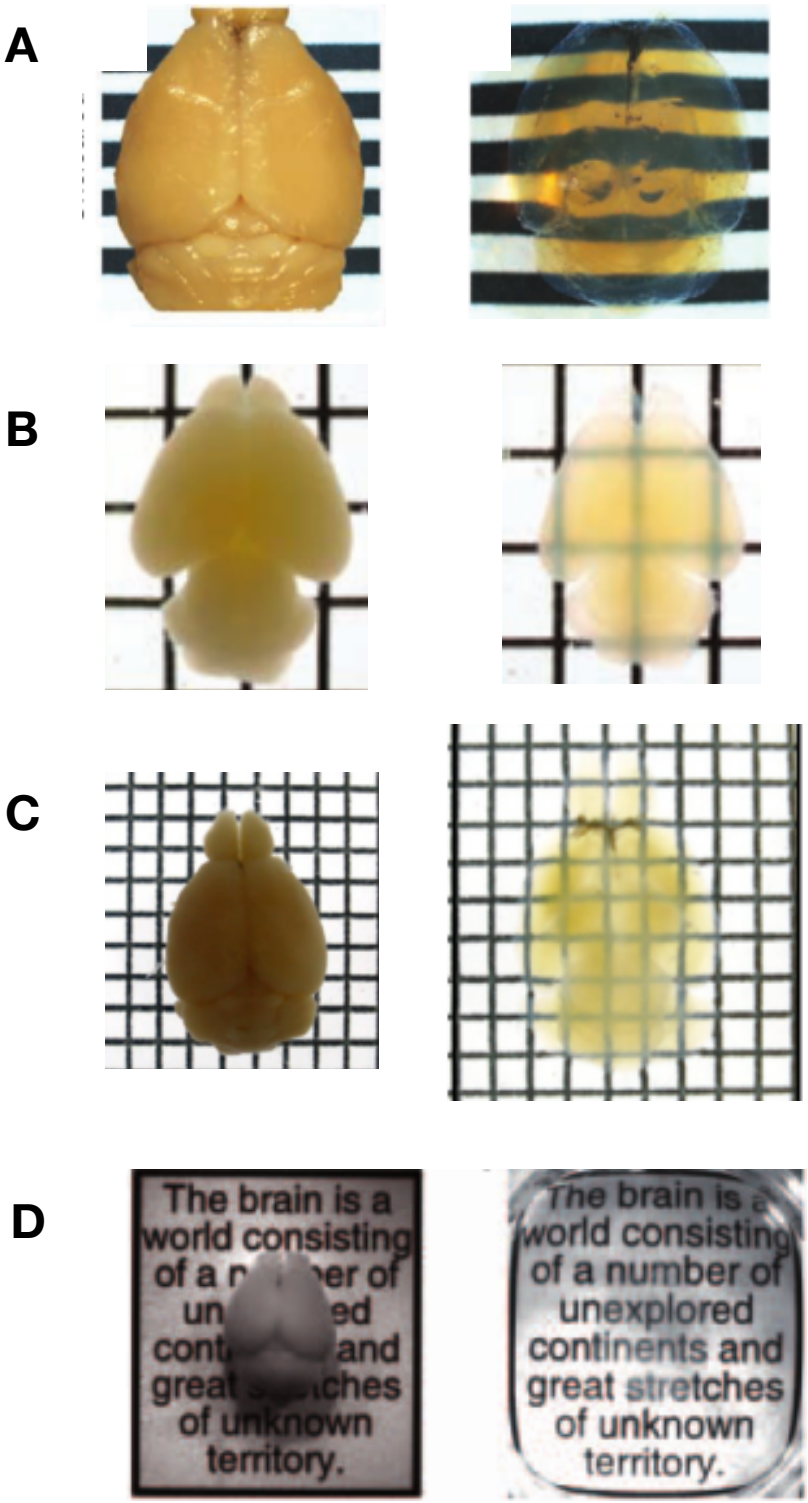


Figure 12 : Comparaison d'échantillons transparisés
(A) Cerveau adulte de souris, transparisation 3DISCO (Ertürk et al., 2012)
(B) Cerveau P0 de souris, transparisation SeeDB (Ke et al., 2013b)
(C) Cerveau adulte de souris, transparisation CUBIC (Susaki et al., 2014b)
(D) Cerveau adulte de souris, transparisation CLARITY (Chung et al., 2013b)

de réfraction supérieur à 1,45 doit être atteint pour obtenir une transparisation adéquate d'échantillons hydratés contenant tous leurs lipides.
La technique d'immersion passive est la technique la plus simple, la moins couteuse et est compatible avec une large gamme de fluorophores et de protéines fluorescentes. Cependant, la transparisation est bien moins efficace et légèrement plus longue que celle avec solvants et n'est compatible qu'avec les échantillons de petite taille (Figure 12b) .

1.2.2.2 Hyperhydratation

La plupart des techniques de simple immersion n'enlèvent pas les lipides et essaient simplement de faire coïncider l'indice de réfraction moyen d'un tissu en remplaçant le liquide à l'intérieur de ce dernier avec une solution avec un indice de réfraction élevé. L'approche alternative est de retirer les lipides et réduire l'indice de réfraction du tissu lors de la transparisation. La stratégie de retrait des lipides sans l'utilisation de solvants hydrophobes (afin de préserver les protéines fluorescentes) est effectuée par l'incubation prolongée, de quelques jours à plusieurs mois, dans une solution de détergents. En parallèle, de l'urée est utilisée pour pénétrer, dénaturer partiellement, et ainsi hydrater même les régions les plus hydrophobes aux indices de réfraction les plus élevés (Hua et al., 2008). Cette hyperhydratation réduit l'indice de réfraction globale à environ 1,38 (Hama et al., 2011). Dans une des techniques d'hyperhydratation, une solution de sucrose avec un indice de réfraction élevé a été proposée comme étape additionnelle pour accélérer l'étape de transparisation (Susaki et al., 2014a; Tainaka et al., 2014).
Cette technique de transparisation par hyperhydratation est plus efficace qu'une simple immersion et est accessible aux échantillons de plus grande taille. Cependant, l'hyperhydratation induit un accroissement de la taille de l'échantillon et peut altérer la localisation relative des structures ainsi que leur taille absolue. De plus, l'utilisation de détergents à forte concentration peut induire une perte importante des protéines (24% à 41%) et peut potentiellement réduire l'intensité des protéines fluorescentes. Pour finir, l'étape d'incubation avec un détergent peut prendre beaucoup de temps pour les échantillons de grande taille, augmentant

donc de façon conséquente le temps global consacré à cette technique (Figure 12c).

1.2.2.3 Inclusion en hydrogel

La méthode de transparisation par solution aqueuse est limitée aux échantillons de petite taille (simple immersion) ou est très lente (hyperhydratation). De plus, l'utilisation de solvant puissant ou de solution fortement concentrée en détergent risque d'altérer la composition protéique du tissu. La méthode « CLARITY » (Chung et al., 2013a) tente de résoudre ce problème en incluant les échantillons dans un hydrogel. Après inclusion, les lipides sont retirés de façon passive par une incubation longue (semaines) en détergents ou rapide (jours) par électrophorèse. L'étape finale consiste à immerger le tissu dans une solution à fort indice de réfraction.

Cette technique de transparisation est applicable à tout type d'échantillons et est compatible avec les protéines fluorescentes. Cependant, elle nécessite des équipements spéciaux et onéreux dans le cas d'un retrait des lipides par électrophorèse, ou des temps d'incubation long dans le cas d'un retrait des lipides par détergent (Figure 12d).

Diverses techniques de transparisation sont donc disponibles avec leurs avantages et inconvénients. La technique de transparisation par solution aqueuse a pour intérêt principal de conserver les protéines fluorescentes mais ne convient pas à tout type d'échantillon et peut nécessiter de longues périodes d'incubation. A l'inverse la technique de transparisation par solvants est plus rapide, plus efficace et adaptée à tout type de tissus, mais ne conserve pas bien la fluorescence des protéines. Une méthode d'immunomarquage sur échantillon entier afin d'amplifier un signal endogène ou marquer des structures spécifiques pourrait remédier au principal défaut de cette technique et la rendre donc beaucoup plus attirante.

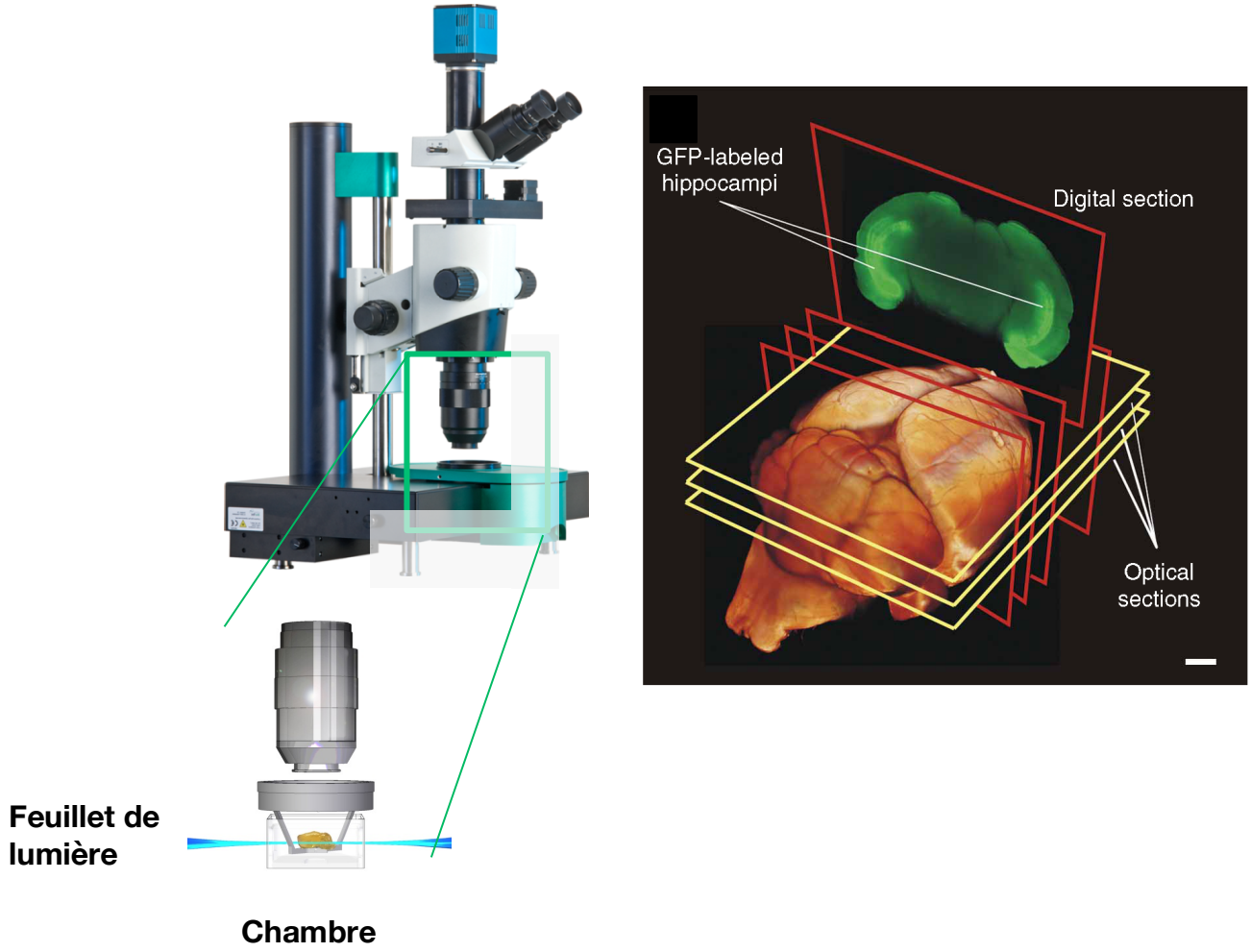


Figure 13 : Technique d'imagerie des échantillons transparents : l'ultramicroscope
L'échantillon transparent est illuminé de part et d'autre par un feuillet de lumière horizontal et génère une série de coupe optique dont l'ensemble permet de visualiser la structure en trois dimensions. (Dodt et al., 2007)

1.2.3 Imager les échantillons transparents

La nécessité d'acquérir de larges volumes transparents en un temps raisonnable a poussé au développement de la technique d'imagerie en feuillet de lumière. Cette technique est loin d'être récente puisqu'elle fut décrite pour la première fois il y a plus de cent ans (Siedentopf and Zsigmondy, 1903). Elle consiste à illuminer l'échantillon transparent par un feuillet horizontal de lumière, ainsi, la fluorescence est émise uniquement sur une fine coupe optique et l'image du plan entier est récoltée par la lentille (Figure 13). L'échantillon peut donc être entièrement imagé en une série de coupes optiques qui sont par la suite assemblées afin de visualiser la structure finale en trois dimensions. Cette technique d'imagerie est bien adaptée aux échantillons transparents qui permettent au feuillet de lumière de traverser la totalité de l'échantillon.

2 Les molécules de guidage axonal

Durant le développement, les axones sont guidés par des molécules appelées molécules de guidage axonal. Ces dernières vont permettre d'attirer ou de repousser les axones en croissance (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Le cône de croissance, à l'extrémité de l'axone, porte les récepteurs des molécules de guidage et va intégrer les signaux rencontrés lors de son développement. Ce mécanisme finement régulé assure la bonne formation des connections synaptiques. Ainsi, l'axone va être guidé en passant par des cibles intermédiaires pour atteindre sa cellule cible finale. Cette deuxième partie, portera sur deux des principales familles de molécules de guidage étudiées pendant ma thèse: les Slits et les Nétrines.

2.1 Les Nétrines

A la fin du 19éme siècle, Santiago Ramon y Cajal mit en évidence l'existence des cônes de croissance grâce à des marquages de Golgi sur des moelles épinières de poulet (Ramon y Cajal, 1892). Ses observations arrivèrent au moment où des études

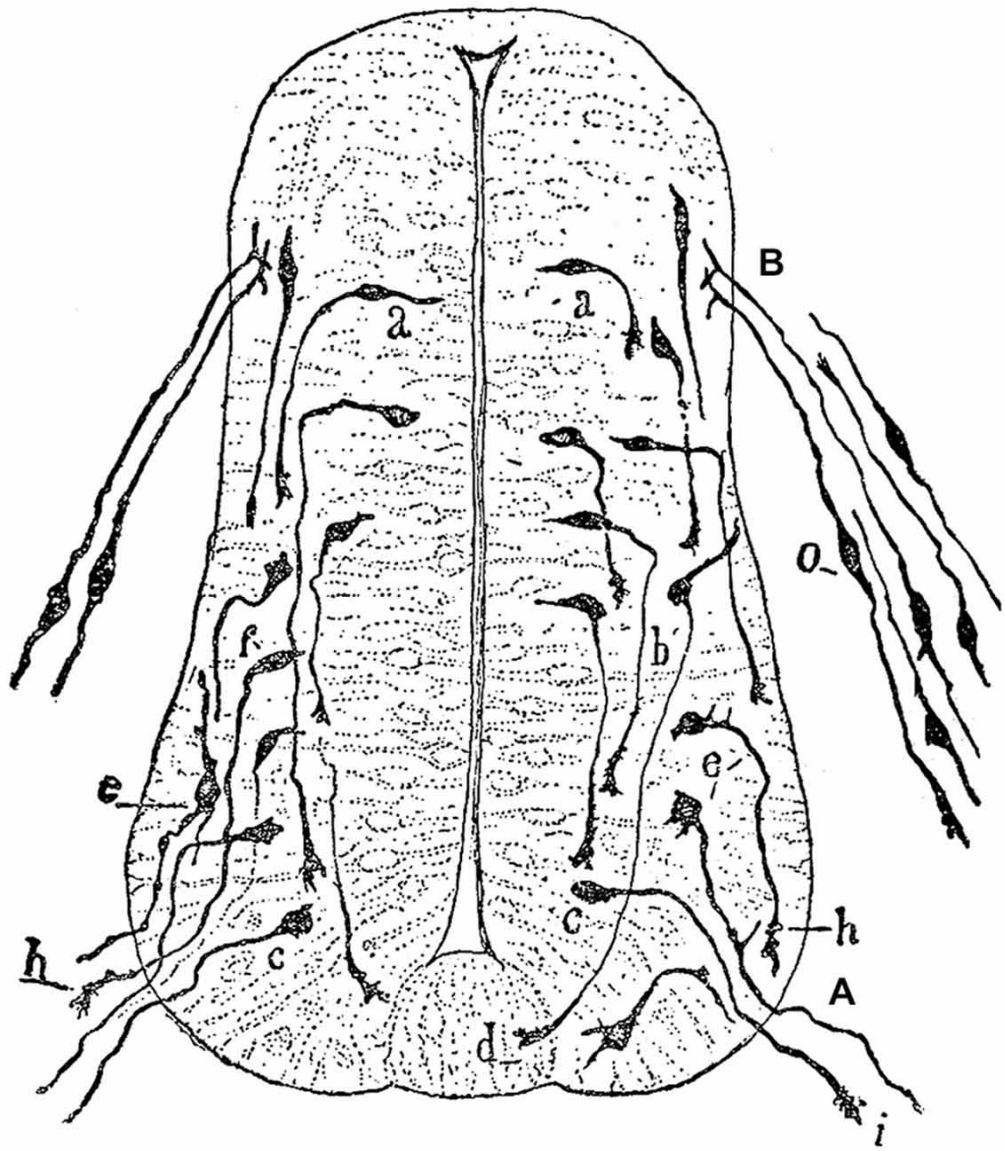


Figure 14. La moelle épinière de poulet en développement selon Ramon y Cajal
Dessin d'une coupe coronale de moelle épinière d'embryon de poulet à E3 réalisé par Ramon y Cajal. (Ramon y Cajal 1909)

de migration cellulaire montraient que les leucocytes pouvaient être orientés par des gradients de molécules solubles. Inspiré par ces résultats, Cajal proposa que la croissance axonale au cours du développement était dirigée par des signaux diffusibles sécrétés par les cellules cibles, un mécanisme de guidage agissant sur de longues distances appelé chimiotropisme (Ramon y Cajal, 1892). Pour exemple, il suggéra que les axones de neurones commissuraux de la moelle épinière atteignent la ligne médiane ventrale en suivant un gradient de signal attractif provenant de la plaque du plancher (Ramón y Cajal, 1909) (Figure 14).

Quatre-vingt ans plus tard, les premières expériences *in vitro* de co-culture d'explants de plaques du plancher et de moelle épinière dorsale de rat confirmeront que la plaque du plancher sécrète des molécules permettant le guidage mais aussi la croissance des axones commissuraux (Placzek et al., 1990; Tessier-Lavigne et al., 1988). Cependant, les molécules attractives impliquées dans ce processus étaient toujours inconnues bien que beaucoup de facteurs neurotrophiques et de facteurs de croissance aient été testés, sans succès (Placzek et al., 1990).

2.1.1 Découverte de la Nétrine-1

Par des expérimentations *in* vitro chez le poulet, le laboratoire de Marc Tessier Lavigne mit en évidence, pour la première fois chez les vertébrés, deux molécules de guidage des axones commissuraux appartenant à la même famille. Ces molécules reçurent le nom de Nétrine-1 et Nétrine-2 dont la racine, « netr », signifie en Sanskrit «celui qui guide ». (Serafini et al., 1994). Nétrine-1 et Nétrine-2 sont toutes deux exprimées chez l'embryon de poulet lors de la croissance des axones commissuraux. La Nétrine-1 est fortement exprimée dans la plaque du plancher tandis que la Nétrine-2 est exprimée, plus faiblement que la Nétrine-1, dans les deux-tiers de la partie ventrale de la moelle épinière à l'exception de la plaque du plancher (Figure15). En parallèle, ils montrèrent *in vitro* qu'une source de Nétrine-1 était capable de promouvoir la croissance axonale des axones commissuraux de la moelle épinière dorsale à une distance d'au moins 250 µm suggérant une action diffusible de la molécule (Kennedy et al., 1994). A partir de l'ensemble de ces données, ils suggérèrent que les Nétrine-1/2 établissent un gradient permettant de

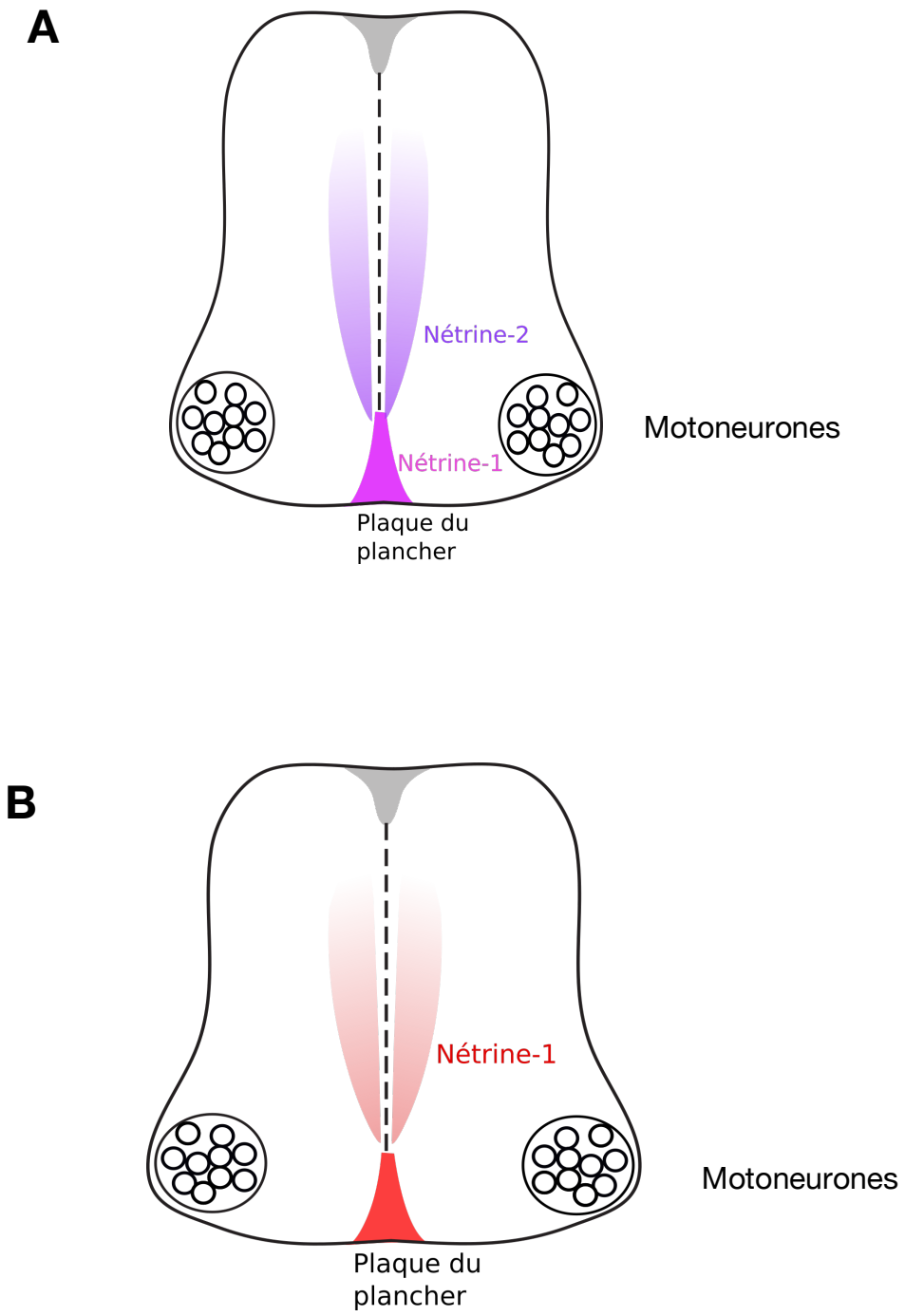


Figure 15
(A) Expression de Nétrine-1 et Nétrine-2 chez le poulet
Schéma d'une coupe coronale de moelle épinière de poulet au stade 16. La Nétrine-1 est exprimée dans la plaque du plancher tandis que la Nétrine-2 est exprimée, dans les deux-tiers de la partie ventrale
(B) Expression de Nétrine-1 chez la souris
Schéma d'une coupe coronale de moelle épinière de souris à E11. Le patron d'expression de la Nétrine-1 chez la souris est un composite des expressions des Nétrine1/2 chez le poulet : elle est exprimée dans la plaque du plancher et dans la zone ventriculaire

guider les axones commissuraux de la moelle épinière vers la ligne médiane ventrale au cours du développement (Kennedy et al., 1994).

2.1.2 Organisation génétique et structure protéique des différentes Nétrines

Les membres de la famille des Nétrines sont des homologues du gène *unc-6* chez *C. elegans*, découvert quatre ans plus tôt, dont la protéine guide les cônes de croissance des axones et les cellules du mésoderme (Hedgecock et al., 1990; Ishii et al., 1992). Les Nétrines appartiennent à la superfamille des laminines qui sont des protéines de la matrice extracellulaire. Elles sont composées d'un domaine laminine VI en position N-terminal, d'un domaine central de type laminine V (composé de 3 séquences EGF) et un domaine C-terminal (Cirulli and Yebra, 2007) (Figure16).

L'orthologue de la Nétrine-1 chez les mammifères a été découvert en 1996 par le laboratoire de Marc Tessier Lavigne (Serafini et al., 1996), ainsi que celui de Nétrine-2 (appelé Nétrine-3 (Friocourt et al., 2016; Wang et al., 1999a)). D'autres membres de la famille des Nétrines ont été identifiés par la suite chez les mammifères: la Nétrine-3 (Van Raay et al., 1997; Wang et al., 1999b), la Nétrine-4 (Yin et al., 2000), la Nétrine-5 (Yamagishi et al., 2015), la Nétrine G1 et la Nétrine G2 (Nakashiba et al., 2000; Yin et al., 2002) (Figure 16). Contrairement aux Nétrines 1 à 5, les Nétrines G1 et G2 possèdent une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui permet l'accrochage à la membrane, de plus, elles n'ont aucune affinité pour les récepteurs connus des autres Nétrines. Il a été proposé que les Nétrines G1 et G2 auraient évolué indépendamment et qu'elles auraient un rôle de signalisation cellulaire de courte portée (Nakashiba et al., 2002). Les Nétrines 1 à 5 sont des protéines sécrétées et leurs rôles ont été identifiés dans différents processus tel que le guidage axonal, la synaptogenèse, et l'angiogenèse. La Nétrine-1 est la molécule la plus étudiée pour son rôle primordial dans le développement et le cancer. Dans la moelle épinière et le tronc cérébral, le patron d'expression de la Nétrine-1 chez la souris est un composite des expressions de Nétrine1/2 chez le poulet : elle est exprimée dans la plaque du plancher et dans la zone ventriculaire (Figure 15). Elle est aussi exprimée, plus faiblement, dans la partie dorsale de la moelle épinière (Serafini et al., 1996). Tout comme chez le poulet, il a été proposé que la Nétrine-1 attire des axones commissuraux vers la plaque du plancher par gradient (Serafini et

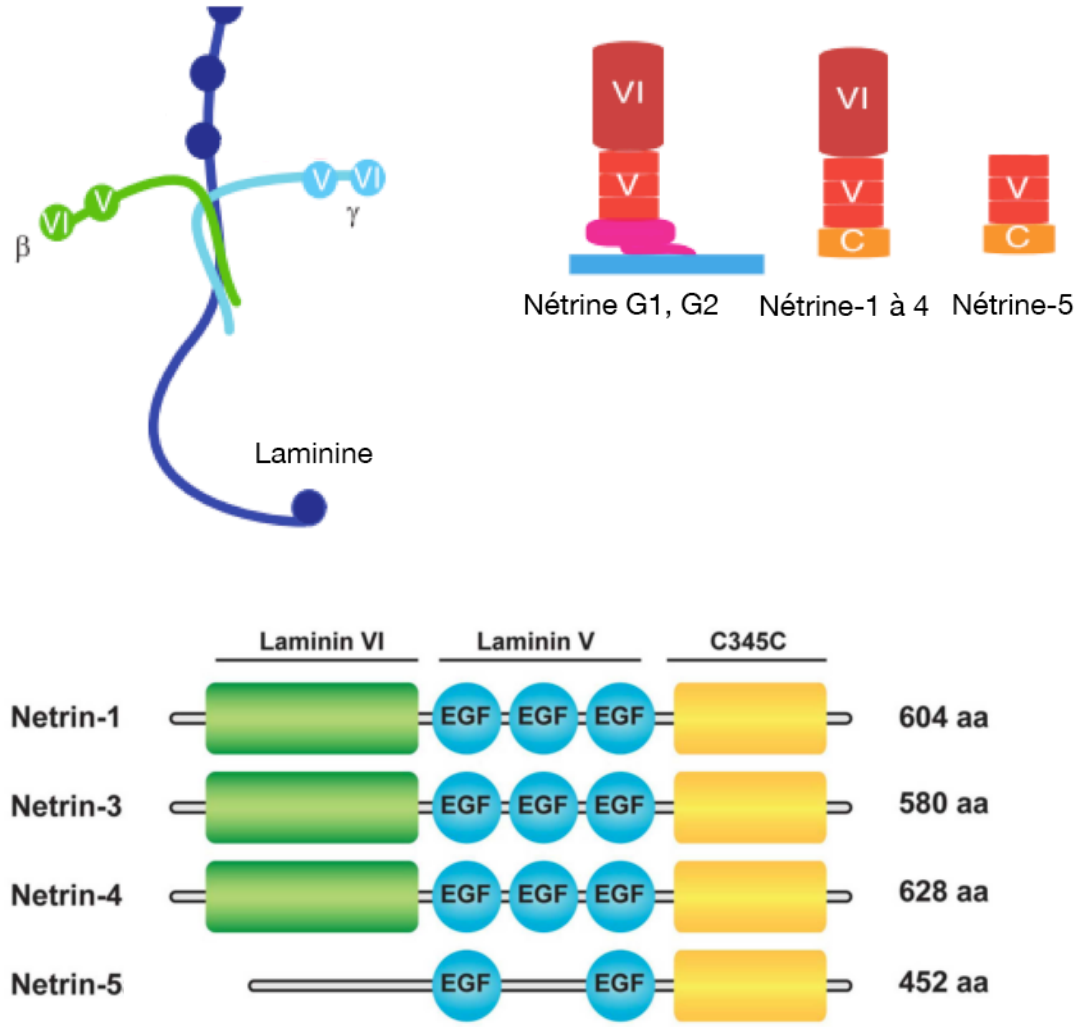


Figure 16 : Structure des différentes Nétrine
Les membres de la famille des Nétrine sont des laminines. Elles sont composées d'un domaine laminine VI en position N-terminal, d'un domaine central de type laminine V (composé de 3 séquences EGF) et un domaine C-terminal. (D'après Rajasekharan and Kennedy, 2009; Yamagishi et al., 2015)

al., 1996). Nous allons, dans la suite du manuscrit, porter notre attention sur cette molécule de guidage.

A l'inverse de la Nétrine-1, la fonction des autres membres de la famille des Nétrines est peu connue. La Nétrine-3 est capable de copier l'attraction des axones commissuraux de la Nétrine-1 et la répulsion des neurones moteurs du trochléaire *in vitro* (Wang et al., 1999a). Cependant, l'expression de la Nétrine-3 dans la moelle épinière débute après le franchissement de la plaque du plancher par les premiers axones commissuraux. La Nétrine-3 est aussi exprimée dans le système nerveux périphérique : dans les ganglions spinaux dorsaux et les cellules du mésoderme, cette molécule pourrait influencer le guidage axonal des cibles périphériques (Püschel, 1999). La Nétrine-4 est, quand à elle, très largement exprimée dans le système nerveux: le bulbe olfactif, la rétine, les ganglions spinaux dorsaux, les grains du cervelet, l'hippocampe et les neurones corticaux (Koch et al., 2000). Dans la moelle épinière, une faible quantité de Nétrine-4 est détectée adjacente à la plaque du plancher, mais, tout comme la Nétrine-3, elle débute après que les premiers axones commissuraux aient franchi la ligne médiane ventrale. Contrairement aux autres Nétrine, la Nétrine-5 contient 2 séquences EGF dans son domaine laminine V et ne possède pas de domaine N-terminal laminine VI (Yamagishi et al., 2015) (Figure 16). A l'âge adulte, elle est exprimée dans le bulbe olfactif, dans la zone subventriculaire, et dans la zone subgranulaire du gyrus dentelé dans l'hypoccampe où elle aurait pour fonction de contrôler la neurogénèse (Yamagishi et al., 2015). Lors du développement, la Nétrine-5 est exprimée dans les cellules de capsule frontalière et empêche la migration des motoneurones en dehors du SNC (Garrett et al., 2016).

2.1.3 Les récepteurs de la Nétrine-1

La Nétrine-1 joue un rôle important dans le guidage axonal grâce à son activité attractive. Néanmoins, il a été montré qu'elle peut aussi avoir un effet répulsif et qu'elle est impliquée dans diverses fonctions en dehors du guidage axonal. Les multiples propriétés de la Nétrine-1 sont liées au répertoire de ses récepteurs induisant des réponses propres à chacun.

2.1.3.1 DCC

Le récepteur DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma) a été tout d'abord identifié chez l'homme comme un candidat de suppresseur de tumeur associé à une délétion du chromosome 18q21 dans le cancer colorectal (Fearon et al., 1990; Vogelstein et al., 1988). C'est un récepteur transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Le domaine extracellulaire est composé de 4 domaines Ig, six domaines fibronectine de type III (FNIII), une région transmembranaire et une queue cytoplasmique (Figure 17).

DCC est exprimé par les axones commissuraux pendant le développement, et il fut le premier récepteur de la Nétrine-1 à être identifié deux ans après l'isolement de la Nétrine-1 chez le poulet, (Keino-Masu et al., 1996). DCC est le principal récepteur attractif de la Nétrine-1. En effet, la souris mutante pour le gène *DCC* reproduit la plupart des phénotypes du mutant *Netrine-1* KO que nous détaillerons dans la suite du manuscrit (Fazeli et al., 1997).

Comme mentionné précédemment, DCC joue un rôle important dans le cancer. La délétion de DCC rendrait les cellules tumorales insensibles à une voie apoptotique induite par l'absence Nétrine-1 (Mazelin et al., 2004). Ainsi, Nétrine-1 agirait comme un facteur trophique et DCC serait un récepteur à dépendance induisant l'apoptose des cellules qui l'expriment en absence de Nétrine-1 (Mehlen et al., 1998). La plasticité du complexe DCC/Nétrine-1 semble jouer un rôle clé dans le développement que nous développerons dans un paragraphe ultérieur.

2.1.3.2 Neogénine

Le récepteur Néogénine appartient lui aussi à la superfamille des immunoglobulines. Il partage 50% d'homologie avec le récepteur DCC et par conséquent présente la même structure (Figure 17). La liaison de Nétrine-1 à Néogénine a été mise en évidence en même temps que celle de Nétrine-1 à DCC (Keino-Masu et al., 1996). L'interaction Nétrine/Néogénine est impliquée dans l'adhésion cellulaire lors du développement des glandes mammaires (Srinivasan et al., 2003) ainsi que durant la différenciation myogénique (Kang et al., 2004). Cependant, son rôle dans le guidage axonal par l'intermédiaire de Nétrine-1 est peu étudié et donc peu connu notamment du fait qu'aucun phénotype de guidage n'a pu être observé chez les

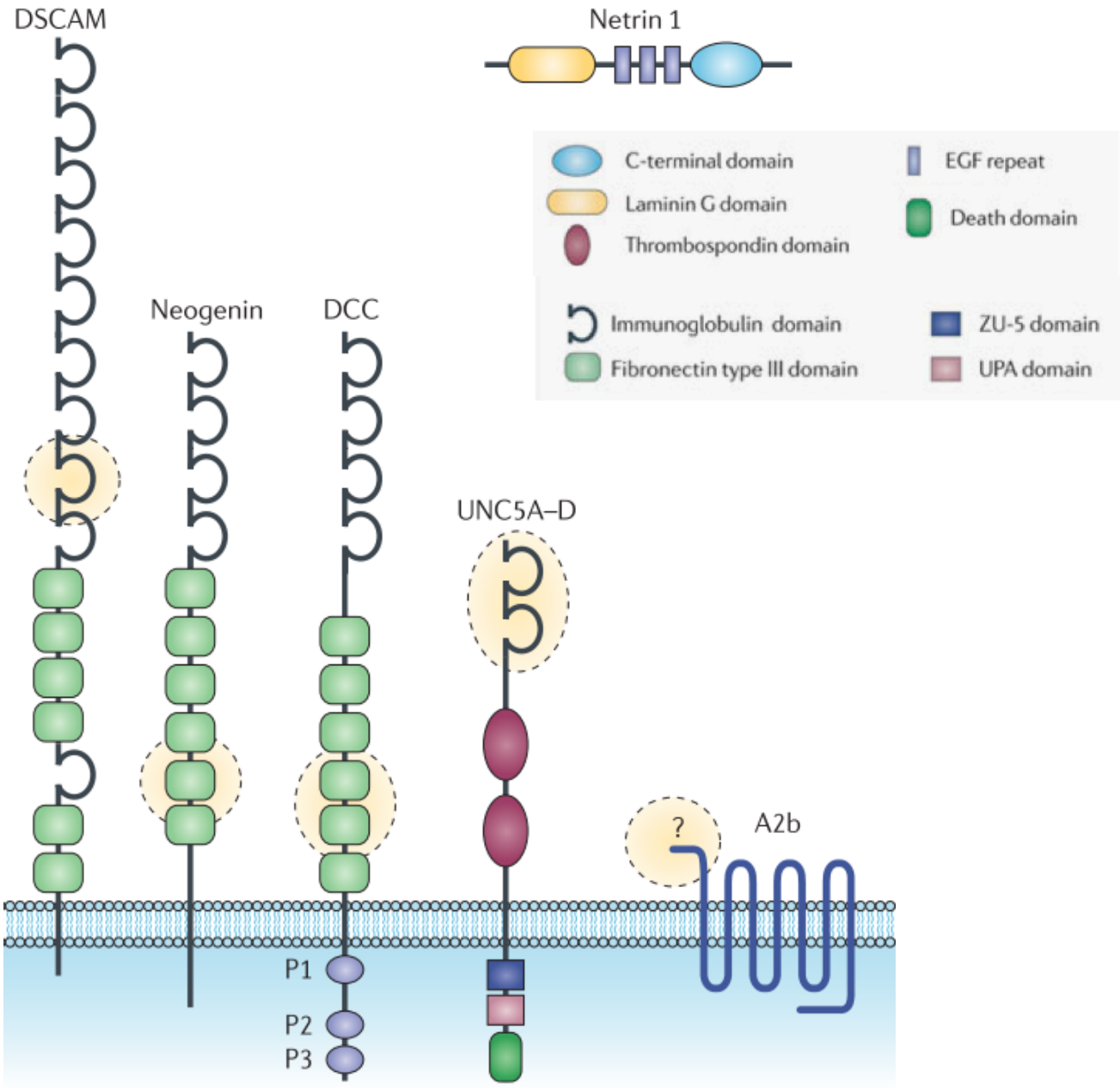


Figure 17 : Les récepteurs de la Nétrine-1
Schéma représentant la Nétrine-1 et ses récepteurs. La Nétrine-1 intéragit avec ses récepteurs par son domaine laminine G. Le site d'interaction de chaque récepteur est indiqué en jaune.
(Mehlen et al., 2011)

souris déficientes du gène *Néogénine* (Leighton et al., 2001), qui sont toutefois des hypomorphes. En effet, l'unique fonction de guidage axonal répertoriée pour Néogénine est liée à son interaction avec la molécule répulsive RGMa dans le cerveau antérieur (Rajagopalan et al., 2004; Wilson and Key, 2006). Toutefois, l'étude récente des doubles mutants *DCC* et *Néogénine* montre un défaut de guidage plus important que chez les simples mutants *DCC* suggérant que le récepteur Néogénine puisse collaborer avec le récepteur DCC dans le guidage des axones commissuraux (Xu et al., 2014). Il est intéressant de mentionner que le gène codant pour *DCC* est absent chez le poulet et d'autres oiseaux (Friocourt et al., 2016; Phan et al., 2011). Ainsi, dans ces espèces l'absence de DCC pourrait être compensé par Néogénine.

2.1.3.3 Les récepteurs UNC-5

Bien que la Nétrine-1 soit connue pour ses effets chimioattractifs, elle peut aussi avoir une activité répulsive (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995). L'effet attractif ou répulsif de la Nétrine-1 est donc conditionné par ses récepteurs. Les membres de la famille UNC-5 ont rapidement été identifiés comme les récepteurs responsable des effets répulsifs de la Nétrine-1 (Ackerman et al., 1997; Hedgecock et al., 1990; Leonardo et al., 1997). Chez la souris il existe quatre homologues : UNC5H1-4 (Ackerman et al., 1997; Engelkamp, 2002; Leonardo et al., 1997). Les membres de la famille Unc5 sont des récepteurs transmembranaires de type 1 de la superfamille des immunoglobulines. Leur partie extracellulaire est composée de deux domaines immunoglobulines et deux domaines thrombospondines de type I (Figure 17) En réponse à la Nétrine-1, les récepteurs de la famille Unc5 ont une activité répulsive (Ackerman et al., 1997; Hamelin et al., 1993; Leung-Hagesteijn et al., 1992; Przyborski et al., 1998). Cependant, dans la plupart des cas étudiés, cette répulsion requiert la présence de DCC (Hong et al., 1999; Keino-Masu et al., 1996), même s'il semble que plus rarement, comme par exemple lors de la migration des interneurones cérébelleux, cette répulsion puisse être indépendante de DCC (Guijarro et al., 2006).

Les récepteurs Unc5h1 à 3 sont exprimés dans le SNC en développement. En effet, ils sont présents au niveau du cerveau embryonnaire dans la plaque basale du

mésencéphale et du rhombencéphale, dans l'hypothalamus, le thalamus, l'hippocampe, le cortex entorhinal, dans la rétine et dans le cervelet. Ils sont aussi exprimés dans le tube neural en développement, notamment par les motoneurones et la plaque du toit (Ackerman et al., 1997; Leonardo et al., 1997). Alors que l'expression de Unc5h1 est restreinte au SNC, les récepteurs Unc5h2, 3 et 4 sont aussi exprimés à l'extérieur du SNC, notamment au cours du développement du bourgeon de membre. Unc5h2 et Unc5h4 sont aussi respectivement exprimés au cours de la mise en place du système vasculaire et de la glande mammaire (Engelkamp, 2002). De plus chez l'adulte, les récepteurs Unc5h1, 2 et 3 continuent à s'exprimer dans la moelle épinière (Manitt et al., 2004)

De plus, tout comme le récepteur DCC, les membres de la famille des récepteurs UNC-5 sont des récepteurs à dépendance (Llambi et al., 2001).

2.1.3.4 DSCAM

Le récepteur DSCAM (Down-syndrome adhesion molecule) est un récepteur transmembranaire de type I qui appartient à la superfamille des immunoglobulines (Yamakawa et al., 1998). Son domaine extracellulaire présente dix domaines immunoglobuline et six domaines fibronectine de type III, tandis que son domaine intracellulaire ne présente pas d'homologie particulière (Yamakawa et al., 1998) (Figure 17). DSCAM fut initialement décrit comme contribuant aux déficits cognitifs observés chez les individus affectés de trisomie 21 (Yamakawa et al., 1998).

Au cours du développement du SNC, DSCAM est largement exprimé par les neurones en différenciation (Yamakawa et al., 1998). De plus chez la souris, l'identification d'une mutation spontanée invalidant DSCAM mit en lumière la contribution de DSCAM dans le développement de l'arborisation dendritique de la rétine (Fuerst et al., 2009; Fuerst et al., 2008). Par ailleurs, le rôle de DSCAM est clairement établi chez la drosophile (Chen et al., 2006; Schmucker et al., 2000; Yamagata and Sanes, 2008) où son invalidation conduit par exemple, à de sévères défauts de guidage au niveau des commissures (Schmucker et al., 2000).

Ce n'est que tardivement que sa liaison avec la Nétrine-1, induisant un effet attractif, a été proposée (Ly et al., 2008). Toutefois, les seules preuves de l'implication de ce récepteur dans la signalisation de la Nétrine-1 reposent uniquement sur des

données *in vitro* où les fonctions de DSCAM sont bloquées par ARN interférant dans des cultures de moelle épinière de poulet et de souris induisant un défaut d'élongation et de guidage des axones commissuraux (Liu et al., 2009; Ly et al., 2008). L'analyse du mutant murin du gène *DSCAM* n'a montré aucun défaut de guidage dans le SNC, réfutant l'implication du récepteur dans l'attraction des axones commissuraux via la Nétrine-1 (Palmesino et al., 2012). Cette étude pointe du doigt les artéfacts engendrés par les expérimentations *in vitro* où la délétion soudaine d'un gène et ses effets diffèrent d'une délétion à long terme présente chez les modèles de souris *knock-out*.

2.1.3.5 A2b

Le récepteur A2b appartient à la famille des récepteurs à l'adénosine (Feoktistov and Biaggioni, 1997). Il est couplé à la protéine G de 36-37 kDa qui possède sept domaines transmembranaires connectés par trois domaines extracellulaires et trois domaines intracellulaires, eux-mêmes bordés par un domaine N-ter extracellulaire et un domaine C-ter intracellulaire (Feoktistov and Biaggioni, 1997) (Figure 17). Une étude visant à identifier des partenaires de DCC mit en évidence l'interaction entre DCC et A2b (Corset et al., 2000). Dans cette étude, les auteurs montrent qu'A2b se comporte comme un récepteur à la Nétrine-1. En effet, l'interaction Nétrine-1/A2b, stimule la production d'AMPc. En outre, cette voie de signalisation stimule la croissance axonale, puisque l'addition d'un antagoniste de A2b diminue la croissance axonale en réponse à la Nétrine-1. Cette étude suggère donc que A2b régule le niveau d'AMPc en réponse à la Nétrine-1, or le niveau d'AMPc joue un rôle majeur dans le guidage axonal puisque selon sa concentration, il peut convertir l'attraction en répulsion (Ming et al., 1997). De plus, A2b pourrait participer à un complexe protéique membranaire faisant intervenir d'autres récepteurs à la Nétrine-1. Néanmoins, l'étude de Corset et Coll; est controversée. En effet, quelques mois après sa publication, le groupe de Marc Tessier-Lavigne publia que l'activation d'A2b par la Nétrine-1 n'est pas nécessaire à la croissance et l'orientation axonale (Stein et al., 2001). Cette étude, sans toutefois exclure l'existence de co-récepteurs, indique que seul DCC est requis afin de favoriser la pousse et l'orientation axonale en réponse à la Nétrine-1. Il n'est pas inutile de remarquer que ces deux études

utilisent des inhibiteurs peu spécifiques d'A2b. Seule l'étude de souris déficientes pour le gène *A2b* devrait donc permettre de conclure.

2.1.3.6 Autres récepteurs de la Nétrine-1

La Nétrine-1 interagirait avec les héparines (Bennett et al., 1997; Serafini et al., 1994; Shipp and Hsieh-Wilson, 2007), suggérant une liaison avec des héparanes sulfates de la matrice extracellulaire permettant de stabiliser la gradient de Nétrine-1 (Serafini et al., 1996). Les héparanes sulfates auraient aussi un effet cellulaire autonome sur les neurones commissuraux (Matsumoto et al., 2007). En effet, chez la souris l'ablation conditionnelle dans les neurones commissuraux du gène *Exostosin-1* (*Ext1*), codant pour une enzyme essentielle à la synthèse d'héparane sulfate, a révélé que EXT1 était nécessaire pour l'attraction des axones via la Nétrine-1 (Matsumoto et al., 2007). Les neurones commissuraux chez ces mutants sont incapables d'induire la signalisation intracellulaire suite à la liaison Nétrine-1/DCC. Les héparanes sulfates auraient donc une action cellulaire autonome induisant une interaction fonctionnelle avec au moins un récepteur de Nétrine-1. La Nétrine-1 peut aussi se lier aux intégrines, une large famille de récepteurs transmembranaires qui lie le cytosquelette aux protéines de la matrice extracellulaire. La Nétrine-1 se lie au intégrines α6β4 et α3β1 et permettrait de réguler l'adhésion des cellules épithéliales et leur migration (Yebra et al., 2003).

2.1.4 Rôle de la Nétrine-1 au cours du développement

La souris déficiente pour le gène *Netrine-1* générée par le laboratoire de Marc Tessier-Lavigne présente une grande quantité de défauts de guidage et par conséquent n'est pas viable : les nouveaux nés ne sont pas capables de téter et meurent au bout de quelques heures (Serafini et al., 1996). Les défauts de développement axonal chez ces mutants affectent le SNC mais aussi le SN périphérique. Nous allons décrire les résultats obtenus durant ses vingt dernières années sur l'étude de ce mutant qui ont permit d'avoir une meilleure compréhension du rôle de la Nétrine-1 au cours du développement.

2.1.4.1 Génération du mutant hypomorphe

Le premier *knock-out* murin du gène *Nétrine-1* a été obtenu par une méthode de « *gene-trap* » (Serafini et al., 1996). Cette technique repose sur l'introduction dans le génome d'un gène rapporteur dépourvu de ses éléments transcriptionnels. L'expression du gène rapporteur dépend donc des éléments de régulation du gène à l'intérieur duquel l'insertion a eu lieu et sera donc le reflet fidèle de l'expression de ce dernier. A la suite de l'intégration, la « construction-piège » peut donc interrompre un gène endogène et se comporter comme un agent mutagène. Dans le cas de la souris déficiente pour le gène *Nétrine-1,* le gène *Lac-Z* a été inséré dans un des introns du gène *Nétrine-1* de manière aléatoire (Skarnes et al., 1995). Le produit de cet allèle muté est une protéine chimérique transmembranaire contenant une partie extracellulaire du domaine VI, du premier domaine EGF de la Nétrine-1, un domaine transmembranaire (codé par le vecteur) suivi de la de la β-galactosidase (ß-gal). Cette protéine de fusion Nétrine-1/ß-gal reste piégée dans l'appareil de Golgi de la cellule qui la produit et est donc inaccessible aux axones en développement. Elle permet en outre de pouvoir visualiser les cellules qui expriment normalement la Nétrine-1 en révélant l'activité de la ß-gal (Skarnes et al., 1995). Cependant, cet allèle muté était suspecté d'être hypomorphe. En effet, chez les mutants homozygotes une faible quantité de l'ARN messager du gène *Nétrine-1* est toujours détecté y compris en hybridation *in situ* (Serafini et al., 1996). Une légère quantité de Nétrine-1 reste donc exprimée chez les souris mutantes en raison probablement d'un épissage de l'ARN pré-messager autour des exons insérés (Serafini et al., 1996). De plus, il est probable qu'une faible quantité de Nétrine-1 soit toujours fonctionnelle et accessible aux axones en développement. Cette hypothèse a été confirmée récemment par la génération de nouvelles lignées de mutants conditionnels de la *Nétrine-1* (Bin et al., 2015; Yung et al., 2015). Le croisement de ces animaux avec des souris exprimant la recombinase CRE dans des cellules germinales conduit à une perte de fonction complète de la Nétrine-1 (Bin et al., 2015; Yung et al., 2015). L'analyse des ces mutants, qui ne sont pas viables, montre les mêmes défauts de guidage trouvés chez le mutant hypomorphe mais d'un degré plus élevé. Ces deux études ont donc pu prouver qu'une quantité de Nétrine-1 fonctionnelle, non négligeable, était toujours présente chez le mutant

hypomorphe et qu'une lignée de souris avec un allèle *Nétrine-1* nul était nécessaire pour étudier les fonctions de la Nétrine-1.

2.1.4.2 Rôle de la Nétrine-1 dans la plaque du plancher au niveau de la moelle épinière et du tronc cérébral

C'est à la plaque du plancher que l'expression de la Nétrine-1 est la plus forte ce qui suggère que c'est la source la plus importante de ce facteur pour les axones et les neurones qui poussent ou migrent en direction de la ligne médiane ventrale. En accord avec ce modèle, de nombreux défauts de guidage des systèmes commissuraux sont observés dans la moelle épinière et le tronc cérébral chez le KO de la *Nétrine-1* suite à un probable manque d'attraction à la plaque du plancher. Toutefois, les anomalies de développement des commissures chez ce mutant touchent aussi les commissures du cerveau antérieur, au niveau duquel il n'y a pas de plaque du plancher.

2.1.4.2.1 L'action par gradient de la Nétrine-1

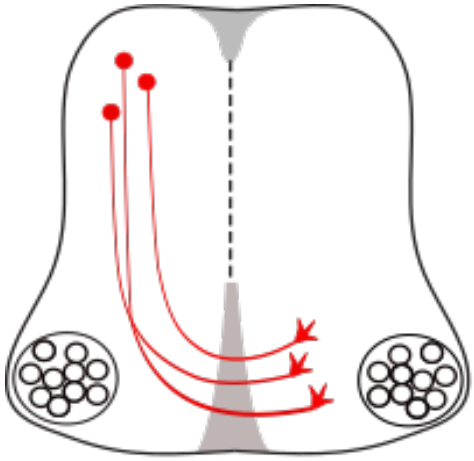
Comme mentionné précédemment, lors de la découverte de la Nétrine-1 il a été suggéré par des expériences *in vitro* que son action était diffusible et qu'un gradient permettrait d'attirer les axones commissuraux vers la ligne médiane ventrale (Kennedy et al., 1994). La Nétrine-1 serait donc sécrétée au niveau de la plaque du plancher et diffuserait vers la partie dorsale. Son interaction avec la matrice extracellulaire pourrait contribuer à stabiliser ce gradient (Kennedy et al., 1994) . Les données concernant l'expression de la Nétrine-1 au cours du développement chez la souris se basent principalement sur la localisation de son ARN messager, l'analyse de la localisation exacte de la Nétrine-1 n'a pas pu être étudiée précisément du fait de l'absence d'anticorps spécifique. L'unique étude montrant un gradient par immunomarquage de la Nétrine-1 a été effectuée chez l'embryon de poulet (Kennedy et al., 2006) à l'aide d'un anticorps qui n'est plus disponible. Il n'a donc pas été montré que la Nétrine-1 chez la souris posséderait une action à longue distance sur la croissance des axones commissuraux. De plus, chez la Drosophile,

la Nétrine-1 semble pouvoir agir par contact plutôt que par un gradient (Brankatschk and Dickson, 2006).

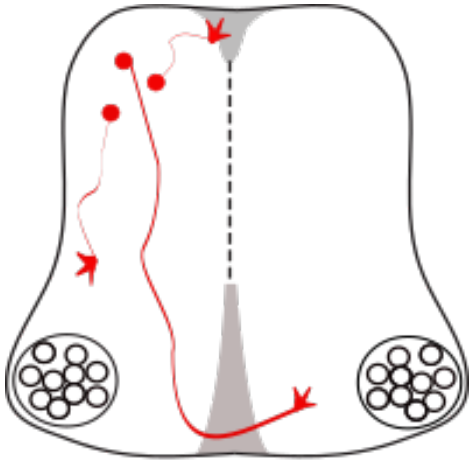
2.1.4.2.2 Axones commissuraux dans la moelle épinière

La mise en place des axones commissuraux de la moelle épinière est sévèrement affectée chez le mutant *KO Nétrine-1* hypomorphe. La croissance axonale est réduite et leur projection aberrante : certains projettent vers les ventricules, d'autres ventralement vers la surface piale ou vers les motoneurones (Serafini et al., 1996). Cependant, certains axones parviennent à atteindre la plaque du plancher et à se projeter du côté controlatéral pour former une commissure atrophiée (Serafini et al., 1996) (Figure 18). Le mutant utilisé dans cette étude étant hypomorphe, il a été proposé que les axones commissuraux parvenant toujours à franchir la ligne médiane été dû à la faible expression de Nétrine-1 toujours présente chez ses mutants. Toutefois, chez les mutants récemment générés où la délétion de la Nétrine-1 est totale, certains axones parviennent toujours à atteindre la ligne médiane ventrale, mais dans une moindre proportion que les mutants hypomorphes suggérant l'existence d'autres molécules de guidage intervenant dans le guidage des axones commissuraux à la plaque du plancher (Bin et al., 2015; Yung et al., 2015).

Afin de déterminer si la Nétrine-1 exprimée à la plaque du plancher était responsable de l'attraction chez les animaux sauvages l'effet attractif de plaque du plancher issue d'embryons sauvages et d'embryons mutants sur les axones d'explants de moelle épinière dorsale de rat a été comparé. Cette étude a montré que la plaque du plancher d'embryons mutants, contrairement aux sauvages, était incapable de promouvoir la croissance des axones. Il en a été conclu que la Nétrine-1 produite à la plaque du plancher est la source principale du signal attractif pour les axones commissuraux (Serafini et al., 1996). Toutefois, il a été montré ultérieurement que d'autres molécules attractives étaient présentes à la plaque du plancher et jouaient un rôle dans le guidage des axones commissuraux dans la moelle épinière telle que le morphogène Shh et le VEGF (Charron et al., 2003; Ruiz de Almodovar et al., 2011).



Contrôle



Nétrine-1$^{-/-}$

Figure 18 : Commissures cérébrales chez les mutants *Nétrine-1 KO*
Schémas d'une coupe coronale de moelle épinière de souris à E11 représentant les commissures cérébrales chez un embryon contrôle et un embryon mutant *Nétrine-1* KO.

2.1.4.2.3 Les motoneurones

Les motoneurones sont situés de part et d'autre de la plaque du plancher. La première étape de croissance des axones moteurs est la projection des axones à l'opposé de la ligne médiane avant leur sortie du SNC. *In* vitro, la plaque du plancher à la capacité de repousser les axones moteurs (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995; Varela-Echavarría et al., 1997). Des travaux *in vitro,* faisant appel aux gels de collagène, ont montré qu'une source localisée de Nétrine-1 peut repousser les axones moteur du trochléaire et des motoneurones branchiomoteurs et viscéraux du tronc cérébral mais pas les axones moteurs spinaux (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995; Varela-Echavarría et al., 1997). Cependant, aucun défaut de guidage des axones du trochléaire n'a été observé chez le KO de Nétrine-1 hypomorphes et les mutants avec une délétion complète de la Nétrine-1 (Bin et al., 2015; Serafini et al., 1996; Yung et al., 2015). De plus, la plaque du plancher d'embryons mutants est toujours capable de repousser les axones du trochléaire *in vitro* (Serafini et al., 1996). Hormis les projections du noyau moteur facial, aucune étude très poussée n'a pu mettre en évidence des défauts de projections des axones des motoneurones crâniens. Une partie des axones du noyau moteur facial présente un léger défaut où les axones tournent prématurément vers les points de sortie, d'autres forment de petits faisceaux dans la plaque du plancher (Murray et al., 2010). La sortie des axones moteurs du SNC semble donc ne pas être grandement affectée chez les mutants *Nétrine-1* KO. Cela suggère que d'éventuelles autres molécules de guidage interviendraient dans cette répulsion et laisse planer une incertitude quant à la fonction de la Nétrine-1 dans la répulsion des axones moteurs.

Le rôle de la Nétrine-1 dans le positionnement des motoneurones est lui aussi sujet à controverse. La première analyse de la souris déficiente pour le gène *Nétrine-1* par immunomarquage pour Islet1 a montré que le positionnement des motoneurones de la moelle épinière était normal (Serafini et al., 1996). Toutefois, une étude plus approfondie montre que chez le KO Nétrine-1, les motoneurones de la moelle épinière et du trochléaire seraient légèrement plus éloignés de la plaque du plancher (Kim et al., 2015). De plus, chez les mutants générés à partir de l'allèle floxé où la délétion est totale, il est montré que l'absence de la Nétrine-1 altère légèrement le

positionnement des neurones moteurs de la moelle épinière sans toutefois altérer sa structure ou la spécification des cellules (Bin et al., 2015).

2.1.4.2.4 L'olive inférieure

Dans le tronc cérébral, l'analyse de la structure de l'olive inférieure a révèlé que la Nétrine-1 agit aussi sur la migration neuronale. Chez les mutants Nétrine-1 KO, une partie des neurones de l'OI forment un complexe atrophié où une grande partie des sous-noyaux sont absents (Bloch-Gallego et al., 1999; Marcos et al., 2009). Une autre partie des neurones est positionnée de manière ectopique, à la surface du tronc cérébral et à distance de la plaque du plancher, suggérant un manque d'attraction (Figure 19). Les axones issus des neurones situés proche de la plaque du plancher arrivent cependant à projeter au cervelet mais du côté ipsilatéral (Bloch-Gallego et al., 1999). Une activité chimioattractive de la Nétrine-1 sur la migration des neurones olivaires a été mise en évidence grâce à des co-cultures de neurones olivaires post-mitotiques avec des cellules sécrétant la Nétrine-1 (Causeret et al., 2002). Par ailleurs, l'ablation de la plaque du plancher dans des tranches de troncs cérébraux issus d'embryons de poulet entraîne l'arrêt des neurones de l'OI à une distance de 70–100 µm de la ligne médiane. En revanche, les neurones olivaires ne forment pas de groupes ectopiques (Bloch-Gallego et al. 1999). Enfin, la migration des neurones olivaires est fortement perturbée dans des explants de lèvres rhombiques d'embryons de souris sauvages cultivés en présence de plaque du plancher issue d'embryons *Nétrine-1* KO (Marcos et al., 2009). Ces résultats contrastés, suggèrent toutefois que la Nétrine-1 exprimée à la plaque du plancher permettrait l'attraction des neurones olivaires vers la ligne médiane.

2.1.4.2.5 Le pont

Au cours de la première étude des souris *Nétrine-1* KO, une coloration histologique hématoxyline-éosine a révélé l'absence de noyaux pontins (Serafini et al., 1996). Deux autres études plus détaillées utilisant l'immunomarquage, l'hybridation *in situ* et l'électroporation (Yee et al., 1999; Zelina et al., 2014) ont montrés que chez les animaux *Nétrine-1* KO, les neurones pontins sont en fait présents. Ils quittent

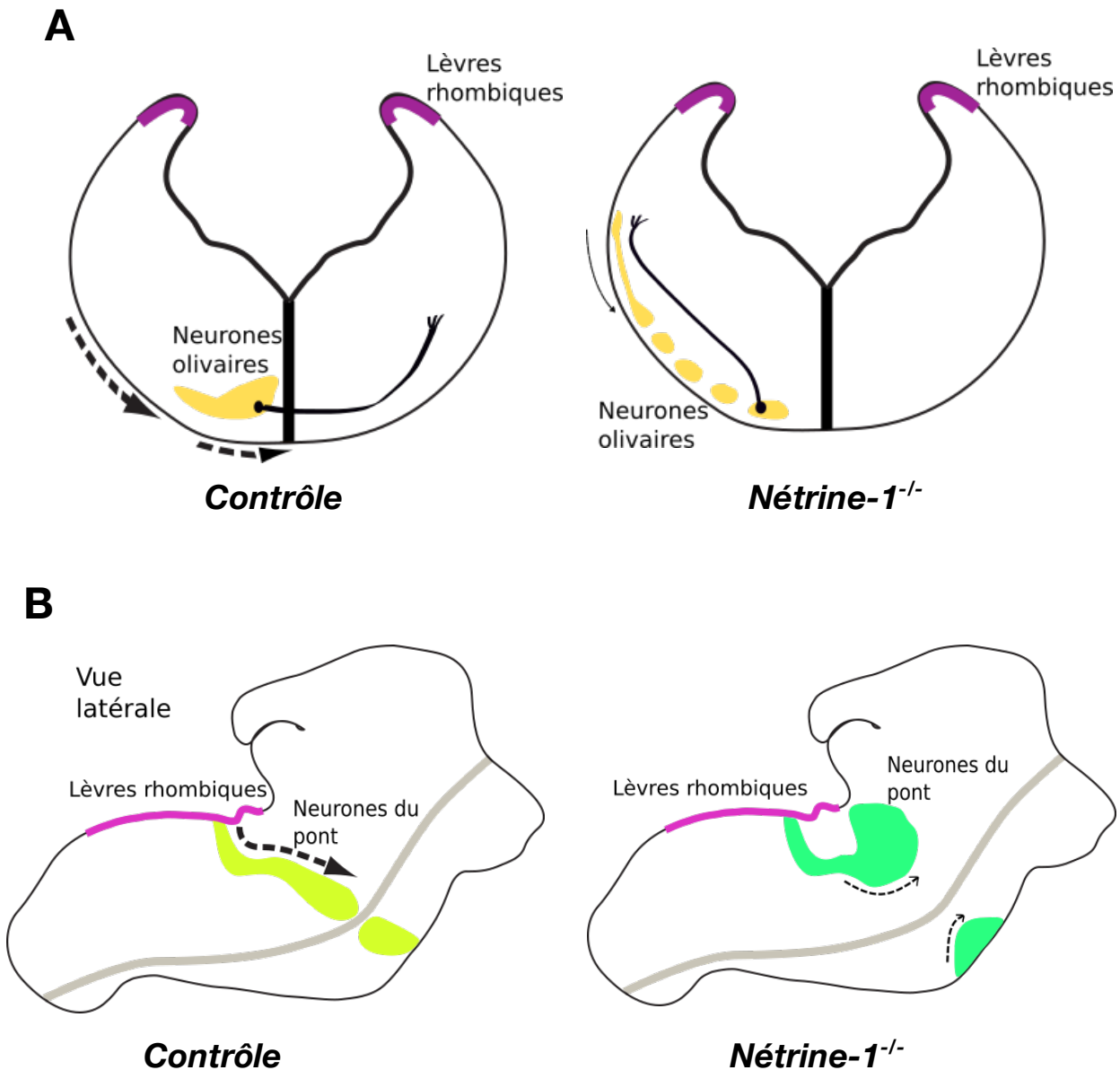


Figure 19

(A) Migration des neurones olivaires chez les mutants *Nétrine-1 KO*

Schémas d'une coupe coronale de tronc cérébral d'embryon de souris. Chez les mutants *Nétrine-1* KO les neurones olivaires sont positionnés de manière ectopique et leurs axones projettent du côté ipsilatéral.

(B) Migration des neurones du pont chez les mutants *Nétrine-1 KO*

Schémas d'une vue latérale d'un tronc cérébral d'embryon de souris. Chez les mutants *Nétrine-1* KO les neurones pontins quittent normalement les lèvres rhombiques et atteignent la racine du nerf trijumeau puis, au lieu de migrer vers la plaque du plancher, ils progressent dorsalement le long du tronc cérébral.

normalement les lèvres rhombiques et atteignent la racine du nerf trijumeau. A ce niveau, ils ne tournent pas ventralement comme chez les embryons sauvages, mais progressent dorsalement le long du tronc cérébral (Figure 19). Les co-cultures de lèvres rhombiques avec des explants de plaque du plancher ou des cellules exprimant la Nétrine-1 a confirmé que la Nétrine-1 peut attirer les neurones du pont (Yee et al., 1999; Zelina et al., 2014). L'utilisation d'anticorps bloquants anti Nétrine-1 entraîne une forte diminution de la migration des neurones du pont en direction de la plaque du plancher. Il a donc été conclu que la Nétrine-1 exprimée à la ligne médiane permettrait d'attirer les neurones pontins vers la plaque du plancher. La première phase de migration n'étant pas affectée, il est suggéré que d'autres molécules interviendraient dans l'initiation de cette migration.

L'ensemble des résultats *in vivo* et *in vitro* sont en faveur d'un modèle selon lequel la Nétrine-1 produite à la plaque du plancher attire sous forme de gradient les axones commissuraux ainsi que les neurones en migration dans la moelle épinière et le tronc cérébral. Toutefois, chez le mutant *Gli2* KO, qui n'a pas de plaque du plancher, et donc pas de Nétrine-1 au niveau de la ligne médiane ventrale, la plupart des axones commissuraux sont toujours attirés ventralement et établissent une commissure (Charron et al., 2003; Matise et al., 1999). Ces données suggèrent que la plaque du plancher n'est pas la seule source attractive de Nétrine-1 pour les axones commissuraux mais que la Nétrine-1 produite dans les zones ventriculaires pourrait intervenir dans cette attraction (Matise et al., 1999). Cette hypothèse ne fut malheureusement pas plus approfondie. L'analyse d'un mutant enlevant spécifiquement la Nétrine-1 à la plaque du plancher serait donc l'unique solution permettant de comprendre le rôle de cette molécule de guidage à la ligne médiane ventrale.

2.1.4.3 Rôle de la Nétrine-1 en dehors de la plaque du plancher et autres systèmes

La Nétrine-1 produite en dehors de la plaque du plancher joue aussi un rôle important dans la mise en place du SNC et périphérique. Elle est notamment exprimée dans la partie dorso-latérale de la moelle épinière, dans le cerveau

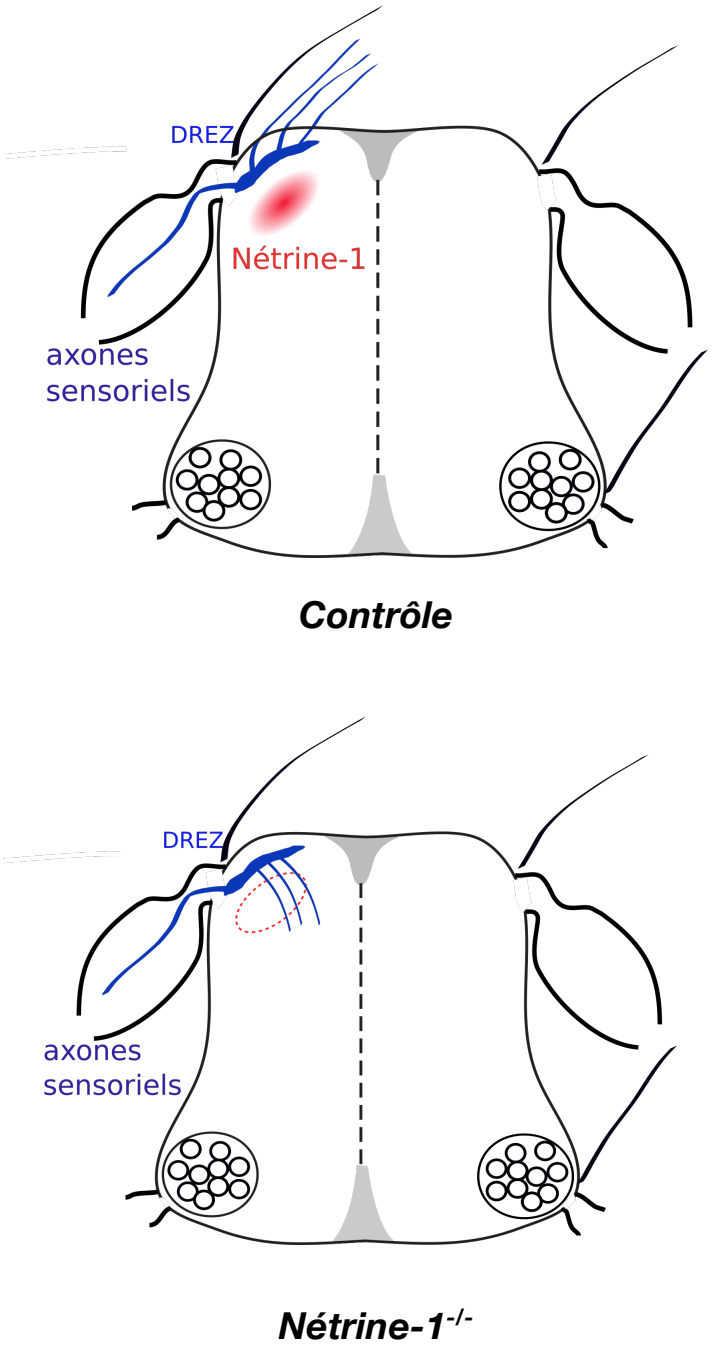


Figure 20 : Projections sensorielles chez les *Nétrine-1* KO
Schémas de moelle épinière d'embryon de souris. Les projections sensorielles arrivent dans la moelle épinière par la DREZ, forment le funicule dorsal et projettent longitudinalement. L'absence de Nétrine-1 dans la partie dorsale induit une invasion du manteau de la moelle épinière par les afférences sensitives. (D'apres Watanabe et al., 2006)

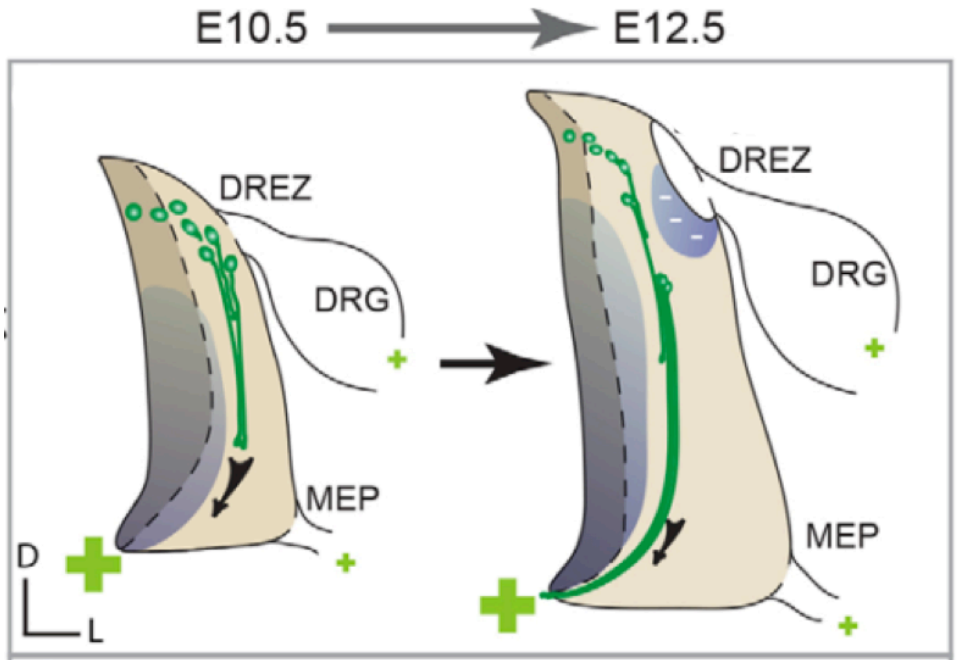
antérieur et dans le système nerveux périphérique et présente des fonctions distinctes dans chacun de ces systèmes.

2.1.4.3.1 Projections sensorielles

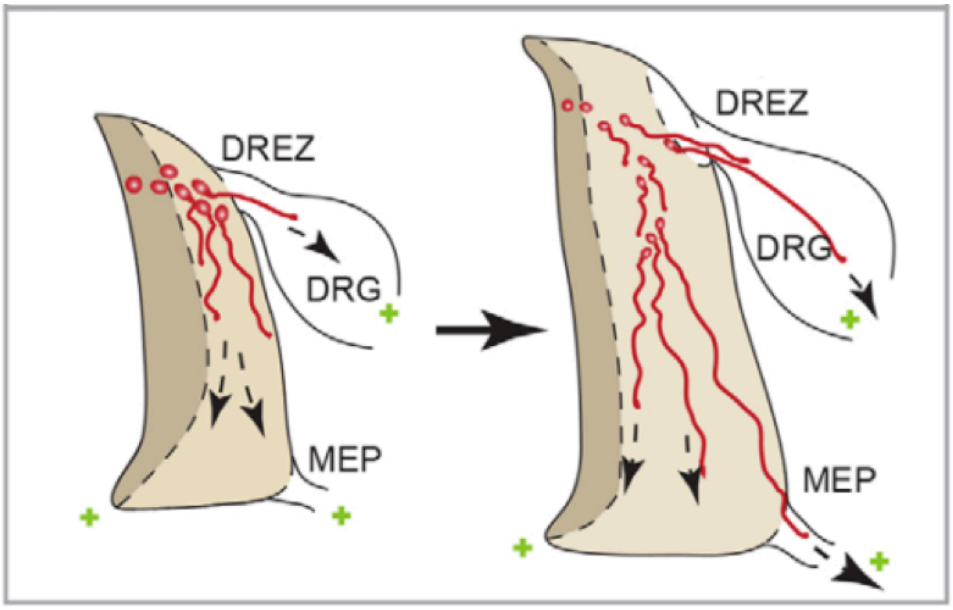
Comme mentionné précédemment, la Nétrine-1 est aussi exprimée dans la partie dorso-latérale de la moelle épinière au niveau des racines dorsales, le point d'entrée des axones des ganglions rachidiens (Serafini et al., 1996), ou DREZ. L'absence de Nétrine-1 dans la partie dorsale induit une invasion du manteau de la moelle épinière par les afférences sensitives qui en sont normalement repoussées Figure 20. Cette action répulsive met en jeu le récepteur UNC5h3 (Watanabe et al., 2006). De plus, aux âges précoces de développement (E10,5) certains axones des ganglions rachidiens ne projettent pas vers la DREZ mais s'orientent vers les régions ventrales et intermédiaires de la moelle épinière. Ce défaut est transitoire car à E13,5 aucune projection aberrante des DRGs (Dorsal Root Ganglion) n'a été observée (Masuda et al., 2008).

2.1.4.3.2 Rôle de la Nétrine-1 dans le confinement des axones dans le système nerveux central

Des axones commissuraux quittent de façon aberrante le SNC aux points de sortie de la moelle épinière chez les souris mutantes *Nétrine-1* KO (Laumonnerie et al., 2014) (Figure 21). Il est suggéré que le confinement des axones dans le SNC est régulé par une combinaison d'au moins trois mécanismes. Tout d'abord, une forte attraction ventrale par le couple Nétrine-DCC permettrait d'empêcher les axones commissuraux de se diriger vers les points de sortie. De plus, l'expression dorso-latérale de Nétrine-1 formerait une barrière chimiotropique empêchant les interneurones de se positionner proche de la DREZ. Pour finir, un mécanisme inconnu dépendant de Nétrine-1/DCC empêcherait les axones de quitter le SNC. Ce mécanisme qui suggère un rôle répulsif de la Nétrine-1 ne serait pas dépendant du récepteur Unc-5 car aucun axone commissural ne quitte le SNC chez les KO *Unc-5*.



Contrôle



Nétrine-1$^{-/-}$

Figure 21 : Rôle de la Nétrine-1 dans le confinement des commissures cérébrales dans le SNC
Chez les embryons sauvages à E10,5 un fort signal attractif (gris) par la Nétrine-1 ventrale dirige les axones à la plaque du plancher. Entre E11,5 et E12,5 une barrière latérale de la Nétrine-1 chimio-inhibitrice (gris avec lignes blanches) se forme, adjacent à la DREZ, et repousse les axones de cette région. Chez les embryons *Nétrine-1* KO, l'absence d'attraction ventrale et de barrière chimio-inhibitrice induit une sortie des axones commissuraux dans le système nerveux périphérique aux niveaux de la DREZ et du MEP.
(Laumonnerie et al., 2014)

2.1.4.3.3 Autres phénotypes dans le SNC

A des niveaux plus rostraux, de nombreuses structures sont aussi affectées chez les KO Nétrine-1. Le corps calleux, la commissure antérieure et la commissure hippocampique sont absents (Serafini et al., 1996). La taille du faisceau cortico-spinal est sévèrement réduite (Finger et al., 2002) et les axones qui projettent de l'habenula médiane au noyau interpédonculaire (IPN) par le fasciculus retroflexus ne traversent pas la plaque du plancher et sont fortement défasciculé (Schmidt et al., 2014; voir Annexe1). Pour finir, le nerf optique des souris mutantes est hypoplasique (Deiner et al., 1997).

2.1.4.3.4 Nétrine-1 : un facteur de survie ?

Comme mentionné précédemment, durant le développement du SNC, la Nétrine-1 agit non seulement comme molécule de guidage axonal mais aussi comme facteur de survie via les récepteurs DCC et UNC-5 (Llambi et al., 2001). En absence de Nétrine-1 les cellules exprimant DCC ou UNC-5 déclenchent une signalisation pro-apoptotique conduisant à l'élimination des cellules. Ce mécanisme permettrait aux cellules tumorales mutées pour DCC ou UNC5 d'échapper à l'apoptose et ainsi de proliférer et migrer dans les tumeurs. De même, l'expression anormale de Nétrine-1 observée dans certains cancers (Latil et al., 2003) protègerait aussi les cellules tumorales de la mort (Figure 22). Bien que le rôle développemental de ce processus ne soit pas entièrement compris, il pourrait contribuer à l'élimination des axones qui projettent en dehors de leur territoire normal, riche en Nétrine-1, et ainsi éviter des erreurs de guidage axonal. Ce contrôle de la mort cellulaire représente donc un mécanisme important dans la mise en place des circuits neuronaux dans le SNC en développement.

En accord avec cette théorie, une diminution du nombre de neurones olivaires et pontins a été décrite chez les souris mutantes Nétrine-1 KO (Bloch-Gallego et al., 1999; Yee et al., 1999). Toutefois, ce résultat est controversé et d'autres études récentes n'ont pas permis de mettre en évidence d'élévation de la mort neuronale chez les KO complets de la Nétrine-1 non hypomorphe (Bin et al., 2015; Yung et al., 2015). De plus seules certaines études ont montré une augmentation de l'apoptose par marquage TUNEL dans le tronc cérébral et la moelle épinière de KO Nétrine-1

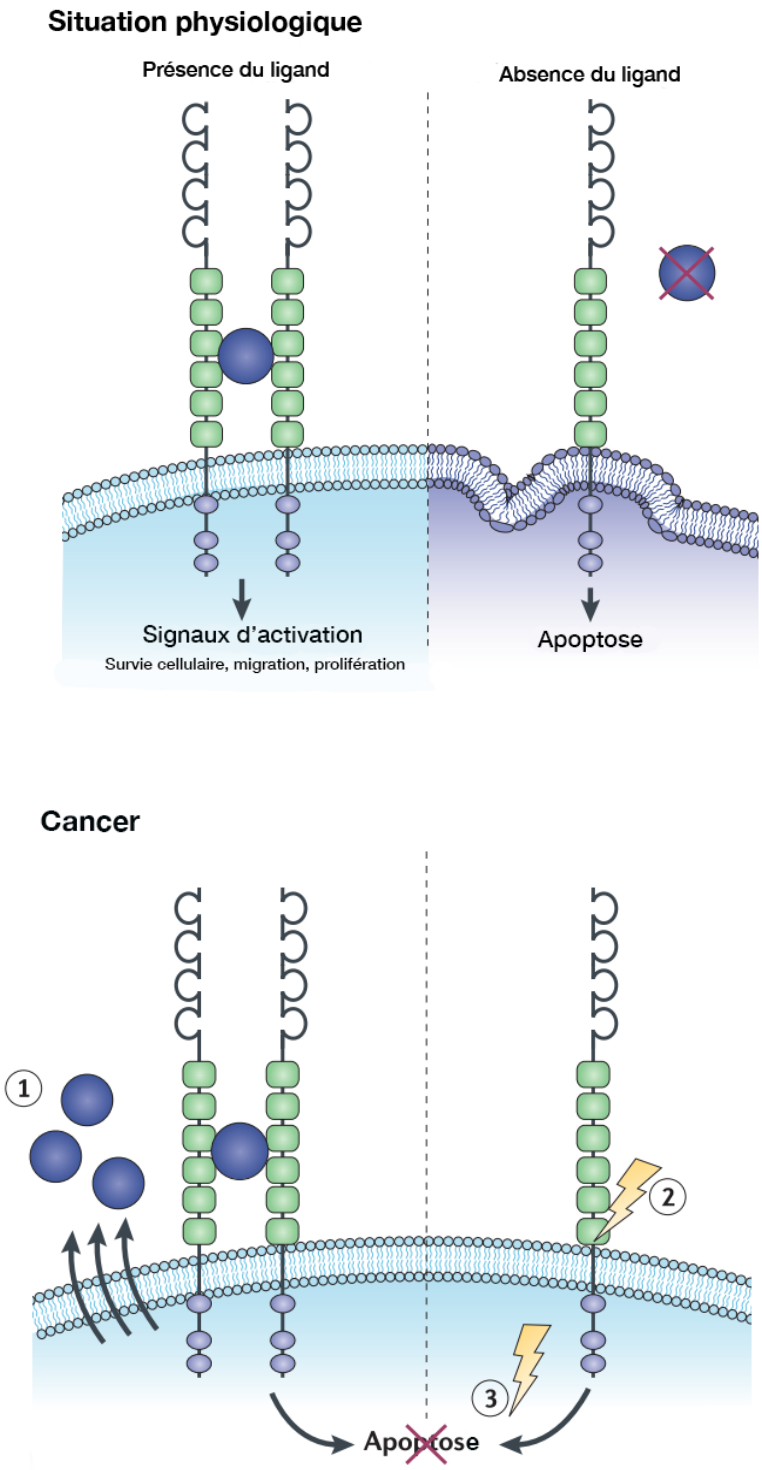


Figure 22 : Nétrine-1 et les récepteurs à dépendances

(A) En situation physiologique les récepteurs à dépendances DCC et Unc-5 sont capables d'induire deux types de signaux en fonction de la présence ou non de leur ligand. En présence de ligand, ils induisent des signaux d'activation connus pour promouvoir la survie cellulaire, la migration et la prolifération. En absence du ligand, ils initient une mort cellulaire apoptotique.

(B) Dans les cellules tumorales trois principaux avantages sélectifs peuvent être acquis impliquant la voie de signalisation des récepteurs à dépendance. Une production autocrine du ligand (1), une perte de fonction du récepteur (2) et une perte d'un partenaire pro-apoptotique (3), tous empêchent l'activation de la mort cellulaire apoptotique.

(Mehlen et al., 2011)

hypomorphe (Furne et al., 2008; Llambi et al., 2001) alors que d'autres auteurs n'ont rien trouvé de notable (Williams et al., 2006). Il faut souligner que les populations de neurones étudiées étaient différentes et qu'il est aussi possible que la mort intervienne après la naissance et qu'elle n'est pas encore eu lieu chez les embryons étudiés. En conclusion, le rôle de la Netrine-1 dans l'apoptose développementale reste à confirmer dans le SNC.

2.1.4.3.5 Fonction de la Nétrine-1 en dehors du système nerveux central

La Nétrine-1 et ses récepteurs sont aussi exprimés dans de nombreux tissus en dehors du SNC où ils jouent un rôle clé dans la morphogenèse de certaines structures. Pour exemple, il a été montré que la Nétrine-1 est exprimée dans l'épithélium otique et facilite la formation des canaux semi-circulaires de l'oreille interne (Salminen et al., 2000). La Nétrine-1 est aussi exprimée dans le pancréas en développement (De Breuck et al., 2003; Yebra et al., 2003), les poumons (Dalvin et al., 2003; Liu et al., 2004) les glandes mammaires (Srinivasan et al., 2003) et régule l'adhésion cellulaire, la migration, la différenciation, l'angiogenèse ainsi que la tumorigenèse.

2.1.5 Conclusion

La Nétrine-1 a été principalement étudiée pour son rôle attractif à la plaque du plancher. Cependant, à ce jour le rôle physiologique de la Nétrine-1 n'a été mis en évidence qu'à travers l'étude de mutants chez lesquels son expression est inactivée de manière globale. Une délétion spécifique, ciblée, de la protéine dans seulement certaines des cellules qui l'exprime serait plus adaptée pour comprendre son rôle dans le SNC, notamment postnatal.

2.2 Slit et Robo

Comme montré précédemment, les axones commissuraux sont attirés ventralement par un signal attractif, possiblement généré par un gradient de Nétrine-1. Cependant, il a été montré que la plaque du plancher était aussi une source de

signaux répulsifs (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995; Tamada et al., 1995) et que les axones des neurones commissuraux ne sont plus sensibles aux facteurs attractifs sécrétés par la ligne médiane une fois qu'ils ont traversé celle-ci (Shirasaki et al., 1998). En effet, un explant de plaque du plancher ectopique peut dévier et attirer des axones commissuraux seulement si ces dernières n'ont pas déjà été en contact avec la plaque du plancher (Shirasaki et al., 1998). Ce changement de réponse pourrait s'expliquer par le fait que les axones post-commissuraux gagneraient au passage de la plaque du plancher une sensibilité aux molécules répulsives sécrétées par la ligne médiane et perdraient leur attirance pour la Nétrine-1. Ce mécanisme éviterait aux axones commissuraux de rester au niveau de la plaque du plancher, une cible intermédiaire, et ainsi de continuer leur croissance vers leur destination finale.

2.2.1 Slit : une molécule répulsive de la plaque du plancher

La protéine Slit a été la première molécule répulsive identifiée à la ligne médiane du SNC. Elle a tout d'abord été identifiée par crible génétique chez le mutant *slit* de drosophile qui est caractérisé par une accumulation d'axones au niveau de la ligne médiane (Kidd et al., 1999) (Figure 23a). Les résultats précédemment obtenus sur la Nétrine-1 avaient montré une conservation à travers les espèces des mécanismes de guidage axonal à la ligne médiane ventrale (Harris et al., 1996; Ishii et al., 1992; Kennedy et al., 1994; Kolodziej et al., 1996; Mitchell et al., 1996; Serafini et al., 1994). Ceci a conduit plusieurs équipes à rechercher les gènes orthologues de Slit chez les vertébrés et à en identifier trois chez la souris *Slit1-Sli* (Li et al., 1999). Par ailleurs deux études biochimiques parallèles et non ciblées, visant à identifier des molécules contrôlant la formation de branches axonales collatérales par les axones sensoriels (Wang et al., 1999c) ou le collapsus des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (Niclou et al., 2000) ont aussi conduit à la purification de Slit2.

Chez les mammifères les trois gènes *Slit* sont exprimés dans le SNC en développement (Brose et al., 1999). Les Slits sont des glycoprotéines possédant un peptide signal N-terminal, 22 motifs répétés riches en leucine (LRR ou Leucine-Rich

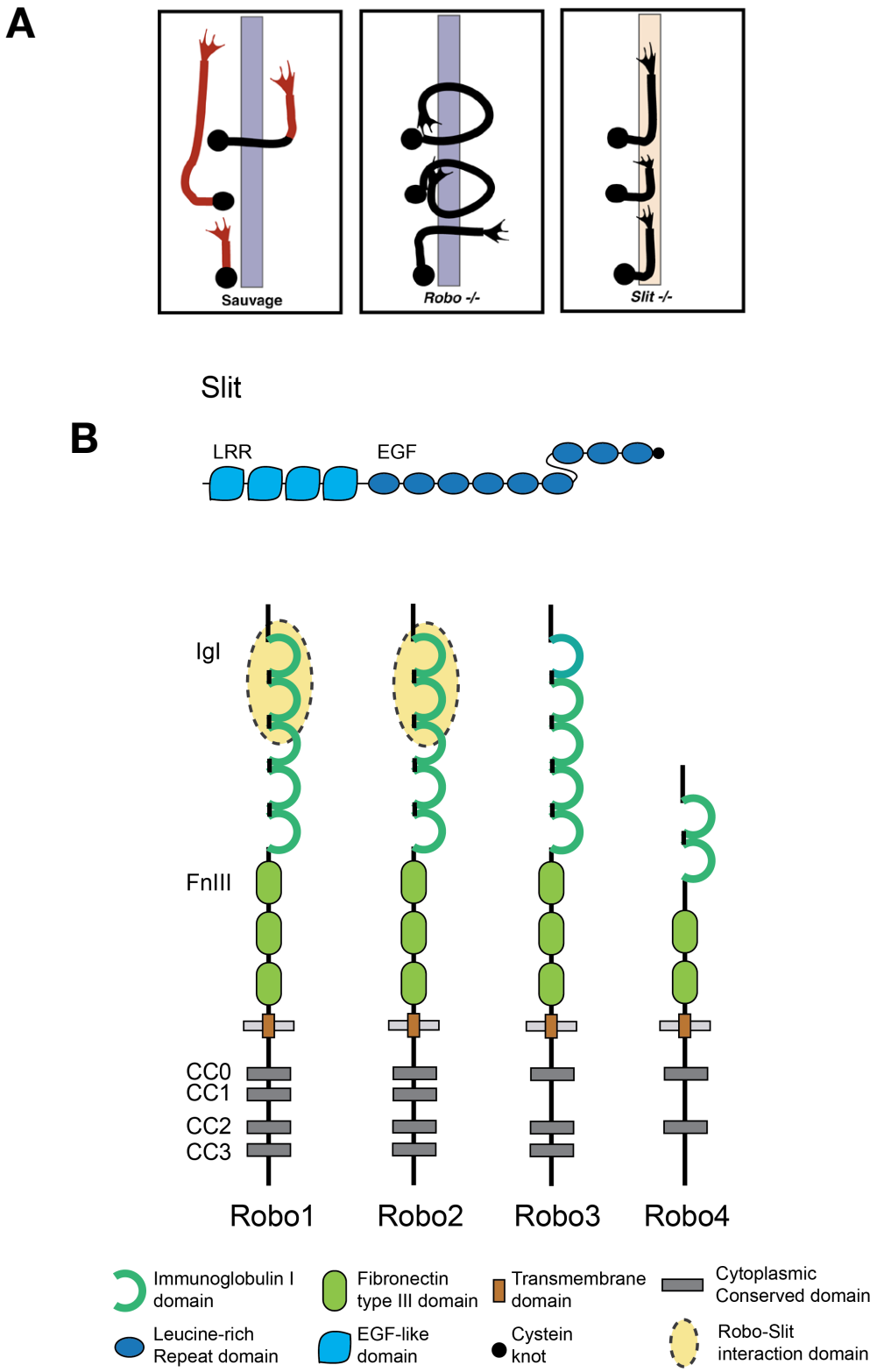


Figure 23 :
(A) Phénotypes des mutants Slit/Robo chez la drosophile
Les axones exprimant Robo (rouge) ne croisent pas la ligne médiane qui exprime Slit (axe bleu). Les axones commissuraux n'expriment Robo qu'une fois la ligne médiane croisée. Chez les mutants *Robo* ces axones croisent plusieurs fois la ligne médiane. Chez les mutants Slit ils entrent dans la ligne médiane mais ne la quittent pas.
(B) Slit et les récepteurs Robo chez la souris
Schémas représentant la structure des protéines Slit et des récepteurs Robo1-4. Seuls les récepteurs Robo1-2 se lient à Slit (en jaune le site d'interaction).

Repeats) divisés en quatre domaines (D1-D4), cinq à sept séquences EGF (epidermal growth factor), un domaine Agrine/laminine/Perlecan/Slit et un domaine terminal à nœud cystéine (Figure23b). Slit2 et probablement Slit1 sont clivés au niveau de leur domaine EGF par l'action d'une protéase non connue pour le moment (Brose et al., 1999; Wang et al., 1999c). Le rôle de ces différents fragments dans l'action de Slit au cours du développement sera détaillé dans une partie ultérieure. Les héparanes sulfates forment un complexe ternaire en se liant à la fois à Robo et à Slit et permettent de stabiliser leur interaction à la membrane. Contrairement à ce qui a été proposé pour la Nétrine-1, Slit1-3 dans la plaque du plancher ne diffuseraient pas sous forme de gradient mais auraient un champs d'action restreint (Brose et al., 1999).

2.2.2 Les récepteurs Robo

Le récepteur Robo a été découvert lors d'un crible génétique ciblant les défauts de croissance des axones commissuraux chez la drosophile (Seeger et al., 1993). Ce n'est que six ans plus tard que ce récepteur fut associé à Slit (Kidd et al., 1999). La raison pour laquelle le lien entre les deux molécules est resté si longtemps inconnu est que le mutant *Robo* ne possède pas le même phénotype que le mutant Slit. Chez le mutant *Robo* les axones commissuraux croisent à plusieurs reprises la ligne médiane mais ne s'y arrêtent pas (Figure 23a). Cette différence de phénotype s'explique par l'existence de plusieurs gènes *Robo* qui agissent de manière partiellement redondante. Le lien Slit/Robo a finalement pu être établi grâce à l'étude des mutants hypomorphes et des doubles mutants *Slit/Robo* (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Li et al., 1999).

Il existe quatre homologues de *Robo* chez les mammifères : *Robo1, Robo2, Robo3* et *Robo4* (Brose et al., 1999; Jen et al., 2004; Li et al., 1999). A l'exception de Robo4, l'ensemble des Robo est exprimé dans le système nerveux. Le récepteur Robo4 est exprimé par les cellules endothéliales et serait impliqué dans la perméabilité vasculaire (Bedell et al., 2005; Jones et al., 2008). Les caractéristiques et le rôle de Robo3 au cours de la mise en place des commissures seront développés ultérieurement. Des données récentes (Koch et al., 2011; Rama et al., 2015; Zelina et al., 2014) montrent que Robo1 et Robo2 sont les seuls récepteurs

Robo à se lier aux Slit chez les mammifères et à induire la répulsion des axones (Brose et al., 1999). Les Robo appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ils contiennent cinq motifs Ig, trois domaines FNIII (fibronectine III) et trois à quatre domaines cytoplasmiques conservés (CC0-CC3) (Kidd et al., 1998) (Figure 23b). Ils fixent les Slit par l'intermédiaire du deuxième domaine LRR de Slit (appelé D2) et du premier domaine Ig de Robo (Howitt et al., 2004; Morlot et al., 2007). De façon intéressante, les récepteurs Robo peuvent eux aussi être clivés *in vitro* (Chen et al., 2008; Clark et al., 2002; Dalkic et al., 2006; Yuan et al., 1999). Chez la drosophile, Robo est clivée par la métalloprotéase Kuzbanian /ADAM10 provoquant le recrutement de protéines intracellulaires impliquées dans la répulsion du cône de croissance (Coleman et al., 2010).

2.2.3 Guidage axonal par Slit et Robo

2.2.3.1 Axones commissuraux de la moelle épinière

Dans la moelle épinière, les trois protéines Slit sont exprimées dans la plaque du plancher et dans les motoneurones. Leurs récepteurs Robo1/2 sont exprimés dans les axones commissuraux et dans les motoneurones (Brose et al., 1999). Chez le triple mutant *Slit1/2/3*, les axones projettent normalement vers la partie ventrale, mais, arrivés à la plaque du plancher les axones sont désorganisés et semblent défasciculés (Long et al., 2004) (Figure 24). Le marquage du funiculus ventral avec l'anticorps TAG-1, permettant de visualiser les axones post-commissuraux, est quasiment absent chez les mutants suggérant que peu d'axones quittent la plaque du plancher (Long et al., 2004). Les traçages rétrogrades effectués sur ces mutants dans la moelle épinière confirment cette hypothèse et montrent que certains axones recroisent la plaque du plancher et se projettent du côté ipsilatéral (Long et al., 2004). Ces résultats suggèrent que les Slit exprimés à la plaque du plancher sont requis pour repousser les axones commissuraux de cette cible intermédiaire. Les doubles mutants *Slit1/Slit2* ne présentent pas de défauts de guidage notables dans la moelle épinière, et seule l'inactivation simultanée des trois Slit perturbe la décussation des axones commissuraux (Long et al., 2004). Ceci démontre

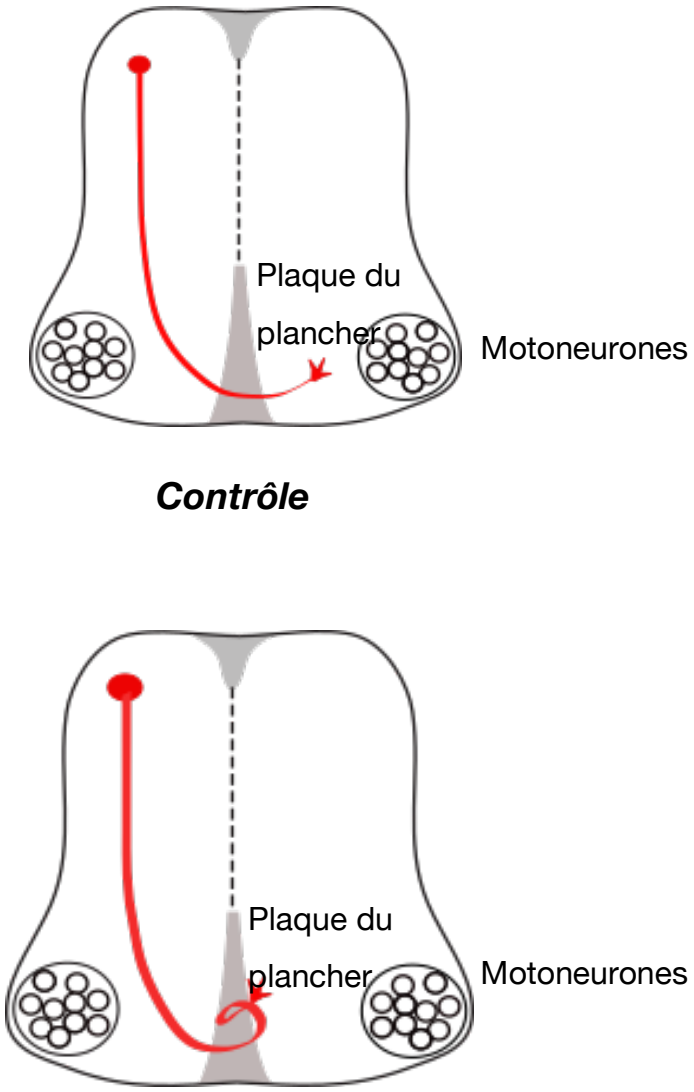


Figure 24 : Commissures cérébrales chez les mutants *Slit*/*Robo* KO
Schémas d'une coupe coronale de moelle épinière d'embryon de souris. Chez les triples mutants *Slit1-3* KO et doubles mutants *Robo1-2* KO, les axones projettent normalement vers la partie ventrale, mais, arrivés à la plaque du plancher certains la recroisent et projettent du côté ipsilatéral.

l'importante redondance fonctionnelle des Slit qui sont souvent co-exprimés dans le système nerveux (Bagri et al., 2002; Marillat et al., 2002).

L'étude des doubles mutants *Robo1/Robo2* ne révèle pas de défauts de guidage des axones commissuraux par immuno-marquage mais des traçages axonaux (par DiI) ont permis de mettre en évidence que certains axones sont incapables de sortir de la plaque du plancher sans toutefois la recroiser comme chez les triples mutants *Slit* (Jaworski et al., 2010) (Figure 24). Ce phénotype, beaucoup moins sévère que chez les triples mutants *Slit1/2/3* suggère que certaines fonctions des Slit puissent être indépendantes de Robo1/2, et donc l'existence possible d'autres récepteurs des Slit. L'étude des simples mutants *Robo1* et *Robo2* ont aussi mis en évidence un rôle distinct des deux récepteurs. Robo1 permettrait d'empêcher les axones de rester bloqués à la plaque du plancher tandis que Robo2 serait nécessaire aux axones pour quitter la plaque du plancher et se projeter latéralement.

2.2.3.2 Transition de l'attraction à la répulsion lors du passage à la ligne médiane

Les axones commissuraux sont dans un premier temps attirés par un gradient de Nétrine-1 vers la plaque du plancher, puis repoussés de celle ci par les Slit afin de projeter du côté controlatéral. Cependant, l'ensemble de ces signaux attractifs et répulsifs semblent être présents tout au long du trajet suivi par les axones commissuraux et la question se pose donc de l'intégration des différents signaux avant et après le croisement.

Selon le modèle actuel chez la souris, Robo3 inhiberait l'action répulsive de Robo1/2 dans les axones en croissance vers la plaque du plancher par un mécanisme encore inconnu (Sabatier et al., 2004). L'expression de Robo3 serait réprimée après la traversée de la ligne médiane permettant alors l'activation de la répulsion Slit/Robo. De plus, l'interaction de DCC et de Robo1, induite par Slit inhiberait l'activité attractive de la Nétrine-1 (Stein and Tessier-Lavigne, 2001) (Figure 25). Ce modèle fut récemment remis en cause par une étude qui a montré que Robo3 jouerait plutôt un rôle dans l'attraction par interaction avec le récepteur DCC (Zelina et al., 2014).

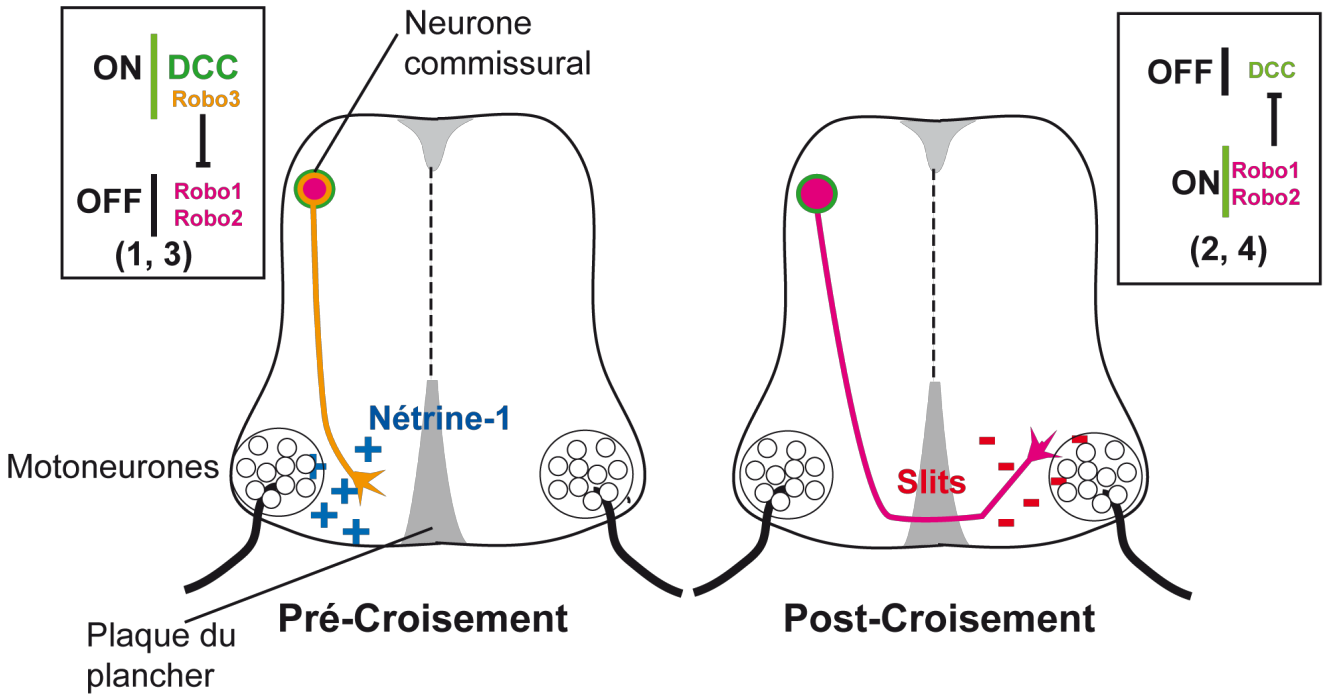


Figure 25. Changement d'expression des molécules à la surface du cône de croissance au niveau de la plaque du plancher

Les changements moléculaires sont indiqués pour un axone commissural avant (gauche) et après (droite) le passage de la ligne médiane. Avant le passage de la ligne médiane, la réponse des récepteurs Robo1 et 2 aux molécules Slit répulsives serait inhibée par Robo3. Nétrine-1 se lie à DCC induisant des signaux attractifs. Une fois la ligne médiane traversée, l'absence de Robo3 permet à Robo1 et 2 d'une part de se lier aux molécules Slit ce qui induit des signaux répulsifs et d'autre part de se lier à DCC et inhiber les signaux attractifs.

2.2.3.3 Rôle de Slit et Robo dans les motoneurones

Les récepteurs Robo1/2, tout comme Slit2 et Slit3, sont exprimés par les motoneurones (Brose et al., 1999). *In vitro*, une source de Slit2 est capable de repousser les axones des motoneurones spinaux (Brose et al., 1999) et chez les doubles mutants *Robo1/2*, les axones moteurs spinaux projettent anormalement vers la plaque du plancher (Bai et al., 2011). Ces résultats suggèrent que Slit/Robo contribuent à repousser les axones moteurs de la plaque du plancher. Cependant aucune étude du développement des axones moteurs n'a été réalisée sur les KO *Slit1/2.* Sachant que Slit2 et Slit3 sont exprimées à la plaque du plancher mais aussi dans les motoneurones, la question de la source de Slit2/3 induisant la répulsion des axones moteurs se pose. Les protéines Slits fonctionnant probablement à courte portée (Brose et al., 1999) il a été suggéré que Slit2/3 pourrait agir de manière cellulaire autonome dans les motoneurones pour empêcher l'attraction de leurs axones vers la Nétrine-1 à la plaque du plancher (Bai et al., 2011). La sécrétion de Slit2/3 par les motoneurones entrainerait l'interaction de Robo avec DCC dans les axones moteurs, bloquant ainsi l'action de la Nétrine-1 (Figure 26). Ce modèle d'auto-inactivation se rapproche donc de celui qui a été proposé pour expliquer la suppression de l'attraction des axones commissuraux par la plaque du plancher décrite ci-dessus. Il faut noter qu'il est basé principalement sur des données *in vitro* et que l'implication des Slits n'a pas été démontrée. Toutefois, une fonction cellulaire autonome de Slit2 a été mise en évidence dans le développement du nerf phrénique (Jaworski and Tessier-Lavigne, 2012). En effet, Slit2 et Slit3 ainsi que leurs récepteurs Robo1/2 sont exprimés dans les motoneurones du nerf phrénique. *In vitro,* Slit2 sécrété par les motoneurones régule la fasciculation des axones moteurs (Jaworski and Tessier-Lavigne, 2012). *In vivo,* chez les embryons déficients pour les gènes *Slits* et *Robos* les axones moteurs du nerf phrénique, sont défasciculés (Jaworski and Tessier-Lavigne, 2012). Cette hypothèse est aussi basée sur l'absence de Slit2 des muscles (Jaworski and Tessier-Lavigne, 2012), mais une étude récente montre que chez la souris, Slit2 est bien exprimé par les muscles (Saller et al., 2016) ce qui pourrait remettre en cause ce modèle.

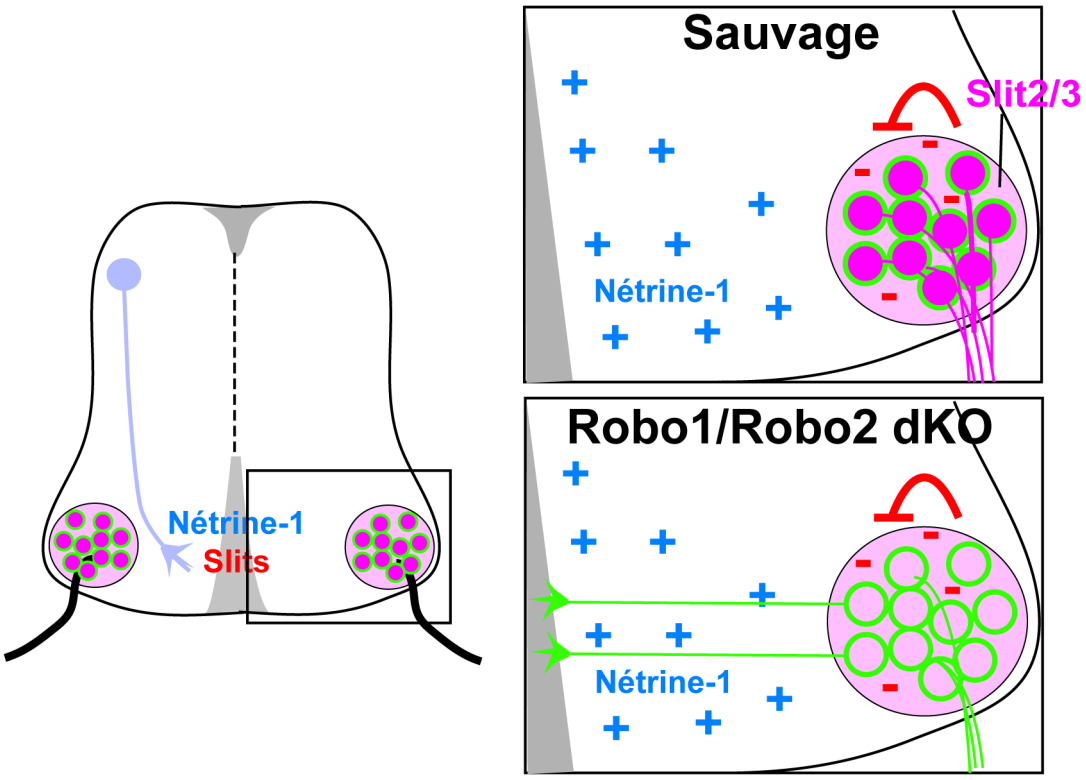


Figure 26. Mécanisme d'auto inactivation des motoneurones dans la moelle épinière
Les motoneurones expriment Slit2 et Slit3 (rouge) ainsi que Robo1/2 (rose) et DCC (vert). Slit2/3 agiraient de manière autocrine en se fixant sur Robo1/2 ce qui entrainerait leurs interactions avec DCC dans les motoneurones. Ceci rendrait les axones moteurs insensibles à l'action attractive de la Nétrine-1 sécrétée à la ligne médiane (on parle d'auto-silencing). Chez les mutants déficients pour *Robo1/2* , DCC n'est plus inactivé et certains axones moteurs vont alors croître en direction de la ligne médiane.
(Adapté de Bai et al., 2011).

2.2.3.4 Les faisceaux longitudinaux

Dans les régions caudales du SNC, les axones longitudinaux sont les premiers axones à se mettre en place lors du développement (Mastick et al., 2010). Leurs neurones sont localisés dans le cerveau antérieur et le mésencéphale, leurs axones projettent parallèlement à la ligne médiane sans la croiser afin de relayer les informations jusqu'à la moelle épinière. Ils forment trois fascicules qui se distinguent par leur positionnement dans le tronc cérébral et la moelle épinière : le funicule médian (MLF), intermédiaire (IMF) et latéral (LMF) (Figure 27). De façon logique, il a été suggéré que les molécules répulsives sécrétées par la plaque du plancher pouvaient influencer cette trajectoire et des expériences menées *in vitro* et *in vivo* semblent confirmer cette hypothèse (Farmer et al., 2008; Kim et al., 2014). Chez les doubles mutants *Slit* les axones MLF, IMF LMF présentent des défauts de guidage et beaucoup d'axones rentrent dans la plaque du plancher (Farmer et al., 2008; Kim et al., 2014). Ce même phénotype est observé chez les doubles mutants *Robo1-2* (Kim et al., 2014). Ces résultats, montrent que le couple Slit/Robo permettrait le bon positionnement des faisceaux longitudinaux le long de la ligne médiane ventrale. De façon intéressante il a aussi été montré dans la même étude que la trajectoire de ces axones était dépendante non seulement de la répulsion Slit/Robo mais aussi de l'attraction de la Nétrine-1 à la plaque du plancher. Ainsi, une balance entre signaux attractifs et répulsifs, intégrés simultanément par les axones longitudinaux, permettrait de les positionner le long de l'axe du SNC.

2.2.3.5 Autres systèmes

Le couple Slit/Robo joue un rôle crucial dans le guidage des axones du cerveau antérieur. Les axones du tractus olfactif latéral projettent de façon aberrante chez les mutants *Slits* et *Robos* en l'absence de Slit2 dans le septum ou de Robo1/2 dans les axones olfactifs (Fouquet et al., 2007; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002). Par ailleurs, chez les mutants *Slit1-2*, le corps calleux est quasiment absent tandis que chez les mutants *Robo1-2* certains axones parviennent toujours à franchir la ligne médiane (Andrews et al., 2006; López-Bendito et al., 2007; Unni et al., 2012). De manière originale, Slit1 réparti en gradient dans le corridor de neurones indicateurs jouent aussi un rôle dans le guidage des axones thalamocorticaux exprimant Robo2

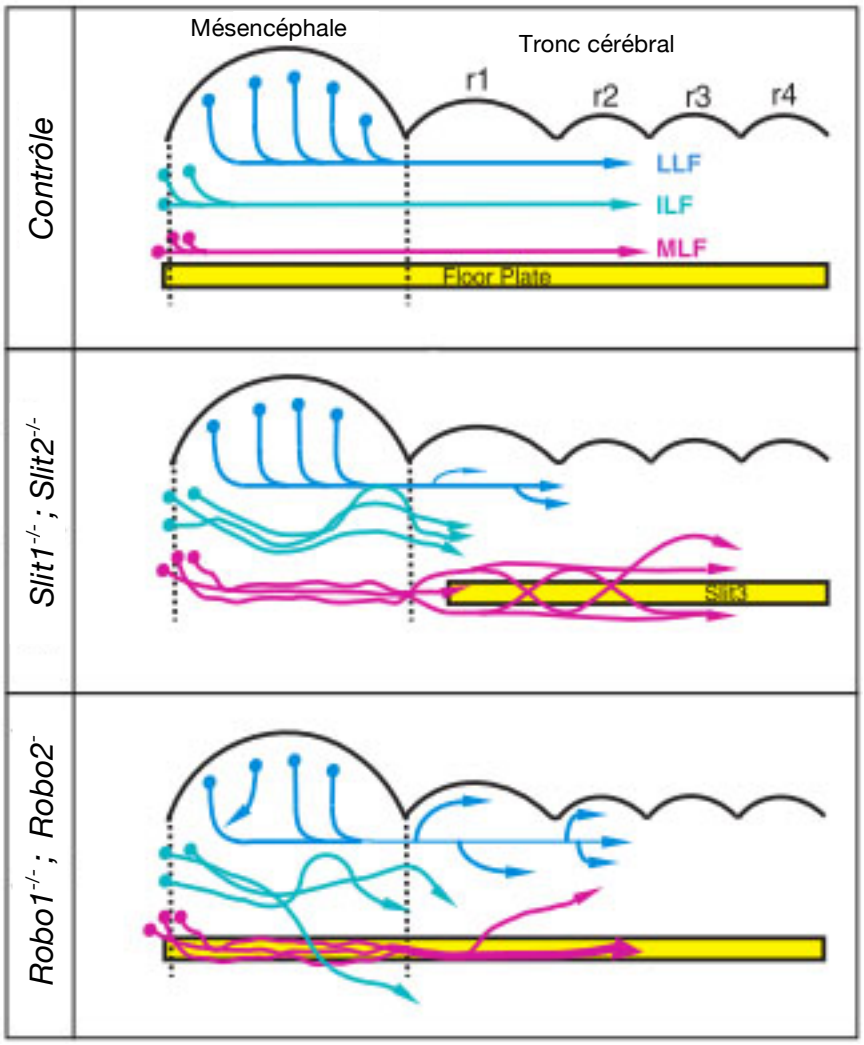


Figure 27. Rôle de Slit/Robo dans la mise en place des faisceaux longitudinaux
Schémas d'une vue dorsale d'un tronc cérébral d'embryon de souris. Les axones longitudinaux proviennent du mésencéphale et du tronc cérébral et projettent leurs axones parallèlement à la ligne médiane sans la croiser. Chez les mutants *Slit1-2* et *Robo1-2*, les axones MLF, IMF LMF présentent des défauts de guidage et beaucoup d'axones rentrent dans la plaque du plancher.
(Farmer et al., 2008)

(Bielle et al., 2011; López-Bendito et al., 2007). Dans le système visuel, Slit1/2 repoussent les cônes de croissance des cellules ganglionnaires de la rétine et augmente la fasciculation de leurs axones (Erskine et al., 2000; Niclou et al., 2000; Ringstedt et al., 2000). En effet, les mutants *Slit1/2* présentent d'importants défauts des projections rétiniennes : formation d'un second chiasma optique et croissance aberrante des axones rétiniens dans la voie optique controlatérale. Enfin, chez les mutants *Robo1/2* les axones issus des noyaux habenulaires se trouvent défasciculés en arrivant à l'IPN. Certains croisent la ligne médiane, mais beaucoup restent du côté ipsilatéral. Ce phénotype diffère légèrement chez les mutants *Slit1/2* où les axones du fasciculus retroflexus suivent anormalement la plaque du plancher vers le tronc cérébral ou le diencéphale (Belle et al., 2014).

2.2.4 Rôle de Slit/Robo dans la migration cellulaire

Le rôle du couple Slit/Robo dans la migration des neurones au cours du développement et dans le cerveau adulte a été mis en évidence dans plusieurs systèmes. Cette fonction a été montrée pour la première fois dans la migration des neurones olfactifs dans le cerveau antérieur postnatal où les Slits sont sécrétées par les plexus choroïdes et le septum repoussant ainsi les neurones issus de la zone subventriculaire antérieurement vers le bulbe olfactif (Hu, 1999; Nguyen-Ba- Charvet et al., 2004; Sawamoto et al., 2006; Wu et al., 1999). Je vais ici décrire le rôle des Slits et Robos dans la migration des neurones précérébelleux.

2.2.4.1 L'olive inférieure

Dans une partie précédente, nous avons pu voir que les neurones olivaires étaient potentiellement guidés par le Nétrine-1 exprimée à la plaque du plancher (Bloch-Gallego et al., 1999; Causeret et al., 2002; Yee et al., 1999). Le corps cellulaire des neurones olivaires ne traverse pas la ligne médiane contrairement à leurs axones qui se projettent dans le cervelet du côté controlatéral (Figure 28a). Ceci suggère que des signaux répulsifs seraient impliqués. Les récepteurs Robo1 et 2 sont exprimés dans les neurones olivaires en cours de migration et Slit1-3 sont présents dans la plaque du plancher à ce stade (Causeret et al., 2002; Di Meglio et al., 2008). *In vitro*,

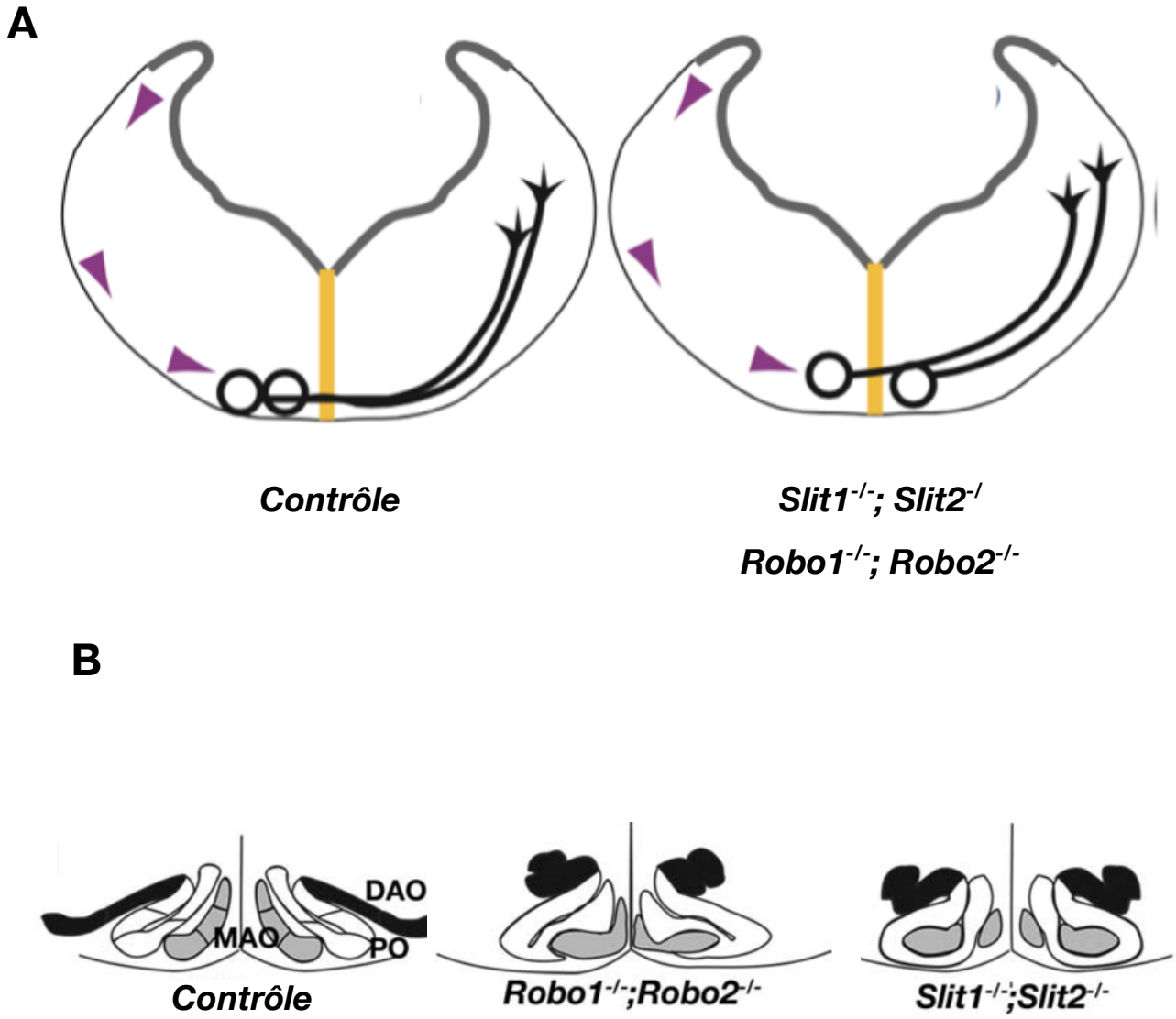
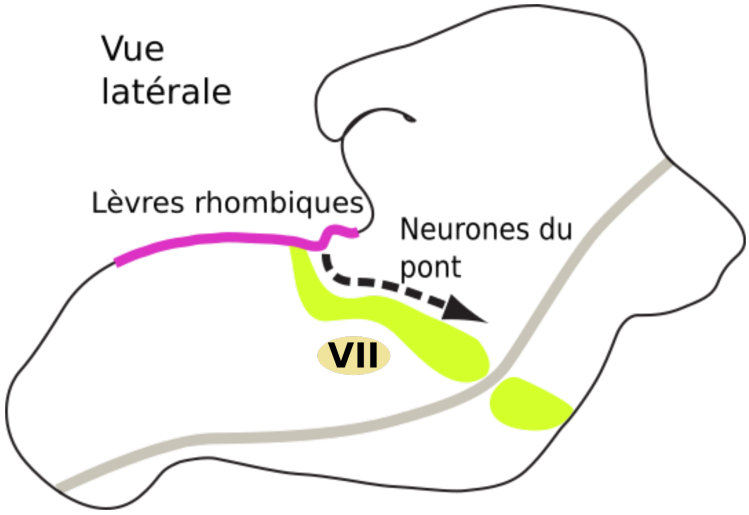


Figure 28 : Le complexe olivaire chez les mutants S*lit*/*Robo* KO
Coupe coronale de tronc cérébral d'embryon de souris. Chez les mutants *Slit1-2* KO et *Robo1/2* KO, une partie des neurones olivaires traversent anormalement la plaque du plancher et forment des projections bilatérales **(A)**. De plus, la morphologie globale du complexe olivaire est affectée chez ces mutants **(B)**.
(Di Meglio et al., 2008; Sotelo and Chédotal, 2013)

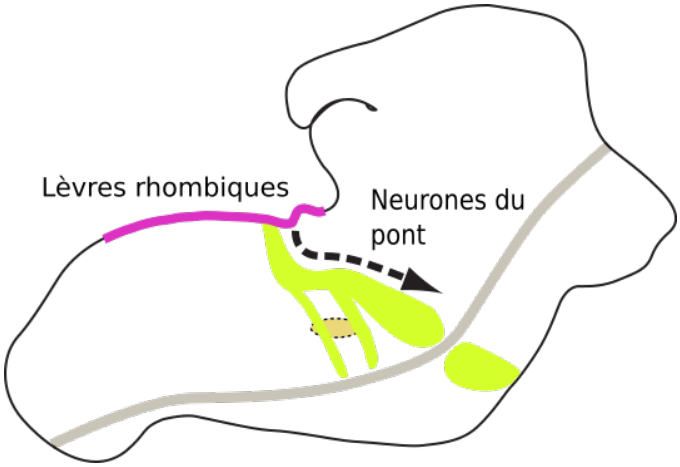
la présence de Slit2 induit une légère répulsion des axones des neurones olivaires mais n'a aucun effet sur la migration cellulaire (Causeret et al., 2002). Chez les doubles mutants *Slit1/2* et *Robo1/2* une fraction significative de neurones olivaires franchit la ligne médiane et migre du côté controlatéral. Ainsi chez ces mutants les projections olivaires sont bilatérales (Di Meglio et al., 2008). Contrairement au mutant Nétrine-1, aucune migration ectopique n'est observée et les neurones atteignent la ligne médiane. Cependant, la morphologie globale du complexe olivaire est affectée chez les mutants *Slit1-2* et *Robo1-2* où les neurones se retrouvent compactés et plus proches de la ligne médiane (Di Meglio et al., 2008)(Figure 28b). Ce système n'a pas été étudié dans le triple mutant *Slit1-3*, mais contrairement à la moelle épinière l'inactivation de deux gènes *Slits* semblent suffisants pour perturber la migration des neurones olivaires.

2.2.4.2 Le pont

Les neurones du pont en migration exprimeraient eux aussi les récepteurs Robo (Geisen et al., 2008). Les protéines Slit sont quant à elles présentes dans la plaque du plancher ainsi que dans certains noyaux moteurs crâniens tel que le noyau moteur facial (Geisen et al., 2008; Gilthorpe et al., 2002; Hammond et al., 2005). Chez les doubles mutants *Robo1-2* ainsi que les *Slit1-2* la première phase de migration n'est pas affectée. En revanche, lors de la deuxième phase de migration certains neurones pontiques sortent du courant de migration et migrent prématurément vers la plaque du plancher (Geisen et al., 2008) passant alors à proximité du noyau moteur du facial. Sachant que celui ci exprime Slit2 et Slit3 il a été proposé qu'il puisse jouer un rôle majeur dans le contrôle de la migration horizontale des neurones du pont en les maintenant en position dorsale (Figure 29). En accord avec cette hypothèse il a été montré qu'une partie des neurones du pont migrent aussi prématurément vers la plaque du plancher dans les KO du gène *phox2b* chez lesquels le noyau facial est absent (Geisen et al., 2008).



Contrôle



Slit1$^{-/-}$; Slit2$^{-/-}$; Slit3$^{-/-}$

Robo1$^{-/-}$; Robo2$^{-/-}$

Phox2b$^{-/-}$

Figure 29 : Migration des neurones du pont chez les mutants *Slit*/*Robo* KO
Schémas d'une vue latérale d'un tronc cérébral d'embryon de souris. Le même phénotype de défaut de guidage est observé chez les embryons déficients pour les gènes *Slit1-3* ; *Robo1-2* ; et *Phox2b*. La première phase de migration n'est pas affectée. En revanche, lors de la deuxième phase de migration certains neurones pontiques sortent du courant de migration et migrent prématurément vers la plaque du plancher.
(D'après Geisen et al., 2008)

2.2.5 Rôle des fragments protéolytiques de Slit

Deux fragments sont donc issus du clivage de Slit2: un fragment N-terminal et un fragment C-terminal. Ces deux fragments ainsi que la protéine entière sont présents dans le milieu extracellulaire (Brose et al., 1999; Li et al., 1999; Wang et al., 1999c). La plupart des effets induits par Slit2 ont été attribués au fragment N-terminal ou à la protéine entière qui sont les seuls à se lier aux récepteurs Robo1/2 (Chen et al., 2001; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2001a; Wang et al., 1999c). Le fragment N-terminal et la protéine entière sont capables de repousser les axones et les neurones (Chen et al., 2001; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2001a; Wang et al., 1999c). Le fragment N-terminal est aussi capable d'induire la ramification des axones des ganglions rachidiens tandis que la protéine entière antagonise cette activité. La fonction très étudiée du fragment N-terminal contraste avec le rôle méconnu du fragment C-terminal. En effet, l'absence du fragment C-terminal n'empêche en rien la liaison de Slit avec ses récepteurs et ne semble pas perturber pas son activité répulsive *in vitro* (Chen et al., 2001; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2001b). Une étude récente a pu finalement mettre en évidence le rôle du fragment C-terminal. Ce dernier aurait pour récepteur PlexinA1, présent à la surface des axones commissuraux et agirait, tout comme le fragment N-terminal, comme une molécule répulsive (Delloye-Bourgeois et al., 2014). Le mutant *PlexinA1* reproduit les défauts de guidage dans la moelle épinière observés chez les triples mutants *Slit1-3*. Rappelons que les doubles mutants *Robo1/2* ne reproduisaient pas ces phénotypes.

Le fragment C-terminal de Slit2 est aussi capable de se lier aux dystroglycanes, une protéine de la matrice extracellulaire. Cette interaction est nécessaire à la localisation des protéines Slit à la plaque du plancher (Wright et al., 2012). Très récemment, une fonction majeure de Slit2-C a été mise en évidence dans le tissu adipeux brun. Ce fragment est produit par les adipocytes afin d'induire la thermogenèse adaptative (Svensson et al., 2016). Le récepteur de Slit2-C dans ce système n'a pas encoreété identifié, mais par contre les auteurs ont montré que la voie de signalisation AMPc/PKA est activée (Svensson et al., 2016).

2.2.6 Robo3 un outil génétique dans l'étude des commissures cérébrales

Le récepteur Robo3 fait partie de la famille des Robo mais se différencie de ces derniers sur plus d'un point. Structurellement, le premier domaine cytoplasmique conservé (CC0) est absent de ce récepteur (Yuan et al., 1999). De plus, Robo3 est exprimé uniquement dans le SNC (Barber et al., 2009; Jen et al., 2004; Long et al., 2004; Marillat et al., 2004). Il a été initialement proposé que le récepteur Robo3 liait les Slits (Sabatier et al., 2004), mais, des données plus récentes montrent que ce n'est pas le cas chez les mammifères car des acides aminés dans le domaine Ig1requis pour la fixation de Slit2 sont absent chez Robo3 (Zelina et al., 2014). En effet, Robo3 jouerait plutôt un rôle dans l'attraction par interaction avec le récepteur DCC (Zelina et al., 2014). Robo3 est exprimé de façon très transitoire dans les axones pré-commissuraux de la moelle épinière et du tronc cérébral en développement. Chez l'homme, le syndrome de paralysie du regard horizontal avec scoliose progressive (HGPPS) est causé par une mutation du gène *ROBO3* (Bosley et al., 2005; Jen et al., 2004). Les patients atteints présentent des voies sensorielles et motrices décroisées, mais n'ont pourtant pas d'autres défauts visibles autres qu'une scoliose et une paralysie des mouvements oculaires conjugués horizontaux. Ils ne présentent pas de déficit neurologique ni de troubles moteurs. Chez les souris déficientes pour le gène *Robo3*, les commissures sont complétement absentes dans la moelle épinière et le tronc cérébral central soulignant le rôle clé de ce récepteur dans le croisement de la ligne médiane par les axones commissuraux (Marillat et al., 2004; Sabatier et al., 2004). Les axones, arrivent néanmoins à trouver leur cible, mais du côté ipsilatéral (Marillat et al., 2004). Une étude menée dans notre laboratoire a montré qu'il était possible, par manipulation génétique du gène *Robo3* de supprimer des commissures dans des systèmes spécifiques (Renier et al., 2010). Ainsi, Robo3 peut être utilisé comme outil afin d'étudier le développement et le rôle des commissures cérébrales dans un système donné.

Résultats

Article 1 : en préparation

Non-cell autonomous control of precerebellar neuron migration by Slits and Robo.

Chloé Dominici[1], Pavol Zelina[1], Quentin Rappeneau[1] , Stéphane Fouquet[1] and Alain Chédotal[1]

[1] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 Rue Moreau, 75012 Paris, France.

Correspondence: Dr Alain Chédotal; tel: (+33) 153462515; fax: (+33) 153462502

e-mail: alain.chedotal@inserm.fr;

Running title: The migration of precerebellar neurons does not require Robo

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

Number of Figures: 10; Number of pages: 32

Number of words : Abstract, Introduction, Discussion

Conflict of interests : none

Acknowledgments : We thank Le Ma, Marc Tessier-Lavigne, Patrick Charnay and Jean-François Brunet for providing mouse lines. C.D was recipient of a fellowship from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM). This work was supported by grants from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (grant DEQ20120323700), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE13-0004-01). It was performed in the frame of the LABEX LIFESENSES (reference ANR-10-LABX-65) supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-IDEX-0004-02.

Abstract

The inferior olive and pontine nuclei in the ventral hindbrain contain neurons projecting to the cerebellum. During development these neurons migrate tangentially from the dorsal part of the hindbrain to the floor plate. Their axons cross it but their cell bodies stop their ventral migration upon reaching the midline. Therefore, precerebellar neurons represent an excellent model to study the molecular and cellular mechanisms regulating midline crossing. It was previously shown, that Slit chemorepellents and their receptors Robo1 and Robo2 might control the migration of precerebellar neurons in a repulsive manner. Here we have used a conditional knockout strategy in mice to test this hypothesis. First, we show that the precerebellar neuron migration defects previously described in *Robo1/2* and *Slit1/2* double knockouts can be recapitulated in the corresponding conditional lines after germline recombination. Next, we show that the targeted inactivation of the expression of *Robo1/2* receptors in pontine and inferior olivary neurons does not perturb their migration and that they still stop a the midline, The selective ablation of the expression of all three Slits in floor plate cells has no effect on pontine neurons and only inducew the migration of a small subsets of inferior olivary neurons across the floor plate. Likewise, we show that the expression of Slits in the facial nucleus is dispensable for pontine neuron migration. Together, these results show that Robo1/2 receptors act non-cell autonomously in migrating precerebellar neurons, and that floor plate signals, other than Slits, should exist to prevent midline crossing.

Introduction

First described in human embryos (His, 1891) the rhombic lip, a germinative neuropithelium lining the dorsal edge of the fourth ventricle in the hindbrain, is the source of inferior olivary (IO) neurons and pontine (PN) neurons that both migrate ventrally and tangentially, parallel to the pial surface, to the ventral midline or floor plate (Essick, 1907, 1912; Harkmark, 1954; Altman and Bayer, 1987). IO and PN contain precerebellar neurons which send their axons into the cerebellar cortex and contact Purkinje cells and granule cells respectively. All IO neurons, and a majority of the PN neurons project to the contralateral cerebellum and during their tangential migration they exhibit a unipolar morphology with a long leading process at the front (Bourrat and Sotelo, 1988; Kawauchi et al., 2006; Watanabe and Murakami, 2009; Zelina et al., 2014). The leading process of IO and PN neurons transform into an axon after crossing the floor plate but their cell body do not cross the midline to the exception of a small subset of early born PN neurons (Kawauchi et al., 2006). Insights onto the cellular and molecular mechanisms controlling the tangential migration of precerebellar neurons towards the midline have come from the phenotypic analysis of knockout mice. The current model suggests that precerebellar neuron guidance primarily relies on the same secreted guidance cues, netrin-1 and slits that control midline crossing of dorsal spinal cord commissural axons (Chédotal, 2011; Sotelo and Chédotal, 2013). In *Netrin-1* hypomorphs, IO neurons do not form a well defined nucleus and most stop at ectopic positions along the lateral sides of the medulla (Bloch-Gallego et al., 1999; Marcos et al., 2009). This is also the case in mice deficient for deleted in colorectal carcinoma (Dcc), a transmembrane receptor mediating netrin-1 attraction (Marcos et al., 2009). Likewise, Netrin-1/Dcc signaling controls the ventral migration of PN neurons which remain in the dorsal hindbrain in both *Netrin-1* and *Dcc* knockouts (Yee et al., 1999; Marcos et al., 2009; Zelina et al., 2014). The abnormal dorsal

expression of netrin-1 in Ezh2 histone methyltransferase knockouts, induces a premature ventral migration on a subset of PN neurons (Di Meglio et al., 2013). Slit chemorepellents and their cognate receptors, Roundabout 1 (Robo1) and Robo2 are also thought to influence the migration of precerebellar neurons. In both *Slit1;Slit2* and *Robo1;Robo2* double knockout mice and, a significant fraction of IO neurons cross the floor plate (Di Meglio et al., 2008). PN neurons first migrate anteriorly across several rhombomeres and above the facial nucleus, before initiating a ventral turn (Geisen et al., 2008). In mice deficient for Robo1 and Robo2 or Slit1 and Slit2, chains of PN neurons prematurely leave the main migratory stream during the first phase and move directly to the midline (Geisen et al., 2008). These defects are phenocopied in mutant mice lacking a facial nucleus (Geisen et al., 2008). These observations together with the strong expression of Slit2 and Slit3 in the facial nucleus, suggested that Slits released by the facial nucleus force PN neurons to migrate anteriorly to more rostral level before they can turn ventrally (Geisen et al., 2008).

Therefore a balance between netrin-1 attraction and slit repulsion seems to be at play during precerebellar neuron migration. Accordingly, the results from in vitro migration assays suggested that Slit antagonize the attractive response of IO neurons to netrin-1 (Causeret et al., 2002). A third Robo receptor, Robo3 is expressed by precebellar neurons until their leading processes cross the floor plate (Marillat et al., 2004; Zelina et al., 2014). In *Robo3* knockout (Marillat et al., 2004; Zelina et al., 2014) and in humans carrying mutations in *ROBO3* (Jen et al., 2004), PN neurons are unable to reach the ventral midline. IO neurons migrate to the floor plate but their axon fail to cross it and project ipsilaterally (Marillat et al., 2004). Robo3 does not bind Slits in mammals and form a complex with Dcc which promotes PN neuron midline attraction (Zelina et al., 2014). In the case of IO neurons, a partial rescue of the olivary commissure in Robo1/2/3 triple knockout

suggests that Robo3 might counteract Slit/Robo repulsion as proposed for spinal cord commissural axons (Sabatier et al., 2004; Di Meglio et al., 2008; Jaworski et al., 2010). Importantly, except for Robo3, the genetic data supporting the actual models come from phenotypic analysis of full knockouts in which slits and Robo1/2 are inactivated in all cells. These molecules are broadly expressed throughout the body and the development of many neuronal systems and organs is severely impaired in *Slit1;Slit2* and *Robo1;Robo2* knockouts (Ypsilanti et al., 2010). Therefore, direct genetic evidence validating the current working model could only be provided by a conditional knockout approach. Using this strategy, we show here the Slit/Robo signaling acts on precerebellar neurons in a non-cell autonomous manner.

Material and Methods

Mouse Strains and Genotyping

Slit1/Slit2(Plump et al., 2002), *Slit3* (Yuan et al., 2003), *Robo1* (Long et al., 2004), *Robo2* (Grieshammer et al., 2004), *Robo3lox* (Renier et al., 2010), *Robo2lox* (Gibson et al., 2014) and *Slit2lox* (Rama et al., 2015) knockouts and *Shh:Cre* (Harfe et al., 2004), *Wnt1:Cre* (Danielian et al., 1998), *Krox20:Cre* (Voiculescu et al., 2000), *Ptf1a:Cre* (Kawaguchi et al., 2002), *Phox2b:Cre* (Pattyn et al., 2000) *TauGFP* (Hippenmeyer et al., 2005), lines were previously described and genotyped by PCR. Wild-type mice were from the C57BL6 background (Janvier France). Compound mutants were obtained by intercrossing the various lines. The day of the vaginal plug was counted as E0.5 and the day of the birth as postnatal day 0 (P0). Embryos were collected and transferred to ice-cold PBS 1X (Invitrogen). From E16 to P0 the nervous system was dissected and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA; Merck) overnight at 4 C. Adult mice were anesthetized with ketamine (100 mg/ml) and xylazine (10 mg/ml) and perfused using 4% paraformaldehyde

in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Samples were kept at 4 CinPBS 1X until use. All animal procedures were carried out in accordance to institutional guide- lines (UPMC and INSERM). Mice of either sex were used.

Immunohistochemistry on brain sections

Embryos and adult brains were cryoprotected in 10% sucrose (in 0.1 M phosphate buffer) for cryostat sectioning. Cryostat sections (20 µm thick) were blocked in PBS containing 0.2% gelatin and 0.25% Triton X-100 and incubated overnight at room temperature with primary antibodies against goat anti- Robo3 (1:300, R&D), rabbit anti-Barhl1 (1:500, Sigma), goat anti-ChAT (1:100 Millipore), goat anti-DCC (1:500, Santa Cruz), rabbit anti-Foxp2 (1:1000, Abcam), chicken anti GFP (1:800, Abcam), goat anti-Robo1 (1:500, R&D System), goat anti-Tag-1 (1:1000, R&D System), rabbit anti-Islet1 (1:500, Abcam). The following secondary antibodies were used: bovine anti-goat and donkey anti-rabbit, coupled to CY3 or CY5 (1:600, Jackson Laboratories), donkey anti-chicken coupled to Alexa Fluor 488 (1:600, Invitrogen), donkey anti-rabbit coupled to Alexa Fluor 647 (1:600, Invitrogen). Sections counterstained with Hoechst 33258 (10 mg/ml, Sigma) were examined with a fluorescent microscope (DM6000, Leica) coupled to a CoolSnapHQ camera (Roper Scientific), a Nanozoomer (Hamamatsu) or an upright confocal microscope (Olympus FV1000).

DiI Tracing

The 4% PFA–fixed P0 animals were injected into the cerebellum with small crystals of DiI (Molecular Probes) using glass micropipettes. Injected brains were kept at 37°C for 3 weeks. Brains were cut in 100-µm sections with a vibratome (Leica), counterstained with Hoechst and imaged by an upright confocal microscope (Olympus FV1000).

In situ hybridization.

Antisense riboprobes were labeled with DIG (digoxigenin-11-UTP, Roche) as described previously (Marillat et al., 2002) by in vitro transcription of cDNA encoding Slit2 exon 8(Rama et al., 2015). In situ hybridization was performed as described previously (Marillat et al., 2002) and imaged with a Nanozoomer slide scanner (Hamamatsu)

Whole-Mount Immunostaining

The procedure was similar for single and multiple labeling. Samples were first incubated at RT on a rotating shaker in a solution (PBSGT) of PBS 1X contain- ing 0.2% gelatin (Prolabo), 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 0.01% thimerosal (Sigma-Aldrich) for 3 hr (E12), 24 hr (E13-E18 and P0). Samples were next transferred to PBSGT containing the primary antibodies (same references and dilutions than brain sections) and placed at 37 C°, with rotation at 100 rpm, for 3 days (E12), 1 week (E13-E18 and P0). This was followed by six washes of 30 min in PBSGT at RT. Next, samples were incubated in secondary antibodies (same references and dilutions than brain sections) diluted in PBSGT overnight at 37 C°. After six washes of 30 min in PBSGT at RT, samples were stored at 4 C in PBS until clearing (Belle et al., 2014).

Tissue Clearing

We used the 3DISCO clearing procedure (Ertürk et al., 2011) and slightly adapted it to our samples (Belle et al., 2014). Samples were first dehydrated in a graded series (50%, 80%, and 100%) of tetrahydroflurane (THF; anhydrous, containing 250 ppm butylated hydroxyto- luene inhibitor, Sigma-Aldrich) diluted in H2O, during 1hr for each step. This was followed

by a delipidation step of 20 min in dichloromethane (DCM; Sigma-Aldrich). Finally, samples were cleared overnight in dibenzylether (DBE; Sigma-Aldrich).

3D Imaging and Image Processing

3D imaging was primarily performed with an ultramicroscope (LaVision BioTec) using ImspectorPro software (LaVision BioTec) or with an upright confocal microscope (Olympus FV1000).

Images 3D volume were generated using Imaris x64 software (version 7.6.1, Bitplane). Stack images were first converted to imaris file (.ims) using ImarisFileConverter. File size was next reduced to 8 bits. 3D reconstruction of the sample was performed using ‘‘volume rendering’’ (Imaris). The sample could be optically sliced in any angle using the ‘‘orthoslicer’’ or ‘‘obliqueslicer’’ tools. Air bubbles and crystals that might form at the surface of the samples could be eliminated using the ‘‘surface’’ tool by creating a mask around the each volume. 3D pictures and movies were generated using the ‘‘snapshot’’ and ‘‘animation’’ tools. Finally, images were cropped and, if required, their brightness was adjusted evenly using Photoshop CS4 (Adobe).

Results

To study the role of Slits and Robo receptors in the migration of IO and PN neurons, we used and combined existing knockout lines, including *Slit2* (Rama et al., 2015) and *Robo2* (Gibson et al., 2014) conditional knockouts (Slit2$^{L/L}$ and Robo2$^{L/L}$; see methods). *Slit2*$^{L/L}$ mice were crossed to *Slit1* (Plump et al., 2002) and *Slit3* (Yuan et al., 2003) full knockouts and *Robo2*$^{L/L}$ mice were intercrossed with *Robo1* knockout (Gibson et al., 2014).

Non-cell autonomous control of pontine neuron migration by Robo1/2 receptors

To validate our strategy, and assess the role of Robo1/2 receptors in precerebellar neuron migration, we first crossed *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{L/L}$ with the *Krox20:Cre* line which expresses Cre recombinase in the germline (Voiculescu et al., 2000). The resulting homozygous mutants will be referred to as *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{\Delta/\Delta}$. Cre is also expressed in Rhombomere 3 and 5 which do not contain PN neuron progenitors (Di Meglio et al., 2013). It was previously shown that the lateral olfactory tract (LOT) which contains axons projecting from the lateral olfactory bulb to the pyriform cortex is defasciculated in *Robo1/2* double knockouts (Fouquet et al., 2007). In those mutants, severe axon pathfinding defects were also described for the fasciculus retroflexus (FR) which connect the medial habenula to the interpeduncular nucleus (Belle et al., 2014). To visualize those tracts in the various lines, we performed whole-mount immunolabelling with antibodies against transient associated glycoprotein-1 (Tag1/contactin 2) which label LOT and FR axons (Wolfer et al., 1994; Belle et al., 2014). The analysis of axonal tract development in immuno-labeled samples was facilitated by the use of the 3DISCO tissue clearing technique combined to light-sheet microscopy (Belle et al., 2014). In E16 and P0 control brains from wild type (n=3), *Robo1*$^{+/-}$;*Robo2*$^{+/-}$ (n=2), *Robo1*$^{+/-}$;*Robo2*$^{L/+}$ (n=2), *Robo1*$^{-/-}$;*Robo*$^{L/L}$ (n=4) mice, Tag-1+ LOT axons form one axon bundle extending on each side of the ventral forebrain (Figure 1 and not shown). In *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{-/-}$ (n=4) mice, the LOT was defasciculated and some axons extend more medially than in controls (Figure 1C). This was also the case in *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{\Delta/\Delta}$ mice (Figure 1E; n=7). As shown before in *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{-/-}$ knockouts(Plachez et al., 2008), midline crossing was abnormal at the optic chiasm of *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{\Delta/\Delta}$ mice mutants (Figure 1F). In wild type (n=2), *Robo1*$^{+/-}$;*Robo2*$^{+/-}$ (n=2), *Robo1*$^{+/-}$;*Robo2*$^{L/+}$ (n=2),

FR axons zigzag at the floor plate upon reaching it (Figure 1G). In *Robo1*$^{-/-}$;*Robo*$^{L/L}$ (n=4) midline crossing was perturbed and some axons stay at the floor plate (Figure 1I). In *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{-/-}$ (n=3) and *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{\Delta/\Delta}$. (n=3) mice, FR axon crossing was more strongly affected and most axons stayed on the ipsilateral side (Figure 1H, J; Belle et al., 2014). These results show that *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{\Delta/\Delta}$ mice phenocopy *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{-/-}$ double knockouts. To study PN neuron migration, whole-mount double immunostaining for Robo3 and the transcription factor Barhl1 (Zelina et al., 2014) was performed on whole E16 embryos. This was also followed by 3DISCO clearing and LSM (Figure 1K; see methods).. In E16 wild type (n=2), *Robo1*$^{+/-}$;*Robo2*$^{+/-}$ (n=2), *Robo1*$^{+/-}$;*Robo2*$^{L/+}$ (n=2), *Robo1*$^{-/-}$;*Robo*$^{L/L}$ (n=4) embryos (Figure 2A, C and not shown) PN neurons form a compact stream migrating rostrally and then ventrally to the floor plate. They strongly express Barhl1 and Robo3. At this stage, Robo3 is also expressed in the FR which terminates in the interpeduncular nucleus, rostral to the PN. As previously described (Geisen et al., 2008), PN migration was severely perturbed in *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{-/-}$ (n:3) embryos, and multiple chains of Barhl1/Robo3+ neurons deviated from the normal pathway to prematurely migrate towards the floor plate. However, in *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{-/-}$ mutants as in controls, Barhl1+ PN neurons aggregated on both sides of floor plate without penetrating it, while their axons labeled with Robo3 crossed it. PN migration defects were strikingly similar in *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{\Delta/\Delta}$ embryos (Figure 2D; n=3), further validating the *Robo2*$^{L/L}$ conditional knockout line. To determine if Robo1/Robo2 act cell autonomously in migrating PN neurons, we next intercrossed *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{L/L}$ mice and *Wnt1:Cre* mice which is known to drive the expression of Cre recombinase in PN neuron precursors in addition to other hindbrain neurons and neural crest cell derivatives (Rodriguez and Dymecki, 2000;

Nichols and Bruce, 2006; Di Meglio et al., 2013; Zelina et al., 2014). In *Wnt1:Cre* E16 embryos (n=3) and *Wnt1:Cre;Robo1*$^{+/-}$*;Robo2*$^{L/+}$ (n=1) embryos, all Robo3+/Barhl1+ PN neurons migrated to the floor plate as in wild type embryos, but the shape of the PN nucleus appeared slightly reduced and some FR axons failed to cross the midline (Figure 3A, B). Surprisingly, the migration of PN neurons was not affected in *Wnt1:Cre;Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{L/L}$ (n= 6) embryos in which all neurons followed the anterior extramural stream and no evidence of a premature migration to the ventral midline was found (Figure 3D). By contrast, all PN neurons failed to reach the midline in *Wnt1:Cre;Robo3*$^{L/L}$ embryos (Figure 3D; n=3) thereby confirming that the Wnt1:Cre line efficiently recombines floxed allele in PN neuron precursors. These data, show that Robo1/Robo2 do not control the migration on PN neurons in a cell-autonomous manner.

Floor plate-derived Slits do not influence PN neuron migration

To study the influence of floor plate-derived Slits on the migration of PN neurons, we next generated *Shh:Cre;Slit1*$^{-/-}$*;Slit2*$^{lox/lox}$*;Slit3*$^{-/-}$ (hereafter referred to as *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$). The viability of *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$ mice was comparable to controls but *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ mice died shortly after birth. In *Shh:Cre* mice, Cre recombinase and the reporter green fluorescent protein (GFP) are inserted in the Sonic hedgehog locus and are expressed in the floor plate (Harfe et al., 2004; Joksimovic et al., 2009) as seen in E11 spinal cord sections (Figure 4A). We first wanted to confirm that this line recapitulated the axon guidance defects previously described in *Sli1/2/3* triple knockouts (Long et al., 2004). In situ hybridization on E12 spinal cord sections with a riboprobe specific for Slit2 exon 8 (floxed in *Slit2*^{lox} mice) showed that Slit2 expression was selectively ablated in the floor plate but not in motorneurons in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$ embryos (n=4; Figure 4B). To visualize spinal cord commissural axons we performed immunolabeling of *S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ and

Shh:Cre;S1$^{-/-}$;S2$^{L/L}$;S3$^{-/-}$ E12 embryos with antibodies against Robo3, Dcc and Robo1 (Jaworski et al., 2010). As previously described *in Slit1/2/3* conventional triple knockout embryos(Long et al., 2004), Robo3 immunostaining showed that midline crossing in the spinal cord of *S1$^{-/-}$;S2$^{L/L}$;S3$^{-/-}$* embryos (n=1) was similar to controls (Figure 4C), further pointing to the redundant activity of Slit1-3 at the floor plate. In *Shh:Cre;S1$^{-/-}$;S2$^{L/L}$;S3$^{-/-}$ (*n= 2) Robo3+ commissural axons reached the midline but crossing was perturbed, the commissure was thicker and axons seemed to project toward the ventricular zone (Figure 4D) . LSM imaging confirmed that the density of commissural axons was increased at the floor plate. Similar observations were made using anti-DCc antibodies, which also confirmed the enlargement of the ventral commissure in *Shh:Cre;S1$^{-/-}$;S2$^{L/L}$;S3$^{-/-}$* embryos (n=2) compared to *S1$^{-/-}$;S2$^{L/L}$;S3$^{-/-}$* embryos (n=1; Figure 4E, F). The best evidence for abnormal midline crossing came from Robo1 immunolabeling. As previously shown in wild type embryos (Long et al., 2004), Robo1 was only expressed on post-crossing commissural axons that had started to grew longitudinally and Robo1 staining was absent at the floor plate (Figure 4E). By contrast, Robo1 positive axons were present in the floor plate of *Shh:Cre;S1$^{-/-}$;S2$^{L/L}$;S3$^{-/-}$* (n=2) embryos (Figure 4F). These results validate the floor plate specific deletion of the three Slits in our mutant and also the importance of floor plate-derived Slits for spinal cord commissural axon guidance.

To further validate our strategy, we next analyzed the consequence of germline recombination of exon 8 in to *S1$^{-/-}$;S2$^{L/L}$;S3$^{-/-}$* mice (see methods). So far the phenotype of Slit1/2/3 triple knockouts had just been analyzed in the spinal cord (in only 3 embryos; Long et al., 2004), due to the difficulties of generating triple homozygous conventional knockouts (*Slit2$^{-/-}$* mice are not viable and *Slit3$^{-/-}$* mice die in a few weeks of heart defects).

We first focused on the LOT and FR projections as they are known to be affected in *Slit1;Sli2* null mice (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002; Belle et al., 2014). In wild type (n=3),

S1$^{-/-}$ (n=1), *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ (n=2) P0 mice and E16 embryos, the LOT was confined to the lateral part of the forebrain as shown with anti-Tag-1 labeling (Figure 5A and not shown). In *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{-/-}$ double knockouts (n=1), the LOT was defasciculated and bundles of axons invaded a more medial domain of the ventral forebrain (Figure 5B). Similar LOT guidance defects were also seen in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{+/-}$ embryos (n=3; Figure 5C). At the level of the FR, midline crossing defects found in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{-/-}$ double knockouts (n=1) but not in *S1*$^{-/-}$;*S3*$^{-/-}$ (n=1) and *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ embryos (n=3; Figure 5D, E). We found that the FR completely failed to cross the floor plate in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{-/-}$ embryos (n=2; Figure 5F). These results confirm that axon guidance defects observed after germline deletion of exon 8 in *Slit2*$^{L/L}$ mice faithfully mimic what was previously found in conventional *Slit2* knockouts.

We next studied the migration of PN neurons in Slit conditional knockouts using Robo3 and Barhl1 immunolabeling, clearing and LSM. PN neurons migrated as in wild type in *S1*$^{+/-}$;*S2*$^{L/+}$ (n=2), *S1*$^{-/-}$;*S3*$^{-/-}$ (n=1); *S1*$^{-/-}$;*S3*$^{+/-}$ (n=1); *S1*$^{-/-}$ (n=1) and in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ E16 embryos (n=3; Figure 5G and not shown). As previously described(Geisen et al., 2008), PN neuron migration was disorganized in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{-/-}$ embryos (n=1; Figure 5H), in which a significant fraction of neurons directly migrated from the rhombic lip to the floor plate. The severity of the PN migration defects did not seem to be exacerbated in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{-/-}$; *S3*$^{-/-}$ E16 embryos (n=1; Figure 5I). No migration defect were found in Krox20:Cre;*S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ E16 embryos (n=2 Figure 5J) indicating that ablating the expression of all Slits in rhombomeres 3 and 5 did not have any effect on PN neurons pathfinding. By contrast, a major disorganization of the PN migratory stream was seen in both *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{+/-}$ (n=5) and *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{-/-}$ mutants (n=3 Figure 5K, L) with multiple chains of Barhl1+/Robo3+ neurons migrating ventrally, straight to the midline. As in *Robo* mutants, ectopic PN

neurons still clustered on both sides of the floor plate. As noted before (Geisen et al., 2008), the PN migration defects were asymmetric in all mutants.

To determine if the floor plate is an important source of Slits for migrating PN, we next studied the hindbrain commissures and PN migration in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ mutants. GFP immunostaining confirmed that as in the spinal cord, GFP is expressed by floor plate in the hindbrain of *Shh:Cre* embryos (Figure 6A). In situ hybridization for Slit2 exon 8 showed that *Slit2* mRNA was deleted from the floor plate in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ (n=1) and *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$ (n=2) but that Slit2 expression in the facial nuclei was similar to *S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{+/-}$ embryos (n=3). To study hindbrain commissures, we first, performed immunostaining for Dcc which showed that the thickness of hindbrain commissures was increased at the floor plate in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ (n=3; Figure 6C). As in the spinal cord, commissural axon midline crossing defects were best seen after Robo1 immunostaining. LSM on 3DISCO-cleared E12 hindbrains showed that Robo1 labels longitudinal axons along the floor plate in *S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ embryos (n=3), whereas aberrant crossing of Robo1+ axons was observed in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ mutants (n=3; Figure 6D). Confocal imaging of hindbrain sections also showed this abnormal accumulation of Robo1+ axons at the floor plate of *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ embryos (n=2; Figure 6D). Strikingly, we could not detect any PN migration defects in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{+/-}$ (n=4) or *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ (n=4) mutants and the shape and size of the PN migratory stream were comparable to *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ controls: *Shh:cre,S1*$^{+/-}$*;S2*$^{L/+}$ (n=3), *S1*$^{+/-}$*;S2*$^{L/+}$ (n=2), *S1*$^{-/-}$*;S3*$^{-/-}$ (n=1); *S1*$^{-/-}$*;S3*$^{+/-}$ (n=1); *S1*$^{-/-}$ (n=1) and in *S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ (n=3) (Figure 6E). The abnormal midline crossing of FR axons in these embryos (Figure 6F) confirmed that Slit2 was efficiently inactivated in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ mice and the lack of PN migration defects reveals that floor plate-derived Slits do not play an important role in PN neuron migration.

Neurons in the facial nucleus express Slit2 and Slit3 (Geisen et al., 2008) and it was proposed that this is a main source of chemorepellents for PN neurons, during their longitudinal migration along the antero-posterior axis of the hindbrain. To test this hypothesis, we generated *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$ and *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ mice. Phox2b is a transcription factor that controls the specification of visceral and branchial motor neurons including those of the facial nucleus (Pattyn et al., 2000). The expression of Cre recombinase in embryonic facial neurons was first validated by crossing *Phox2b:Cre* and *Tau*^{mGFP} mice which express a membrane-tethered GFP in axons in presence of Cre (Hippenmeyer et al., 2005) (Figure 7A). In situ hybridization with a Slit2 exon 8 probe on E12 *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$ (n=2) and *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ mutants (n=1) showed that unlike in *S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$ embryos (n=2), Slit2 expression was prevented in the facial nucleus but maintained in the floor plate (Figure 7B). The lack of Slit2 did not appear to perturb the development of the facial nucleus which in *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ mutants (n=2) had a position and morphology similar to *S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$ embryos (n=2). Next we analyzed the migration of PN neurons using Barhl1/Robo3 double immunolabeling and LSM. We could not detect any PN migration defects in *S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ (n=3), *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$ (n=2) and *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ (n=2) embryos (Figure D-F). These results show that PN neuron migrate normally in absence of Slit2 and Slit3 in the facial nucleus.

To determine if the simultaneous inactivation of Slit1-3 at the level of the floor plate and facial nucleus could perturb PN neuron migration, we generated E16 *Shh:Cre;Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ (both Cre lines can be distinguished by PCR using specific primers). Interestingly, a few streams of ectopic and prematurely migrating PN neurons were found in *Shh:Cre;Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{+/-}$ embryos (n=3; Figure 7G). These ectopic migratory chains and clusters of PN neurons were more numerous in

Shh:Cre;Phox2b:Cre;S1$^{-/-}$*;S2*$^{L/L}$*;S3*$^{-/-}$ embryos (n=1; Figure 7H). Confocal imaging of the ectopic PN clusters close to the midline showed that some axons crossed the midline but other seemed to grow within the floor plate (Figure 7I, J). Although PN migratory defects were seen in mice simultaneously depleted of Slits in the floor plate and facial nucleus, the phenotype was much milder than after an ubiquitous inactivation of all Slits.

Revisiting the role of Slit/Robo signaling in IO development

Previous studies showed that the IO nucleus, does not develop properly in Robo1/Robo2 and Slit1/Slit2 double knockouts (Di Meglio et al., 2008; Geisen et al., 2008). To study the IO nucleus in Slit and Robo conditional knockouts, we primarily used whole-mount immunostaining for Foxp2, a marker of all IO neurons (Fujita and Sugihara, 2012). Hindbrains were then cleared with 3DISCO and imaged by LSM, thereby revealing the 3D organization of the IO (Figure 8A, B). The IO nuclei are adjacent to the floor plate and comprise several subnuclei organized in a lamellated pattern (Azizi and Woodward, 1987) (Figure 8B). LSM confirmed that at P0, the 3D structure of the IO was comparable to wild type in *Robo1*$^{+/-}$*;Robo2*$^{+/-}$ P0 mice (n=2) (Figure 8C), but that in *Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{-/-}$ double knockouts (n=3), the shape of the IO was elongated and more compact (Figure 8D). This was also the case in *Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{\Delta/\Delta}$ mice (n=3; Figure 8E) further validating the conditional knockouts. The circumferential migration of the IO neurons starts around E11 and finishes by E14-E15 in the mouse (Di Meglio et al., 2008), but the lamellation process is only completed around birth . Optical sectioning with Imaris (see methods) of the IO on E12-E14 embryos, was used to visualize migrating IO neurons (Figure 8F). This showed that in Wild type Foxp2+ IO neurons stop at the midline, whereas in in *Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{-/-}$ double knockouts, a fraction of IO neurons migrate into the floor plate (n=1). As previously shown (Di Meglio et al., 2008), unilateral DiI injection into the cerebellum, results in

bilateral retrograde labeling of IO neurons (Figure 8G), unlike in wild type where labeled neurons are only found IO contralateral to the side of the injection (Di Meglio et al., 2008). To assess the cell-autonomous function of Robo1/2 receptors in IO neuron migration, we crossed the *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{L/L}$ mice to the *Pft1a:Cre* line. Ptf1a is a transcription factor expressed by IO progenitors and the *Ptf1a:Cre* line was already shown to drive Cre expression in IO neurons (Renier et al., 2010; Badura et al., 2013). *Pft1a:Cre*;*Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{L/L}$ mice were fully viable and did not exibit any obvious motor deficits unlike other IO mutants (Renier et al., 2010; Badura et al., 2013). The shape of the IO at P0 was similar to controls (n=1; Figure 8H) and only ION neurons on the contralateral side were labeled using DiI tracing (n=5; Figure 8H). Cryostat sections of P15 hindbrain stained with Foxp2 antibodies confirmed that the lamellation of the IO nucleus was normal in *Pft1a:Cre*;*Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{L/L}$ mice (n=2). These data suggest that the migration of IO neurons does not rely on Robo1/Robo2 receptors.

We next analyzed the role of Slit ligands and in particular from the floor plate. LSM in cleared embryos immunolabeled for Foxp2 confirmed that the shape of the IO nucleus is abnormal in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{-/-}$ double knockouts (n=1; Figure 9; Di Meglio et al., 2008) with a latero-medial compaction similar to *Robo*1/2 knockouts. This was also the case in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{+/-}$ embryos (n=3) but not in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$ (n=5), *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ (n=3), *S1*$^{-/-}$;*S3*$^{-/-}$ (n=2), *S1*$^{-/-}$ (n=1) embryos (Figure 9B, C). The IO was also disorganized in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (n=2) and *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ embryos (n=3) but not like in *Robo1/Robo2* double mutants. The overall shape was similar to controls, but gaps devoided of Foxp2 IO neurons could be seen both in 3D and on sections (Figure 9D). We next performed retrograde tracing with DiI (Figure 9E). In *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ (n=2) and *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (n=2) embryos DiI labeled IO neurons were restricted to the contralateral side (Figure 9E). However, DiI labeled neurons were also observed on the ipsilateral IO of *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$

;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$ embryos (n=1) and to a larger extent in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ embryos (n=2), suggesting that some neurons might have crossed the floor plate. Accordingly, Foxp2+IO neurons were observed in the floor plate of *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{+/-}$ (n=3) and *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{-/-}$ (n=1) E13 embryos, as well ad in E14 *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$ (n=1) and *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (n=3) embryos but not in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ embryos (n=1) and *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (n=1) (Figure 9F). The abnormal morphology of the IO complex in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ was still observed in P25 animals (n=1) (Figure 9G) indicating that lamellation defects are not corrected after birth.

Discussion

Robo receptors were discovered in Drosophila for their role in the control of commissural axon guidance in the nerve cord (Seeger et al., 1993; Kidd et al., 1998). It was later found that they bind Slit and trigger a repulsive signal (Kidd et al., 1999). This function of Slits and Robos in the regulation of midline crossing seems to be conserved throughout evolution from worm to humans (Brose et al., 1999; Zallen et al., 1999; Fricke et al., 2001; Jen et al., 2004). In rodents, genetic evidence supporting a repulsive activity of Slit/Robo signaling for commissural axons has been obtained in various neuronal systems through the phenotypic analysis of *Slit* and *Robo* knockout mice (Bagri et al., 2002; Shu et al., 2003; Long et al., 2004; Fouquet et al., 2007; López-Bendito et al., 2007; Jaworski et al., 2010). In the spinal cord, commissural axons accumulate at the floor plate in *Robo1/2* double knockouts and *Slit1/2/3* triple knockouts (Long et al., 2004; Jaworski et al., 2010) and this is also the case for axons of the fasciculus retroflexus (Belle et al., 2014). In the cortex, callosal axons fail to cross the midline in *Slit* and *Robo* knockouts (Shu et al., 2003; López-Bendito et al., 2007; Conway et al., 2011; Unni et al., 2012). Slit/Robo repulsion

also prevents longitudinal axons from crossing the midline in the forebrain and hindbrain (Fouquet et al., 2007; Farmer et al., 2008).

To one exception (Belle et al., 2014), all these *in vivo* data were obtained in classic *Slit* and *Robo* knockoust in which the genes were inactivated in all cells. Slits and Robo knockouts show many developmental defects outside the CNS, for instance in the kidney (Grieshammer et al., 2004), heart (Mommersteeg et al., 2013, 2015) and vasculature (Rama et al., 2015). This suggests that some of the defects observed in the knockout CNS could be related to abnormal function of non-neuronal cells which could secondarily alter axon outgrowth and cell migration. Previous work on Retinoblastoma (RB) showed that the development of the CNS was severely perturbed in RB knockout embryos, including massive apoptosis and precerebellar neuron migration defects (Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992). Interestingly, later experiments using chimera and conditional knockouts showed that these anomalies were caused by abnormal placenta development leading to hypoxia (MacPherson et al., 2003)(Maandag et al., 1994). This precedent underlines the importance of performing cell specific inactivation of broadly expressed genes.

We could not find any developmental defects in mice lacking Robo1/2 receptors in PN neurons or IO neurons. The PN migration pathway is similar to controls, without premature ventral turning and both PN and IO neurons stop at the floor plate. This suggests that the defects previously seen in the classic *Slit* and *Robo* knockouts are secondary and related to abnormal development of other systems. In Drosophila, Robo receptors are not expressed at the surface of commissural axons until they have cross the midline (Kidd et al., 1998) and in mouse embryos, Robo1/2 proteins were also detected on post-crossing axons (Tamada et al., 2008; Jaworski et al., 2010). Therefore, the absence of PN migration defect could be expected if PN neurons don't express Robo1/2 protein during their migration to the midline. Likewise, there is no evidence supporting an expression of

Robo1/2 proteins by IO neurons (Di Meglio et al., 2008) and we show here that IO neurons stop at the midline and project contralaterally in *Ptf1a:Cre;Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{lox/lox}$ mice. Therefore, Robo1/2 receptors do not control the migration of PN and IO neurons and the previously described defects are most likely non-cell autonomous. It will now be important to extend this work to other systems, such as the optic nerve and spinal cord to assess Robo1/2 function in commissural axon guidance.

Interestingly, our results show that the targeted deletion of all three Slits in the floor plate induces midline crossing defects in the spinal cord. As previously found (Long et al., 2004), the three SIlts act redundantly and need to be simultaneously inactivated to perturb midline crossing. At the level of the hindbrain, we show that the lack of Slits at the floor plate alters FR axon crossing but does not have consequences on the migration of PN neurons. Although a small fraction of IO neurons cross a floor plate lacking all Slits, in this case as well the defects are rather limited and could also be due to the disruption of other axonal tracts. It was previously proposed that Slit2/3 released from the facial nucleux, forces PN neurons to migrate rostrally until they can initiate a ventral turn. However, the selective deletion of all Slits from the facial nucleus does not modify the trajectory of PN neurons. The simultaneous inactivation of Slit1-3 in the floor plate and facial nucleus is accompanied by the appearance of a few ectopic chains of PN neurons but in a much more limited manner than in Slit1-3 triple mutants. This again suggests that the PN migration defects in *Slit* knockouts could be related to an abnormal development of other neuronal systems or that there are additional sources of Slit proteins along the PN migratory stream.

Interestingly, PN and IO defects in *Slit* conditional knockouts do not phenocopy those found in *Robo* Knockouts. This suggests that Slits might act on precebellar neurons through other receptors. Slits are cleaved by an unknown protease, into a long N-terminal

fragment (Slit-N) and a short C-terminal fragment (Slit-C). Recent studies have show that Slit2-C binds to Plexin-A1(Delloye-Bourgeois et al., 2014) and Dystroglycan (Wright et al., 2012). In the spinal cord, the floor plate secretes semaphorins and cell adhesion molecules (CAMs), which are also involved in the control of midline crossing. For instance, the gain in responsiveness of commissural axons to semaphorin 3B repulsion after midline crossing (Nawabi et al., 2010) is stimulated by a soluble form of the Neural cell adhesion molecule (NrCAM). Although precerebellar neurons express at least some components of the receptor complex for semaphorins, such as neuropilin2 (Chen et al., 1997), PlexinD1, PlexinA2 (Gesemann et al., 2001)(Vilz et al., 2005) and also several CAMs (Backer et al., 2002) the function of these molecules in the control of precerebellar neuronal migration is unknown. For instance, NrCAM is expressed by migrating IO neurons (not by PN neurons) but the IO is normal in *NrCAM* KO (Backer et al., 2002).

Alpha-dystroglycan (a-DG) is a transmembrane protein linking the extracellular matrix to the actin cytoskeleton (Yurchenco and Wadsworth, 2004). A-DG is expressed by PN neurons (Ohtsuka-Tsurumi et al., 2004) suggesting that it A-DG could regulate the interaction between PN neurons and the basal lamina. Several enzymes such as Large, POMT1/POMT2, POMGnT1 and fukutin act to modify and glycosylate a-DG; they are often mutated in human patients with congenital muscular dystrophy. Interestingly, many of these patients also present pontine heterotopia (Saito et al., 2003) and, in addition, the pontine nucleus is hypoplastic and ectopic in *Large* mutant mice (Litwack et al., 2006; Qu et al., 2006). By contrast, the IO and the LRN/ECN nuclei develop normally in *Large* mutants(Litwack et al., 2006). A-DG also interacts with several ECM proteins containing a so-called Laminin G module that is found in Slits(Yurchenco and Wadsworth, 2004). Therefore, the abnormal glycosylation of a-DG in *Large* mutants could alter the distribution of axon guidance molecules such as Slits and thereby perturb the migration of PN

neurons. Accordingly, In *Large* mutants, PN neurons fail to turn ventrally and project ipsilaterally (Smith et al., 2005). How PN neurons migrate normally in a-DG KO is unknown (Satz et al., 2008).

It was shown that in PCN explants, Slit can silence Netrin1 attraction as is the case in spinal cord commissural axons. In addition, floor plate explants from Netrin1 KO become repulsive for PCN neurons, suggesting that Slit repulsion might be abnormally activated(Marcos et al., 2009). Although In vitro assay have also confirmed that the floor plate acts as a stop signal for migrating precerebellar neurons(de Diego et al., 2002), our results that other repellent than Slits are involved.

References

Altman J, Bayer SA (1987) Development of the precerebellar nuclei in the rat: I. The precerebellar neuroepithelium of the rhombencephalon. J Comp Neurol 257:477–489.

Azizi S a, 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, Sakurai T, Grumet M, Sotelo C, Bloch-Gallego E (2002) NR-CAM an TAG-1 are Expressed in Distinct Populations of Developing Precerebellar and Cerebellar Neurons. Neuroscience 113:743–748.

Badura A, Schonewille M, Voges K, Galliano E, Renier N, Gao Z, Witter L, Hoebeek FE, Chédotal A, De Zeeuw CI (2013) Climbing Fiber Input Shapes Reciprocity of Purkinje Cell Firing. Neuron:1–14.

Bagri A, Marin O, Plump AS, Mak J, Pleasure SJ, Rubenstein JLR, 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.

Belle M, Godefroy D, Dominici C, Heitz-Marchaland C, Zelina P, Hellal F, Bradke F, Chédotal A (2014) A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System. Cell Rep 9:1191–1201.

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.

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.

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.

Chédotal A (2011) Further tales of the midline. Curr Opin Neurobiol 21:68–75.

Chen H, Chédotal A, He Z, 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.

Conway CD, Howe KM, Nettleton NK, Price DJ, Mason JO, Pratt T (2011) Heparan sulfate sugar modifications mediate the functions of slits and other factors needed for mouse forebrain commissure development. J Neurosci 31:1955–1970.

Danielian PS, Muccino D, Rowitch DH, Michael SK, McMahon AP (1998) Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. Curr Biol 8:1323–1326.

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.

Delloye-Bourgeois C, Jacquier A, Charoy C, Reynaud F, Nawabi H, Thoinet K, Kindbeiter K, Yoshida Y, Zagar Y, Kong Y, Jones YE, Falk J, Chédotal A, Castellani V (2014) PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments. Nat Neurosci 18:36–45.

Di Meglio T et al. (2013) Ezh2 Orchestrates Topographic Migration and Connectivity of Mouse Precerebellar Neurons. Science (80-) 339:204–207.

Di Meglio T, Nguyen-Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C, Meglio T Di, Chédotal A (2008) Molecular mechanisms controlling midline crossing by precerebellar neurons. J Neurosci 28:6285–6294.

Ertürk A, Mauch CP, Hellal F, Förstner F, Keck T, Becker K, Jährling N, Steffens H, Richter M, Hübener M, Kramer E, Kirchhoff F, Dodt HU, Bradke F (2011) Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. Nat Med 18:166–171.

Essick CR (1907) The corpus ponto-bulbare, a hitherto undescribed nuclear mass in the human hindbrain. Am J Anat 7:119–135.

Essick CR (1912) The development of the nuclei pontis and the nucleus arcuatus in man. Am J Anat 13:25–54.

Farmer WT, Altick AL, Nural HF, Dugan JP, Kidd T, Charron F, Mastick GS (2008) Pioneer longitudinal axons navigate using floor plate and Slit/Robo signals. Development 135:3643–3653.

Fouquet C, Di Meglio T, Ma L, Kawasaki T, Long H, Hirata T, Tessier-Lavigne M, Chédotal A, Nguyen-Ba-Charvet KT (2007) Robo1 and robo2 control the development of the lateral olfactory tract. J Neurosci 27:3037–3045.

Fricke C, Lee J, Geiger-Rudolph S, Bonhoeffer F, Chien C-B (2001) astray, a zebrafish roundabout homolog required for retinal axon guidance. Science (80-) 292:507–510.

Fujita H, Sugihara I (2012) FoxP2 expression in the cerebellum and inferior olive: development of the transverse stripe-shaped expression pattern in the mouse cerebellar cortex. J Comp Neurol 520:656–677.

Geisen MJ, Di Meglio T, Pasqualetti M, Ducret S, Brunet J-F, Chédotal A, Rijli FM, Meglio T Di (2008) Hox paralog group 2 genes control the migration of mouse pontine neurons through slit-robo signaling. Plos Biol 6:e142.

Gesemann M, Litwack ED, Yee KT, Christen U, O'Leary DD (2001) Identification of candidate genes for controlling development of the basilar pons by differential display PCR. Mol Cell Neurosci 18:1–12.

Gibson D a, Tymanskyj S, Yuan RC, Leung HC, Lefebvre JL, Sanes JR, Chédotal A, Ma L (2014) Dendrite self-avoidance requires cell-autonomous slit/robo signaling in cerebellar purkinje cells. Neuron 81:1040–1056.

Grieshammer U, Ma L, Plump AS, Wang F, Tessier-lavigne M, Martin GR (2004) SLIT2-mediated ROBO2 signaling restrict kidney induction to a single site. Dev Cell 6:709–717.

Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP, Tabin CJ (2004) Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. Cell 118:517–528.

Harkmark W (1954) Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons. A morphological and experimental investigation of the chick embryo. J Comp Neurol 100:115–209.

Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S (2005) A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor

signaling. PLoS Biol 3:e159.

His W (1891) Die Entwickelung des menschlichen Rautenhirns vom Ende des ersten bis zum Beginn des dritten Monats. Abhandlungen der königlich sächsischen Gesellschafi der Wissenschaften, Math Klasse 29:1–74.

Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA (1992) Effects of an Rb mutation in the mouse. Nature 359:295–300.

Jaworski A, Long H, Tessier-Lavigne M (2010) Collaborative and Specialized Functions of Robo1 and Robo2 in Spinal Commissural Axon Guidance. J Neurosci 30:9445–9453.

Jen JC et al. (2004) Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. Science (80-) 304:1509–1513.

Joksimovic M, Yun B a, Kittappa R, Anderegg AM, Chang WW, Taketo MM, McKay RDG, Awatramani RB (2009) Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. Nat Neurosci 12:125–131.

Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, Macdonald RJ, Wright CVE (2002) The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. Nat Genet 32:128–134.

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.

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 (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. Cell 92:205–215.

Lee EY-HP, Chang C-Y, Hu N, Wang Y-CJ, Lai C-C, Herrup K, Lee W-H, Bradley A (1992)

Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. Nature 359:288–294.

Litwack ED, Lee Y, Mallott JM (2006) Absence of the basilar pons in mice lacking a functional Large glycosyltransferase gene suggests a defect in pontine neuron migration. Brain Res 1117:12–17.

Long H, Sabatier C, Ma L, Plump AS, 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, Di Meglio 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 27:3395–3407.

Maandag EC, van der Valk M, Vlaar M, Feltkamp C, O'Brien J, van Roon M, van der Lugt N, Berns A, te Riele H (1994) Developmental rescue of an embryonic-lethal mutation in the retinoblastoma gene in chimeric mice. EMBO J 13:4260–4268.

MacPherson D, Sage J, Crowley D, Trumpp A, Bronson RT, Jacks T (2003) Conditional mutation of Rb causes cell cycle defects without apoptosis in the central nervous system. Mol Cell Biol 23:1044–1053.

Marcos S, Backer S, Causeret F, Tessier-Lavigne M, Bloch-Gallego E (2009) Differential roles of Netrin-1 and its receptor DCC in inferior olivary neuron migration. Mol Cell Neurosci 41:429–439.

Marillat V, Chédotal A, Cases O, Nguyen-Ba-Charvet KT, Tessier-Lavigne M, Sotelo C (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 43:69–79.

Mommersteeg MTM, Andrews WD, Ypsilanti AR, Zelina P, Yeh ML, Norden J, Kispert A, Chédotal A, Christoffels VM, Parnavelas JG (2013) Slit-roundabout signaling regulates the development of the cardiac systemic venous return and pericardium. Circ Res 112:465–475.

Mommersteeg MTM, Yeh ML, Parnavelas JG, Andrews WD (2015) Disrupted Slit-Robo signalling results in membranous ventricular septum defects and bicuspid aortic valves. Cardiovasc Res 106:55–66.

Moreno-Bravo J a, Martinez-Lopez JE, Madrigal MP, Kim M, Mastick GS, Lopez-Bendito G, Martinez S, Puelles E (2016) Developmental guidance of the retroflex tract at its bending point involves Robo1-Slit2-mediated floor plate repulsion. Brain Struct Funct 221:665–678.

Nawabi H, Briançon-Marjollet A, Clark C, Sanyas I, Takamatsu H, Okuno T, Kumanogoh A, Bozon M, Takeshima K, Yoshida Y, Moret F, Abouzid K, Castellani V (2010) A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. Genes Dev 24:396–410.

Nguyen-Ba-Charvet KT, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Chedotal A (2002) Slit1 and slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. J Neurosci 22:5473–5480.

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.

Ohtsuka-Tsurumi E, Saito Y, Yamamoto T, Voit T, Kobayashi M, Osawa M (2004) Co-localization of fukutin and alpha-dystroglycan in the mouse central nervous system. Dev Brain Res 152:121–127.

Pattyn a, Hirsch M, Goridis C, Brunet JF (2000) Control of hindbrain motor neuron

differentiation by the homeobox gene Phox2b. Development 127:1349–1358.

Plachez C, Andrews W, Liapi A, Knoell B, Drescher U, Mankoo B, Zhe L, Mambetisaeva E, Annan A, Bannister L, Parnavelas JG, Richards LJ, Sundaresan V (2008) Robos are required for the correct targeting of retinal ganglion cell axons in the visual pathway of the brain. Mol Cell Neurosci 37:719–730.

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.

Qu Q, Crandall JE, Luo T, McCaffery PJ, Smith FI (2006) Defects in tangential neuronal migration of pontine nuclei neurons in the Largemyd mouse are associated with stalled migration in the ventrolateral hindbrain. Eur J Neurosci 23:2877–2886.

Rama N, Dubrac A, Mathivet T, Ní Chárthaigh R-A, Genet G, Cristofaro B, Pibouin-Fragner L, Ma L, Eichmann A, Chédotal A (2015) Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization. Nat Med.

Renier N, Schonewille M, Giraudet F, Badura A, Tessier-Lavigne M, Avan P, De Zeeuw CI, Chédotal A (2010) Genetic Dissection of the Function of Hindbrain Axonal Commissures. PLoS Biol 8:e1000325.

Rodriguez CI, Dymecki SM (2000) Origin of the precerebellar system. Neuron 27:475–486.

Sabatier C, Plump AS, Le Ma, Brose K, Tamada A, Murakami F, Lee EY-HP, 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.

Saito Y, Kobayashi M, Itoh M, Saito K, Mizuguchi M, Sasaki H, Arima K, Yamamoto T, Takashima S, Sasaki M, Hayashi K, Osawa M (2003) Aberrant neuronal migration in the brainstem of fukuyama-type congenital muscular dystrophy. J Neuropathol Exp

Neurol 62:497–508.

Satz JS, Barresi R, Durbeej M, Willer T, Turner A, Moore S a, Campbell KP (2008) Brain and eye malformations resembling Walker-Warburg syndrome are recapitulated in mice by dystroglycan deletion in the epiblast. J Neurosci 28:10567–10575.

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.

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.

Smith FI, Qu Q, Hong SJ, Kim K-S, Gilmartin TJ, Head SR (2005) Gene expression profiling of mouse postnatal cerebellar development using oligonucleotide microarrays designed to detect differences in glycoconjugate expression. Gene Expr patterns 5:740–749.

Sotelo C, Chédotal A (2013) Hindbrain tangential migration. In: Comprehensive Developmental Neuroscience: Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections (Rubenstein JLR, Rakic P, eds), pp 345–362. Elsevier Inc.

Tamada A, Kumada T, Zhu Y, Matsumoto T, Hatanaka Y, Muguruma K, Chen Z, Tanabe Y, Torigoe M, Yamauchi K, Oyama H, Nishida K, Murakami F (2008) Crucial roles of Robo proteins in midline crossing of cerebellofugal axons and lack of their up-regulation after midline crossing. Neural Dev 3:29.

Unni DK, Piper M, Moldrich RX, Gobius I, Liu S, Fothergill T, Donahoo A-LS, Baisden JM, Cooper HM, Richards LJ (2012) Multiple Slits regulate the development of midline glial populations and the corpus callosum. Dev Biol 365:36–49.

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.

Voiculescu O, Charnay P, Schneider-Maunoury S (2000) Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. genesis 26:123–126.

Watanabe H, Murakami F (2009) Real time analysis of pontine neurons during initial stages of nucleogenesis. Neurosci Res 64:20–29.

Weiner JA, Koo SJ, Nicolas S, Fraboulet S, Pfaff SL, Pourquie O, Sanes JR (2004) Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. Mol Cell Neurosci 27:59–69.

Wolfer DP, Henehan-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.

Wright KM, Lyon KA, Leung H, Leahy DJ, Ma L, Ginty DD (2012) Dystroglycan Organizes Axon Guidance Cue Localization and Axonal Pathfinding. Neuron 76:931–944.

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.

Ypsilanti AR, Zagar Y, Chédotal A (2010) Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. Development 137:1939–1952.

Yuan W, Rao Y, Babiuk RP, Greer JJ, Wu JY, Ornitz DM (2003) A genetic model for a central (septum transversum) congenital diaphragmatic hernia in mice lacking Slit3. Proc Natl Acad Sci USA 100:5217–5222.

Yurchenco PD, Wadsworth WG (2004) Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. Curr Opin Cell Biol 16:572–579.

Zallen JA, Kirch SA, Bargmann CI (1999) Genes required for axon pathfinding and

extension in the C. elegans nerve ring. Development 126:3679–3692.

Zelina P, Blockus H, Zagar Y, Péres A, Friocourt F, Wu Z, Rama N, Fouquet C, Hohenester E, Tessier-Lavigne M, Schweitzer J, Crollius HR, Chédotal A (2014) Signaling Switch of the Axon Guidance Receptor Robo3 during Vertebrate Evolution. Neuron 84:1–15.

Legends

Figure 1.

***Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{\Delta/\Delta}$* mice phenocopy *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{-/-}$* knockouts.**

(A-E) LSM images (ventral views) of the forebrain after Tag-1 immunostaining and 3DISCO clearing . In controls (A, B, D, F), the LOT forms a single fascicle whereas in *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{-/-}$* (C) and *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{\Delta/\Delta}$* (E) mice, the LOT is defasciculated (arrowheads) and closer to the midline. (F) illustrates the optic nerve crossing defects at the chiasm in *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{\Delta/\Delta}$* mutants. G-J, LSM images of the FR decussation at the level of the interpeduncular nucleus. FR axons cross multiple times the floor plate in *Robo1$^{+/-}$;Robo2$^{+/-}$* embryos (G) but not in In *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{-/-}$* (H) and *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{\Delta/\Delta}$* (J) mutants. Note the disorganization of the optic chiasm (Ch) in mutants. K, lateral and ventral LSM views of 3DISCO cleared E16 brains immunostained for Robo3 (red) and Barhl1 (green). The right panel is a view in the direction of the arrowhead (left panel) after the region above the dashed line has been removed using Imaris.

Abbreviations: AC, anterior commissure; aems, anterior extramural stream; Ce, cerebellum; Co, colliculus; Cx, Cortex, FR, fasciculus retroflexus; Ha, habenula; OB: olfactory bulb; LRN, lateral reticular nucleus, PN, pons; RL, rhombic lip.

Figure 2.

PN neurons migrate prematurely to the midline in *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{\Delta/\Delta}$* mice.

All panels are LSM images of 3DISCO-cleared E16 embryo hindbrains immuno-labeled with anti Barhl1 and Robo3 antibodies. (A) Ventral views (top panel) and lateral views of a *Robo1$^{+/-}$;Robo2$^{+/-}$* embryo illustrating the normal migration pathway followed by PN neurons from the rhombic lip to the floor plate (dashed line). (B) Many PN neurons migrate prematurely to the midline in *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{-/-}$* double knockout. (C, D) no migration defects were seen in *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{L/L}$* embryos (C) but *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{\Delta/\Delta}$* embryos phenocopied *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{-/-}$* mutants. Abbreviations: FR, fasciculus retroflexus.

Figure 3.

PN neurons migrate normally in *Wnt1:Cre; Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{L/L}$* knockouts.

All panels are LSM images of 3DISCO-cleared E16 embryo hindbrains immune-labeled with anti Barhl1 and Robo3 antibodies. (A, B) illustrate the normal migration pathway followed by PN neurons in *Wnt1:Cre* (A) and *Wnt1:Cre; Robo1$^{+/-}$;Robo2$^{L/+}$* (B) embryos Wnt1:Cre; *Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{L/L}$* embryos. However, FR axon do not properly cross the floor plate (arrowheads). (C) PN migration is normal in *Wnt1:Cre; Robo1$^{-/-}$;Robo2$^{L/L}$* embryo. FR axons fail to cross the midline. (D) PN neurons leave the rhombic lip but fail to turn ventrally in a in *Wnt1:Cre;Robo3$^{L/L}$* embryo.

Figure 4

(A) coronal sections of E11 *Shh:Cre* spinal cord immunolabeled for GFP (right panel) or Dcc and GFP (left panel). GFP is restricted to the floor plate crossed by Dcc+ commissural axons. (B) spinal cord section of E12 $S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$ and $Shh:Cre;S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$ embryos hybridized with a Slit2exon8 riboprobe. In $S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$, Slit2 is expressed at the floor plate (arrowhead) and in motor neurons (MN). In $Shh:Cre;S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$, Slit2 is not detected in the floor plate (arrowhead) but is still expressed in MN. The two insets on the right side are high magnification pictures of the floor plate in both mice. (C, D) Robo3 immunolabeling on E12 spinal cord sections (left panels; confocal imaging) or on whole–mount spinal cord cleared with 3DISCO (right panels; LSM). Note the accumulation of Robo3+ axons at the floor plate (arrowheads in D) in $Shh:Cre;S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$ embryos compared to $S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$ embryo. The two longitudinal domains (arrowhead in C) with weaker Robo3 expression in $S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$ spinal cord are not seen in $Shh:Cre;S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$ mutant. (E, F) confocal images of spinal cord sections from E12 embryos immunolabeled for Dcc (left panels) and Robo1 (right panels). The ventral commissure labeled by Dcc is enlarged in $Shh:Cre;S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$ mutant (F) compared to $S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$ (E). In $S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$ embryo, Robo1+ axons are not found in the floor plate (arrowhead in E) unlike in $Shh:Cre;S1^{-/-};S2^{L/L};S3^{-/-}$ mutant (arrowhead in F).

Figure 5

Abnormal PN migration in Slit1/2/3 triple knockouts.

(A-F) LSM images (ventral views) of the brain of P0 and E16 mice after Tag-1 immunostaining and 3DISCO clearing . In $S1^{-/-};S2^{L/L}$ (A) the LOT is similar to controls, whereas in $S1^{-/-};S2^{-/-}$ (B) and $S1^{-/-};S2^{\Delta/\Delta};S3^{+/-}$ (C) embryos, LOT axons are defasciculated and project medially. (D-F), are LSM images of the FR decussation at the level of the

interpeduncular nucleus illustrating the FR axon midline crossing defects seen in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{-/-}$ and *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{-/-}$ mutant embryos. (G-L) All panels are LSM images of ventral views of 3DISCO-cleared E16 embryo hindbrains immuno-labeled with anti Barhl1 and Robo3 antibodies. PN migration is normal in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (G) and *Krox20:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (J) embryos. By contrast, in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{-/-}$ (H), *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{-/-}$;*S3*$^{-/-}$ (I), *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{+/-}$ (K) and *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{-/-}$ (L) mutants, multiple chains of PN neurons migrate directly from the rhombic lip to the floor plate where they for ectopic clusters (arrowheads).

Figure 6

Normal PN migration in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ mutants.

(A) coronal section of an E12 *Shh:Cre* embryo immunolabeled for Dcc and GFP. GFP is found at the floor plate crossed by Dcc+ commissural axons. (B) In situ hybridization with a Slit2 exon 8 probe on E12 coronal sections at the level of the facial nucleus of *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$ (left) and *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (right) embryos. Note the absence of Slit2 expression in the floor plate of *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ embryo (arrowhead). Slit2 expression in facial motor neurons (MN) is not affected. (C) confocal images of E12 hindbrain commissures labeled with anti-Dcc. The commissure is enlarged in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (bottom panel) compared to *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$. (D) LSM (left panels) and confocal (right panels) images of *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (upper panels) and *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (lower panels) embryos immunolabeled for Robo1. In *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ mutants Robo1+ axons abnormally enter the midline (arrowheads). (E, F) (A-F) LSM images (ventral views) of the hindbrain of E16 mice after Barhl1/Robo3 immunostaining and 3DISCO clearing. PN neuron migration is similat in *Shh:Cre;S1*$^{+/-}$;*S2*$^{L/+}$;*S3*$^{+/-}$ control and in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$

;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$ or *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ mutants (E). By contrast, severe FR axons midline crossing defects are seen in in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$ or *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ mutants (F).

Figure 7.

PN migration in absence of Slit expression in the facial nucleus.

(A) is a coronal section at the level of the facial nucleus in a *Shh:Cre;Tau*^{mGFP} E15 embryo immunolabeled for GFP and Alcam (a marker of motor neuron and floor plate (Weiner et al., 2004). GFP is highly expressed by facial motor neurons (VII). (B) In situ hybridization with a Slit2 exon 8 probe on E12 coronal sections at the level of the facial nucleus of *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ (left) and *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (right) embryos. Slit2 mRNA is present at the floor plate (arrowheads) in both cases, but absent from from facial nucleus (VII) in *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ mutants. (C) coronal sections at the level of the facial nucleus of E12 *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ (left) and *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (right) embryos immunolabeled for the two motor neurons markers ChAT and islet1. The facial nucleus (VII) is similar in both mice. (D-H) LSM images (ventral views) of the hindbrain of E16 embryos labeled with Barhl1 and Robo3 antibodies, followed by 3DISCO clearing. The migration pathway followed by PN neurons was similar to controls in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (D), *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ (E) and *Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ (F) mutants. A few small streams of PN neurons (arrowheads) migrate prematurely to the midline in *Shh:Cre;Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$ (G) and *Shh:Cre;Phox2b:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$ (H) mutants. (I, J) confocal images of the ectopic PN neurons (arrowheads). Note that some Robo3+ PN axons turn and extend along the floor plate (arrows).

Figure 8.

Robo1/2 receptors do not control cell-autonomously midline crossing of IO neurons

(A) Ventral view of a wild type P0 (?) brain after whole mount immunolabeling for Foxp2, 3DISCO clearing and LSM. The IO nucleus (IO, arrowhead) strongly expresses Foxp2. (B) the left panel is a high magnification LSM image of a ventral 3D view of the IO at P0 after Foxp2 staining. On the right, to optical sections of the IO nucleus are shown, illustrating the lamellation of the IO. (C-E) LSM 3D views of the IO in *Robo1*$^{+/-}$*;Robo2*$^{+/-}$ (C), *Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{-/-}$ (D), and *Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{\Delta/\Delta}$ (E) mice. The morphology of the IO is abnormal in mice deficient for Robo1 and Robo2, and the nucleus is more compact. (F) are optical coronal sections through the IO of wild type (left) or *Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{-/-}$ (right) E13 embryos labeled with Foxp2. In *Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{-/-}$ mutants some FoxP2 IO neurons enter the floor plate (arrowheads). (G) coronal section of the IO of a *Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{-/-}$ mutants unilaterally injected with DiI in the cerebellum. Retrogradely traced IO neurons are found on the contralateral side (contra) but also on the ipsilateral side (ipsi, arrowhead). (H) normal development of the IO *in Ptf1a:Cre;Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{L/L}$ mutants. The left panel is a 3D LSM view of the IO labeled with anti-FoxP2. Note the absence of compaction of the nucleus. The right panels are coronal sections of the olive of a DiI-injected P0 mouse. All DiI labeled neurons are on the side contralateral to the injection. (I) coronal sections of the IO labeled with Foxp2 in P25 mice. The morphology and lamellation of the IO nucleus are similar in *Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{L/L}$ and *in Ptf1a:Cre;Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{L/L}$ mice.

Scale bars

Figure 9.

Slits control the development of the IO nucleus.

(A-D) 3D LSM view of the IO nucleus (top panels) and optical sections through the IO (lower panels) of P0 hindbrains immunolabeled for Foxp2 and cleared with 3DISCO. In S1-

/-;S2-/- (A) and), *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{\Delta/\Delta}$;*S3*$^{+/-}$ (C) mutants the IO is abnormal and more compact than wild type (see Figure 8). IO morphology is normal in *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$ (B) mice. (D) *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ mutant, the morphology of the IO is also perturbed, and "holes" can bee seen laterally (arrowheads). (E) coronal section of the IO of P0 *Slit* mutants unilaterally injected with DiI in the cerebellum. In *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ and *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$mice, all retrogadelly neurons are on the contralateral side as in wild type. A few DiI labeled IO neurons are found in the ipsilateral IO of *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{+/-}$ mutant (arrowhead). This is also the case in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$;*S3*$^{-/-}$ mutant in which a larger fraction of ispilaterally projecting IO neurons is found (arrowhead). (F) coronal sections at the level of the IO of E12?; E13 and E14 embryos labeled with Foxp2. In *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ embryo, IO neurons stop at the midline, whereas in all the other mutants, Foxp2+ IO neurons enter the floor plate (arrowheads). (G) coronal sections of the IO of P25 mice immunolabeled for Foxp2. The morphology of the IO is perturbed in *Shh:Cre;S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ mutant compared to *S1*$^{-/-}$;*S2*$^{L/L}$ mice. The IO is more compact and lamellation is abnormal.

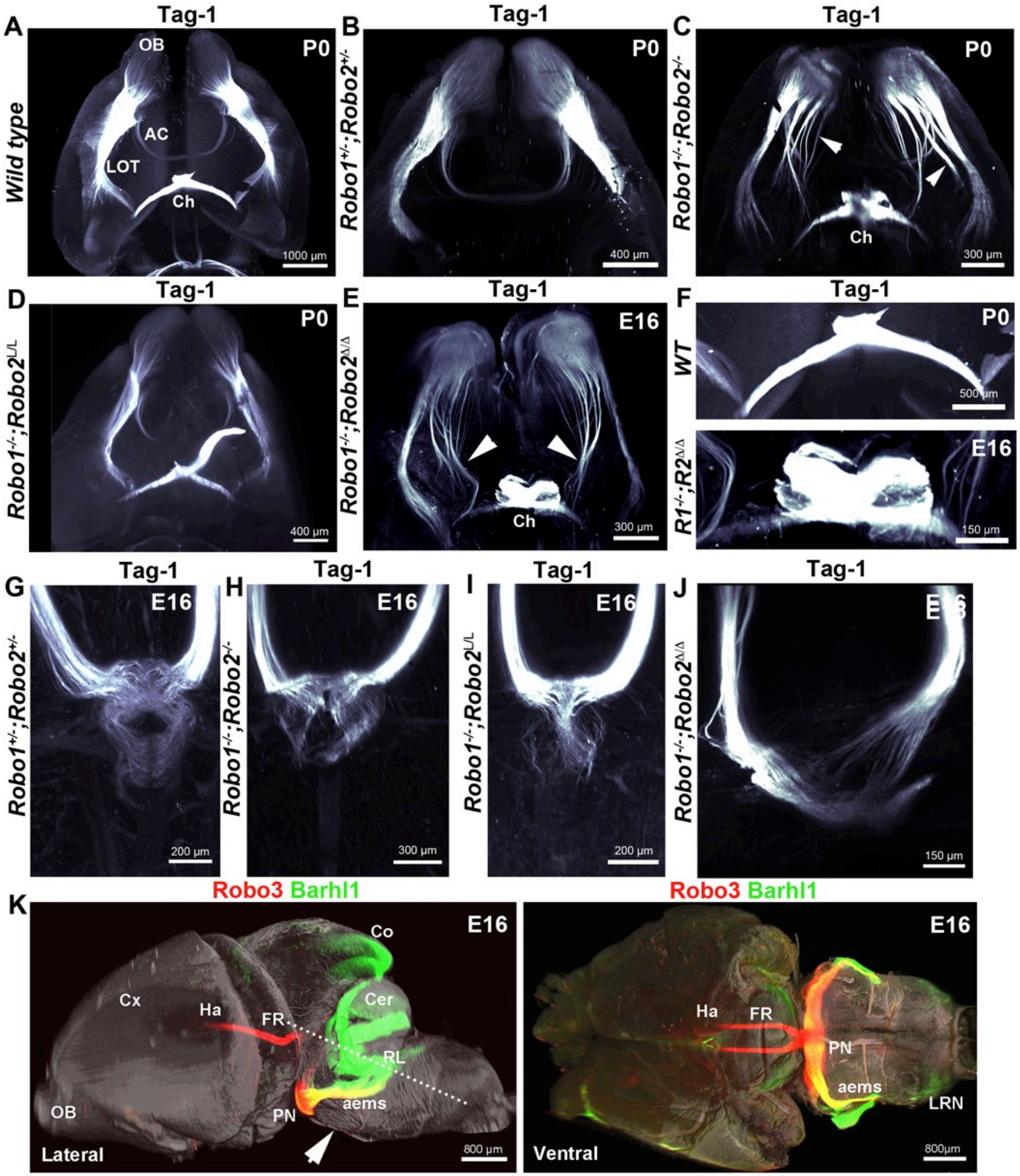

A
Tag-1
P0
Wild type
OB
AC
LOT
Ch
1000 µm
B
Tag-1
P0
Robo1+/-;Robo2+/-
400 µm
C
Tag-1
P0
Robo1-/-;Robo2-/-
Ch
300 µm
D
Tag-1
P0
Robo1-/-;Robo2L/L
400 µm
E
Tag-1
E16
Robo1-/-;Robo2Δ/Δ
Ch
300 µm
F
Tag-1
P0
WT
500 µm
E16
R1-/-;R2Δ/Δ
150 µm
G
Tag-1
E16
Robo1+/-;Robo2+/-
200 µm
H
Tag-1
E16
Robo1-/-;Robo2-/-
300 µm
I
Tag-1
E16
Robo1-/-;Robo2L/L
200 µm
J
Tag-1
Robo1-/-;Robo2Δ/Δ
150 µm
K
Robo3 Barhl1
E16
Co
Cx
Ha
FR
Cer
RL
aems
OB
PN
Lateral
800 µm
Robo3 Barhl1
E16
Ha
FR
PN
aems
LRN
Ventral
800µm

Figure 1

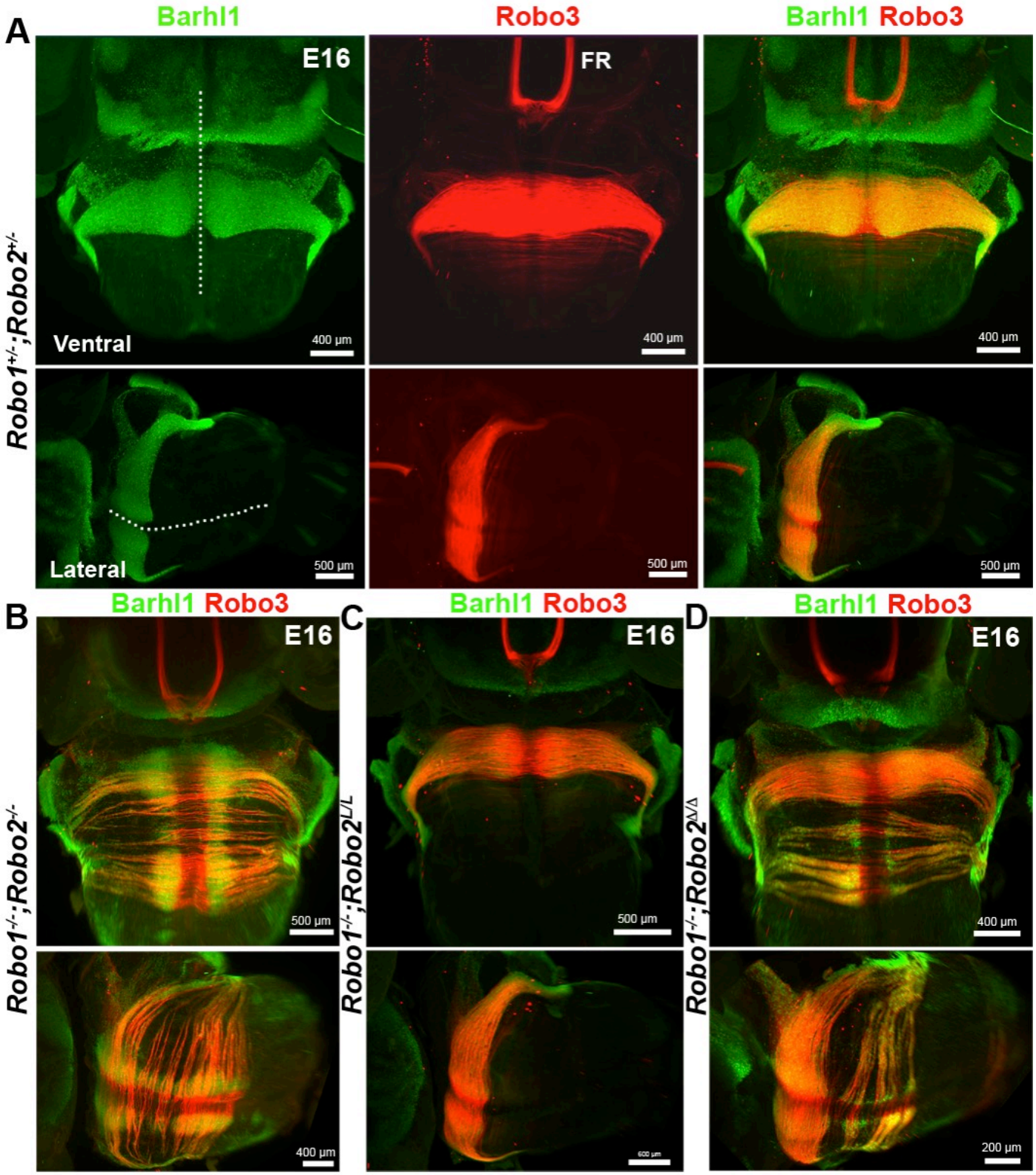

A
Barhl1
Robo3
Barhl1 Robo3
E16
FR
Ventral
Lateral
400 µm
500 µm
Robo1+/-;Robo2+/-
B
C
D
Robo1-/-;Robo2-/-
Robo1-/-;Robo2L/L
Robo1-/-;Robo2Δ/Δ
200 µm

Figure 2

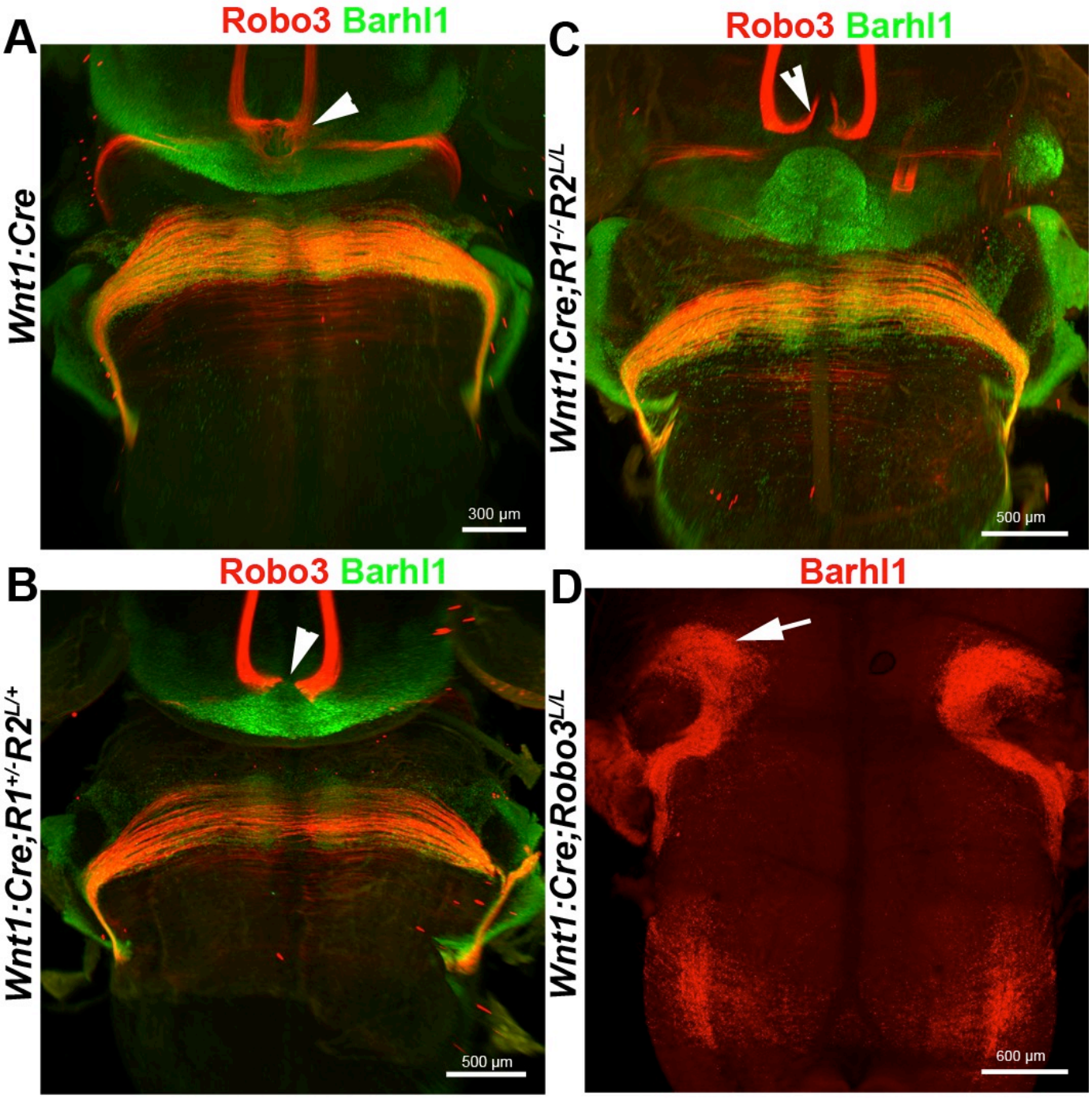

A
Robo3 Barhl1
Wnt1:Cre
300 µm
C
Robo3 Barhl1
Wnt1:Cre;R1-/-R2L/L
500 µm
B
Robo3 Barhl1
Wnt1:Cre;R1+/-R2L/+
500 µm
D
Barhl1
Wnt1:Cre;Robo3L/L
600 µm

Figure 3

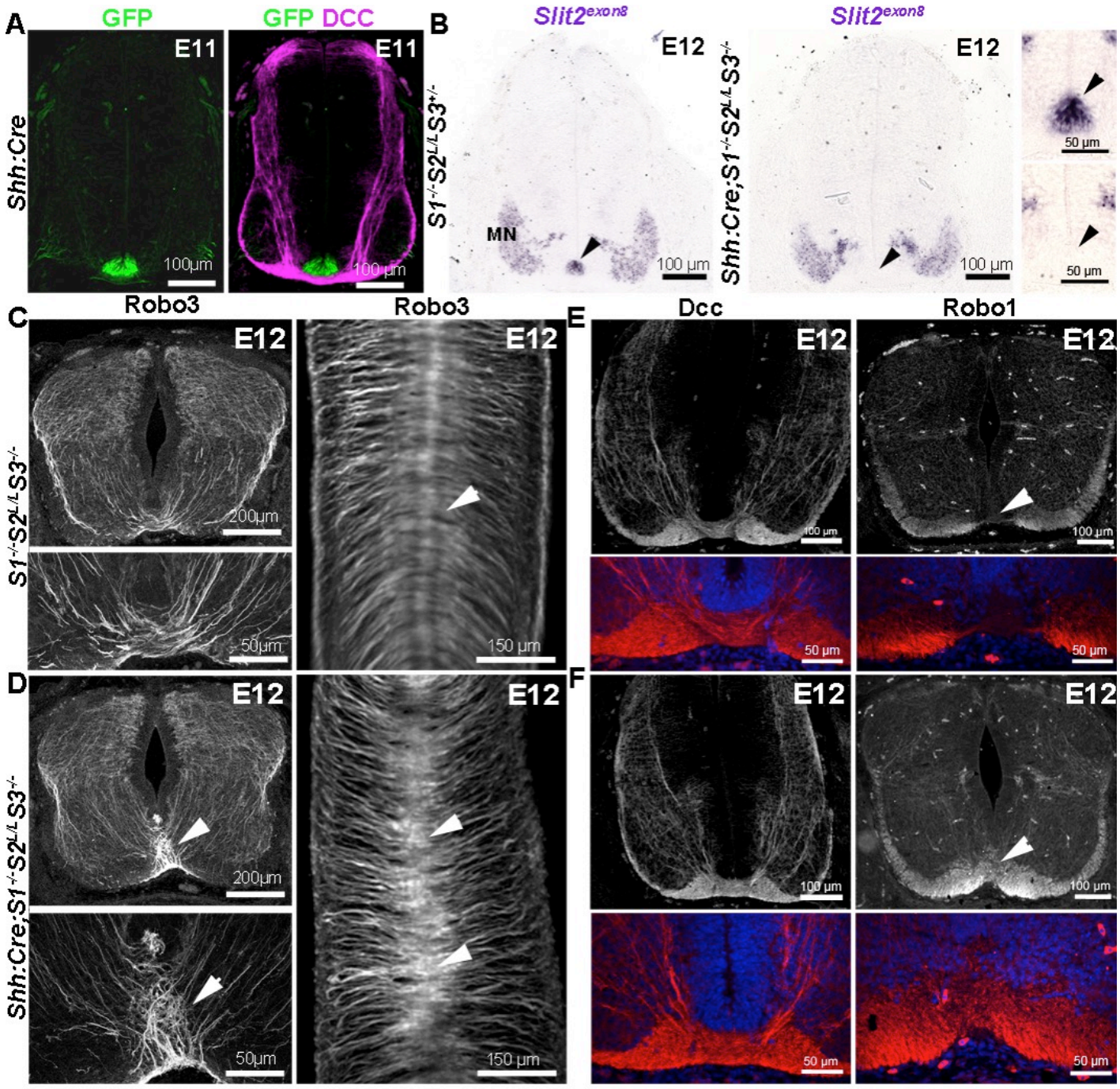

A
GFP
GFP DCC
E11
E11
Shh:Cre
100µm
100µm
B
Slit2exon8
Slit2exon8
E12
E12
S1-/-S2L/LS3+/-
Shh:Cre;S1-/-S2L/LS3-/-
MN
100 µm
100 µm
50 µm
50 µm
C
Robo3
Robo3
E12
E12
S1-/-S2L/LS3-/-
200µm
50µm
150 µm
D
E12
E12
Shh:Cre;S1-/-S2L/LS3-/-
200µm
50µm
150 µm
E
Dcc
Robo1
E12
E12
100 µm
100 µm
50 µm
50 µm
F
E12
E12
100 µm
100 µm
50 µm
50 µm

Figure 4

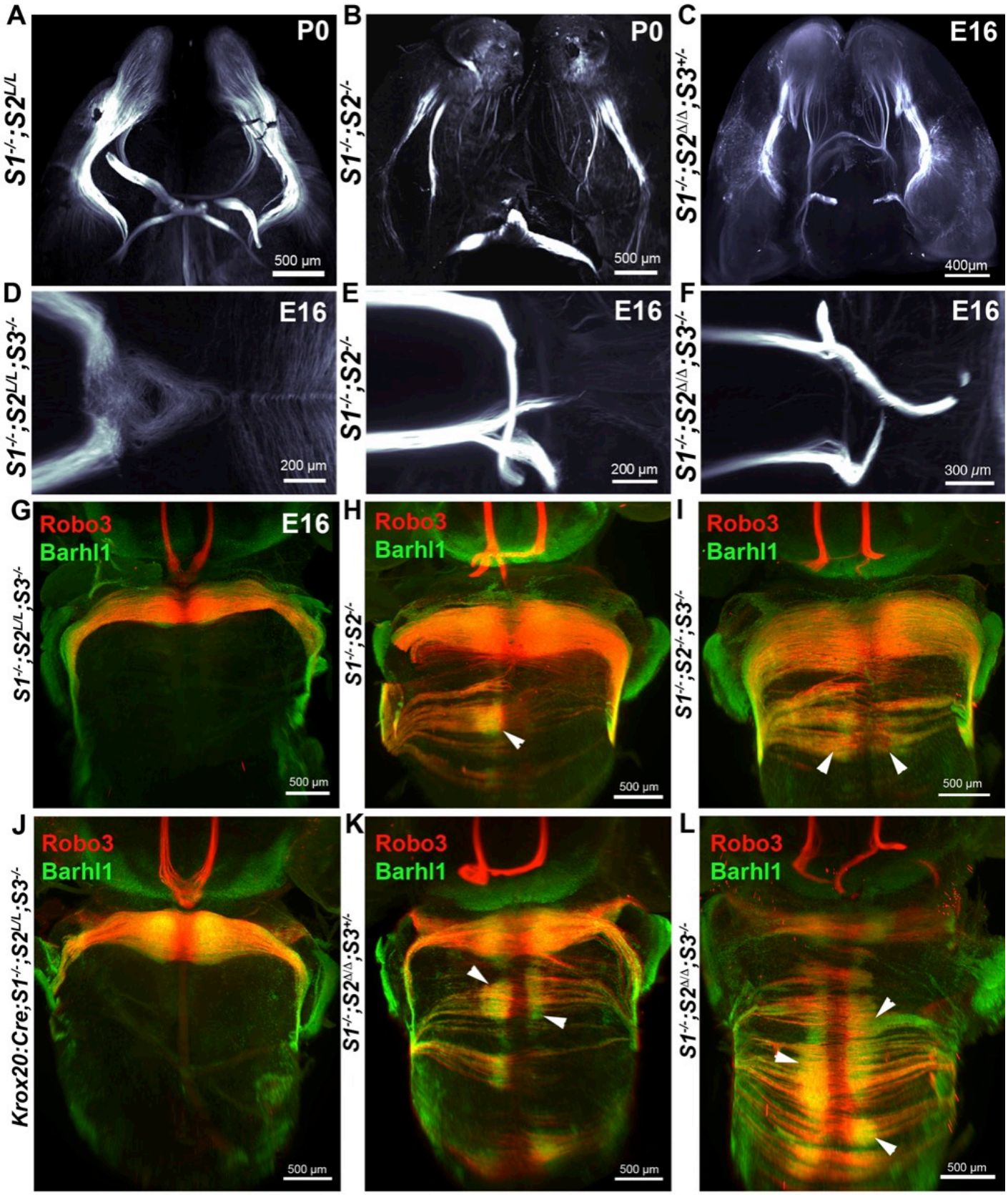

A
P0
S1-/-;S2L/L
500 µm
B
P0
S1-/-;S2-/-
500 µm
C
E16
S1-/-;S2Δ/Δ;S3+/-
400µm
D
E16
S1-/-;S2L/L;S3-/-
200 µm
E
E16
S1-/-;S2-/-
200 µm
F
E16
S1-/-;S2Δ/Δ;S3-/-
300 µm
G
Robo3
Barhl1
E16
S1-/-;S2L/L;S3-/-
500 µm
H
Robo3
Barhl1
S1-/-;S2-/-
500 µm
I
Robo3
Barhl1
S1-/-;S2-/-;S3-/-
500 µm
J
Robo3
Barhl1
Krox20:Cre;S1-/-;S2L/L;S3-/-
500 µm
K
Robo3
Barhl1
S1-/-;S2Δ/Δ;S3+/-
500 µm
L
Robo3
Barhl1
S1-/-;S2Δ/Δ;S3-/-
500 µm

Figure 5

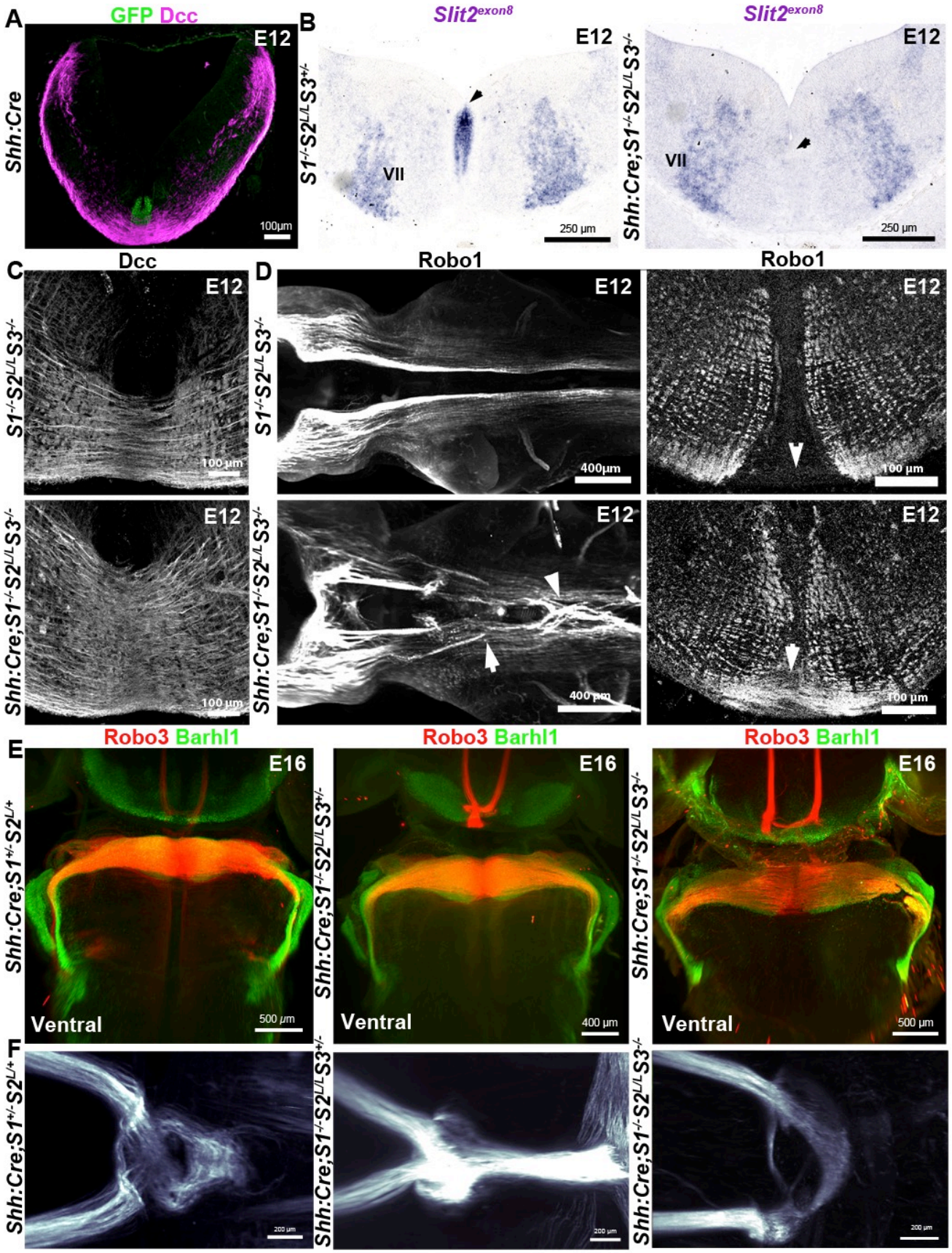

A
GFP Dcc
E12
Shh:Cre
100µm
B
Slit2exon8
E12
S1-/-S2L/LS3+/-
VII
250 µm
Slit2exon8
E12
Shh:Cre;S1-/-S2L/LS3-/-
VII
250 µm
C
Dcc
E12
S1-/-S2L/LS3-/-
100 µm
E12
Shh:Cre;S1-/-S2L/LS3-/-
100 µm
D
Robo1
E12
S1-/-S2L/LS3-/-
400µm
Robo1
E12
100 µm
E12
Shh:Cre;S1-/-S2L/LS3-/-
400 µm
E12
100 µm
E
Robo3 Barhl1
E16
Shh:Cre;S1+/-S2L/+
Ventral
500 µm
Robo3 Barhl1
E16
Shh:Cre;S1-/-S2L/LS3+/-
Ventral
400 µm
Robo3 Barhl1
E16
Shh:Cre;S1-/-S2L/LS3-/-
Ventral
500 µm
F
Shh:Cre;S1+/-S2L/+
200 µm
Shh:Cre;S1-/-S2L/LS3+/-
200 µm
Shh:Cre;S1-/-S2L/LS3-/-
200 µm

Figure 6

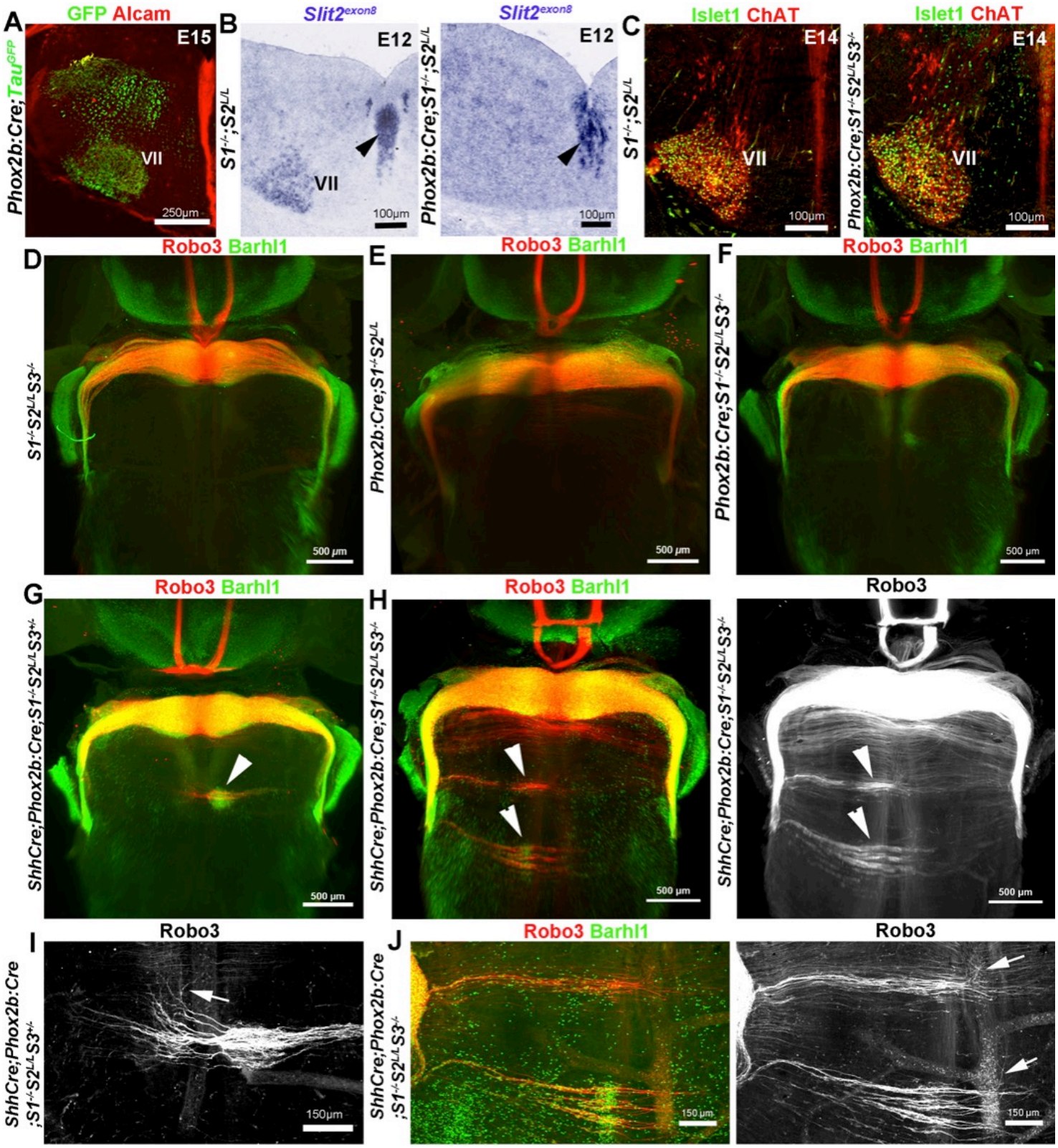

A
GFP Alcam
E15
Phox2b:Cre;Tau^GFP
VII
250µm
B
Slit2^exon8
E12
S1^-/-;S2^L/L
VII
100µm
Slit2^exon8
E12
Phox2b:Cre;S1^-/-;S2^L/L
100µm
C
Islet1 ChAT
E14
S1^-/-;S2^L/L
VII
100µm
Islet1 ChAT
E14
Phox2b:Cre;S1^-/-S2^L/LS3^-/-
VII
100µm
D
Robo3 Barhl1
S1^-/-S2^L/LS3^-/-
500 µm
E
Robo3 Barhl1
Phox2b:Cre;S1^-/-S2^L/L
500 µm
F
Robo3 Barhl1
Phox2b:Cre;S1^-/-S2^L/LS3^-/-
500 µm
G
Robo3 Barhl1
ShhCre;Phox2b:Cre;S1^-/-S2^L/LS3^+/-
500 µm
H
Robo3 Barhl1
ShhCre;Phox2b:Cre;S1^-/-S2^L/LS3^-/-
500 µm
Robo3
ShhCre;Phox2b:Cre;S1^-/-S2^L/LS3^-/-
500 µm
I
Robo3
ShhCre;Phox2b:Cre
;S1^-/-S2^L/LS3^+/-
150µm
J
Robo3 Barhl1
ShhCre;Phox2b:Cre
;S1^-/-S2^L/LS3^-/-
150 µm
Robo3
150 µm

Figure 7

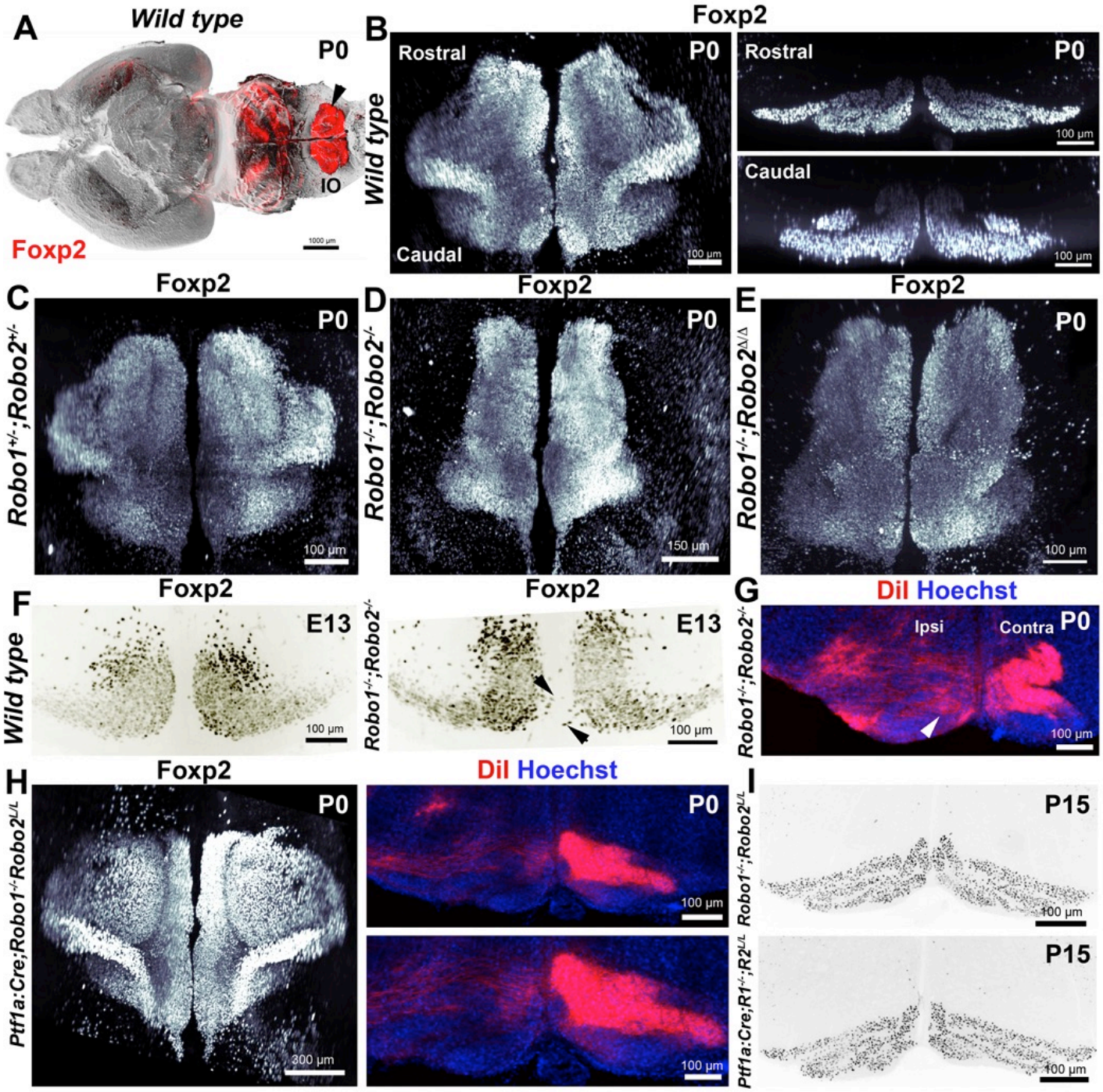

A
Wild type
P0
IO
Foxp2
1000 µm
B
Foxp2
Wild type
Rostral
P0
Caudal
100 µm
Rostral
P0
100 µm
Caudal
100 µm
C
Foxp2
Robo1+/-;Robo2+/-
P0
100 µm
D
Foxp2
Robo1-/-;Robo2-/-
P0
150 µm
E
Foxp2
Robo1-/-;Robo2Δ/Δ
P0
100 µm
F
Foxp2
Wild type
E13
100 µm
Foxp2
Robo1-/-;Robo2-/-
E13
100 µm
G
DiI Hoechst
Robo1-/-;Robo2-/-
Ipsi
Contra
P0
100 µm
H
Foxp2
Ptf1a:Cre;Robo1-/-Robo2L/L
P0
300 µm
DiI Hoechst
P0
100 µm
100 µm
I
Robo1-/-;Robo2L/L
P15
100 µm
Ptf1a:Cre;R1-/-;R2L/L
P15
100 µm

Figure 8

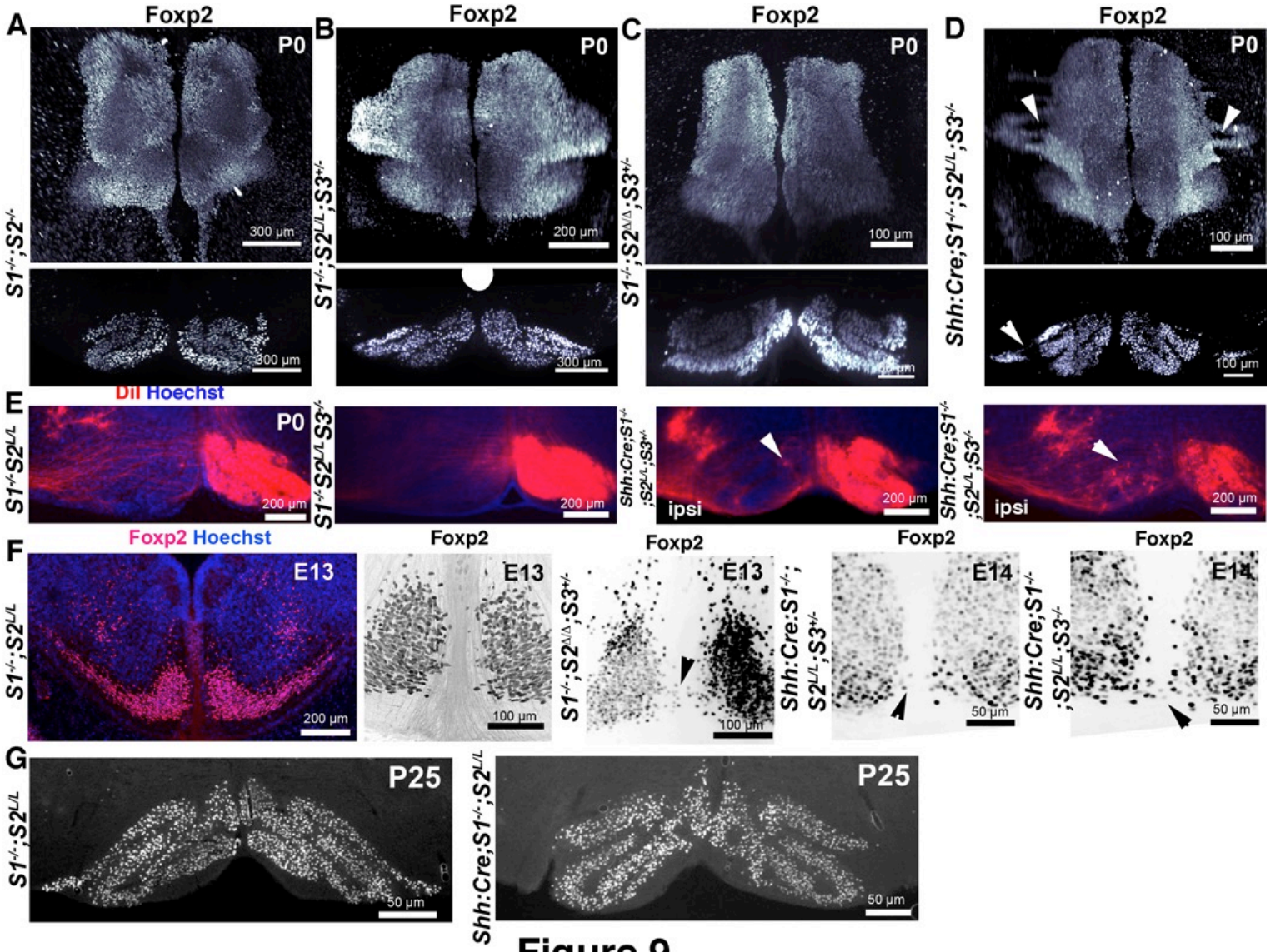

A
Foxp2
P0
300 µm
S1-/-;S2-/-
B
Foxp2
P0
200 µm
S1-/-;S2L/L;S3+/-
C
Foxp2
P0
100 µm
S1-/-;S2Δ/Δ;S3+/-
D
Foxp2
P0
100 µm
Shh:Cre;S1-/-;S2L/L;S3-/-
E
DiI Hoechst
P0
200 µm
S1-/-S2L/L
S1-/-S2L/L S3-/-
Shh:Cre;S1-/-;S2L/L;S3+/-
ipsi
Shh:Cre;S1-/-;S2L/L;S3-/-
F
Foxp2 Hoechst
E13
200 µm
S1-/-;S2L/L
Foxp2
E13
100 µm
S1-/-;S2Δ/Δ;S3+/-
Foxp2
E13
100 µm
Shh:Cre:S1-/-;S2L/L;S3+/-
Foxp2
E14
50 µm
Shh:Cre;S1-/-;S2L/L;S3-/-
Foxp2
E14
50 µm
G
P25
50 µm
S1-/-;S2L/L
P25
50 µm
Shh:Cre;S1-/-;S2L/L

Figure 9

Article 2 : en préparation

Chloé Dominici[1,†], Juan Antonio Moreno-Bravo[1, †], Sergi Roig Puiggros[1, 2], Quentin Rappeneau[1], Nicolas Rama[2], Agnes Bernet[2], Patrick Mehlen[2*] and Alain Chédotal [1,*]

Floor plate-derived Netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance.

1 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 Rue Moreau, 75012 Paris, France.

2 Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

† These authors contributed equally

*corresponding authors: alain.chedotal@inserm.fr , patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr

Abstract

Netrin-1 is an evolutionary conserved secreted extracellular matrix protein discovered using genetic and biochemical screens for its role in axon guidance at the central nervous system (CNS) midline[1,2]. Netrin-1 is expressed by cells localized at CNS midline, such as the floor plate in vertebrate embryos [1,3] . Growth cone turning assays and 3D gel diffusion assays showed that Netrin-1 can attract commissural axons[2,4–6]. Loss-of-function experiments further demonstrated that commissural axon extension to the midline is severely impaired in absence of Netrin-1[3,7]. Together these data support a model in which commissural axons are attracted by a netrin-1 gradient diffusing from the midline. Here we selectively ablated Netrin-1 expression in floor plate cells using a Netrin-1 conditional mouse line. We found that hindbrain and spinal cord commissural axons develop normally in absence of floor plate-derived netrin-1. Furthermore we show that Netrin-1 is highly expressed by cells in the ventricular zone which release it at the pial surface. Netrin-1 is transported ventrally by commissural axons expressing its receptor deleted in colorectal carcinoma (Dcc). Last, Netrin-1 deletion from the ventricular zone phenocopies commissural axon guidance defects previously described in Netrin-1 knockout mice. These results suggest that Netrin-1 primarily acts as a short-range guidance cue.

In developing vertebrates, Netrin-1 expression is the highest at the floor plate, but it is also known to be present in cells adjacent to it (**Fig. 1**)[4,8]. In situ hybridization showed that in the hindbrain and spinal cord of embryonic day 11 (E11) and E13 mouse embryos, Netrin-1 *mRNA* was highly expressed in the floor plate and in the ventricular zone of the basal plate (**Fig.1a; Supplementary Figs 1 and 2**). Netrin-1 immunostaining further showed that netrin-1 protein was not only present at the floor plate (labeled by anti-Alcam/BEN/SC1 antibodies) but also on commissural axons, at the pial surface of the dorsal hindbrain and in the ventricular zone (**Fig.1b; Supplementary Figs 1 and 2**). We could confirm the presence of netrin-1 in the ventricular zone (VZ) using a *Netrin-1* hypomorph mouse mutant in which netrin-1 is fused to ß-galactosidase (ß-gal) and trapped into endosomes (**Fig. 1c**). In *Netrin1*$^{+/-}$ embryos, puncta immunopositive for both Netrin-1 and ß-gal were found in the floor plate and VZ. Commissural axons were also netrin-1-immunoreactive (due to the wild type allele) although their cell bodies did not express ß-gal (**Fig. 1c;** n=2). The specificity of the netrin-1 axonal-immunolabelling was confirmed by its absence in *Netrin1*$^{-/-}$ embryos (**Fig. 1d;** n=3) in which netrin-1 immunoreactivity was restricted to ß-gal-positive endosomes. The existence of a ventricular source of netrin-1 was confirmed using double immunostaining for netrin-1 and nestin, a marker of neuronal progenitors. At E10.5, radial processes extending from the ventricle to the pial surface were strongly immunoreactive for netrin-1 and nestin. Netrin-1 appeared to accumulate at the basal lamina (**Fig. 1e and Supplementary Fig. 1f;** n=1). At E13, netrin-1 protein was still enriched at the pial surface

and in radial glia endfeet (**Fig. 1f;** n>5). This suggests that netrin-1 could be released by neuronal progenitors at the surface of the hindbrain and spinal cord and captured by commissural axons. These results also indicate that netrin-1 might influence commissural axons independently of the floor plate.

To date, *in vivo* evidence supporting a key role for floor-plate-derived *netrin-1* in mouse commissural axon guidance come from the phenotypic analysis of netrin-1 hypomorphs[7] or of *Netrin-1* null embryos[9,10] in which netrin-1 was inactivated in all cells. To determine what is the main source of netrin-1 for commissural axons we generated a netrin-1 conditional mouse line (*Netrin-1*$^{L/L}$) and crossed it to three mouse lines expressing Cre recombinase ubiquitously, only in the floor plate or in all cells except the floor plate (see methods). When Cre recombinase was expressed in the germline, netrin-1 was ubiquitously deleted in the resulting homozygous (*Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$) null embryos. Accordingly, no *netrin-1* mRNA was detectable in the hindbrain and spinal cord of *Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$ embryos by *in situ* hybridization (**Fig. 1g** and not shown; n=1/1) although the residual expression of *netrin-1* mRNA *Netrin-1*$^{-/-}$ hypomorphs could be detected (**Supplementary Fig. 2c-e**). Likewise, netrin-1 immunolabelling was fully abrogated in *Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$ embryos (**Fig. 1h;** n=4), further validating the specificity of netrin-1 protein expression pattern in control embryos. This result supports a transport of netrin-1 along commissural axons. Previous studies in drosophila embryo showed that the Dcc receptor homolog Frazzled is expressed on commissural axons and captures netrin-1 to present it to longitudinal axons[11]. The presence of netrin-1 protein on mouse neuronal progenitors and commissural axons suggested

that they could also accumulate netrin-1 in a Dcc-dependent manner. We performed Dcc immunostaining (**Fig.1i-k**; n=5) on E11 and E13 embryos and found that Dcc was highly expressed by commissural axons as previously reported but also by neuronal progenitors and their radial processes in the hindbrain and spinal cord. In the E13 cerebellar plate (**Fig. 1i, j**), 3 hour pulse labeling with EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) and immunostaining for the stem cell marker Sox2, confirmed that Dcc was highly expressed by neuronal progenitors (**Fig. 1j**; n=1). No Dcc staining was detected on sections from *Dcc*$^{-/-}$ knockout[12] embryos (**Fig. 1k**; n=4). Strikingly, on *Dcc*$^{-/-}$ hindbrain sections, netrin-1 expression on Robo3-immunoreactive commissural axons was strongly decreased although it could still be detected at the pial surface and in the floor plate (**Fig. 1l and not shown;** n=3). Together, these data suggest that Netrin-1 bound to Dcc is transported anterogradely along commissural axons.

Next, we analyzed the consequence of a floor plate-specific deletion of netrin-1 expression on the development of commissural axons. As done previously[13], we used a line expressing Cre recombinase under the control of the sonic hedgehog (Shh) promoter (see methods). In the spinal cord and hindbrain of *Shh:Cre:Netrin-1*$^{L/L}$ E11 and E13 embryos, netrin-1 protein was absent from the floor plate (**Fig. 2a,b and Supplementary Fig. S2a, b,** n=3) but a robust expression was still observed on commissural axons, ventricular zone and pial surface as well as on neuronal progenitor processes and endfeet (**Fig. 2a-c and Supplementary Fig. S2a, b;** n=3). The efficiency of netrin-1 ablation from the floor plate was confirmed by *in situ* hybridization (**Fig.2d n=3 and Supplementary Fig. S2f;** n=4). We also confirmed that

green fluorescent protein (GFP) was expressed in the floor plate but not in the vz in *Shh:Cre* embryos (**Fig. 2e;** n=3). To visualize commissural axons trajectory, in *Shh:Cre:Netrin-1*$^{L/L}$ embryos we performed immunostaining for Robo3, Dcc[14] and Robo1 which is expressed by post-crossing commissural axons[15]. As previously described, a severe reduction of the number of Robo3 and Dcc immunopositive axons crossing the midline was observed in hindbrain and spinal cord sections from E11 and E13 *Netrin-1*$^{-/-}$ embryos compared to controls (*Shh:Cre;Netrin1*$^{L/+}$; *Netrin-1*$^{+/-}$ or wild type; **Fig. 2f, g;** n=3**, and Supplementary Fig. 2g,h**; data not shown). The very low number of crossing axons was confirmed by the reduction of the Robo1 staining. As described before[9], the phenotype was even more severe in *Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$ embryos in which midline crossing was almost completely abrogated (**Fig. 2h and Supplementary Fig. 2i**). Remarkably, midline crossing did not appear to be perturbed in *Shh:Cre;Netrin1*$^{L/L}$; embryos, neither in the hindbrain, nor in the spinal cord (**Fig. 2i and Supplementary Fig. 2j**) . These results suggest that commissural axons cross the midline normally in absence of Netrin-1 at the floor plate.

To further confirm that floor plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance, we crossed *Netrin-1*$^{L/L}$ mice to diverse lines known to express Cre recombinase in the hindbrain (data not shown and methods) and performed *in situ* hybridization for Netrin-1. We found that in *Foxg1:cre;Netrin-1*$^{L/L}$ embryos, the expression of *netrin-1* mRNA could not be detected in the hindbrain VZ, although it was still highly expressed in the floor plate (**Fig. 3a, b;** n=2). Accordingly, netrin-1 protein was almost absent from commissural axons and the pial surface of the hindbrain of E11 and E13

Foxg1:cre;Netrin-1$^{L/L}$ embryos (**Fig. 3a, b and Supplementary Fig. S3a;** n=2). Interestingly, Netrin-1 immunoreactivity was still present at the level of the floor plate and its immediate vicinity, suggesting that it does not diffuse far away from the floor plate. The use of a *Rosa*^{tdtomato} reporter line confirmed that *Foxg1:cre* drives expression of the recombinase in most of the hindbrain cells but in only a few floor plate cells (**Supplementary Fig. S3c;** n= 1). The analysis of hindbrain commissures with Robo3, Dcc and Robo1 showed that they were strongly reduced in *Foxg1:cre;Netrin-1*$^{L/L}$ embryos which phenocopy crossing defects found Netrin-1 null embryos (**Fig. 3c;** n=1). As Netrin-1 expression in the ventricular zone of the spinal cord was normal in *Foxg1:cre;Netrin-1*$^{L/L}$ embryos we could not determine if the VZ is also the primary source of Netrin-1 at this level (**Supplementary Fig. S3d, e;** n=1). To further validate that Netrin-1 from the VZ is required for commissural neuron development, we studied the development of the inferior olivary nucleus (ION), whose neurons migrate tangentially under the pial surface from the rhombic lip in the dorsal hindbrain to the floor plate[16]. It was previously shown that their ventral migration is strongly perturbed in *Netrin1*$^{-/-}$ embryos [16]. ION neurons were visualized using immunostaining for the transcription factor Foxp2[17]. At E13, Foxp2 migrating ION neurons have started to reach the floor plate in wild type mice and the nucleus has its characteristic golf club shape (**Fig. 3d**). By contrast, in *Netrin-1*$^{-/-}$ (**Supplementary Fig.S3f**; n=5) and *Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$ embryos (**Fig. 3d;** n=1) only a few ION neurons can reach the midline and most either fail to migrate ventrally or migrate inside the hindbrain (**Fig.3d**). Similar migration defects were found in *Foxg1:cre;Netrin-1*$^{L/L}$ embryos but the ION migrated normally in

Shh:cre;Netrin-1$^{L/L}$ embryos (**Fig. 3d;** n=1). This confirms that Netrin-1 from the VZ and not from the floor plate is required for the development of hindbrain commissural systems.

Netrin-1 is an extracellular matrix protein with a structure close to laminins[4,18] and it binds to integrins[19]. These biochemical properties questioned the ability of Netrin-1 to act as a long-range guidance cue and in Drosophila *netrin-1* mutant, the expression of a membrane-tethered netrin-1 in midline glia rescues midline crossing[20]. Accordingly, it was also shown that netrin-1 attachment to a substrate is required for axon extension and guidance[21]. We show here that netrin-1 is produced by neuronal progenitors in the hindbrain and spinal cord and that it is enriched in the basal lamina at the pial surface. We also show that Netrin-1 only diffuses at a short distance from the floor plate. This suggests that Netrin-1 most likely acts as a short-range cue in the basal lamina. This is reminiscent of the mechanism by which Slit2 and Collagen IV interact at the pial surface of the zebrafish tectum to guide retinal ganglion cell axons[22]. Netrin-1 could be a key component of the ECM that could distribute or organize other guidance cues. Accordingly, netrin-1 was shown to bind Slit2[23].

We also show that commissural axons expressing DCC bind to Netrin-1 and might transport it anterogradely, Although we don't know the underlying mechanism, this could create a Netrin-1-rich circumferential pathway that could help guiding commissural axons towards the midline. It will also be important to determine if like in Drosophila[11], Dcc presents netrin-1 to other receptors and if other netrin-1 receptors , such as neogenin which is highly

expressed by neuronal progenitors[24], could also capture and transport netrin-1.

At the end of the XIXth century, Ramon y Cajal proposed that floor plate cells secrete chemoattractants for spinal cord commissural axons[25], and their existence was confirmed in the eighties using collagen gel cultures[26]. Netrin-1, was then purified from chick brain, shown to be expressed by floor plate and to attract commissural axons *in vitro*[1,4]. Our results suggest that Netrin-1 might not be the main floor plate attractant. Other diffusible proteins, such as Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor are secreted by floor plate cells and contribute to commissural axon attraction[27,28], but in the light of our results it will be important to search for additional attractants.

METHODS SUMMARY

Netrin-1[1], *Dcc*[12] knockouts were previously described and genotyped by PCR. The day of the vaginal plug was counted as embryonic day 0.5 (E0.5). Full details of sample acquisition, molecular and biochemical procedures, and animal studies are provided in Supplementary Information.

REFERENCES

1. Serafini, T. *et al.* The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6. *Cell* **78,** 409–424 (1994).
2. Ishii, N., Wadsworth, W. G., Stern, B. D., Culotti, J. G. & Hedgecock, E. M. UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in C. elegans. *Neuron* **9,** 873–881 (1992).
3. Mitchell, K. J. *et al.* Genetic analysis of Netrin genes in Drosophila: Netrins

guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* **17,** 203–215 (1996).

4. Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. & Tessier-Lavigne, M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78,** 425–435 (1994).
5. Ming, G. L. *et al.* cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* **19,** 1225–1235 (1997).
6. de la Torre, J. R. *et al.* Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* **19,** 1211–1224 (1997).
7. Serafini, T. *et al.* Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* **87,** 1001–14 (1996).
8. Kennedy, T. E., Wang, H., Marshall, W. & Tessier-Lavigne, M. Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord. *J. Neurosci.* **26,** 8866–8874 (2006).
9. Yung, a. R., Nishitani, a. M. & Goodrich, L. V. Phenotypic analysis of mice completely lacking Netrin-1. *Development* **142,** 3686–3691 (2015).
10. Bin, J. M. M. *et al.* Complete Loss of Netrin-1 Results in Embryonic Lethality and Severe Axon Guidance Defects without Increased Neural Cell Death. *Cell Rep.* **12,** 1099–106 (2015).
11. Hiramoto, M., Hiromi, Y., Giniger, E. & Hotta, Y. The Drosophila Netrin receptor Frazzled guides axons by controlling Netrin distribution. *Nature* **406,** 886–889 (2000).
12. Fazeli, A. *et al.* Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* **386,** 796–804 (1997).

13. Joksimovic, M. *et al.* Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **12,** 125–31 (2009).

14. Sabatier, C. *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* **117,** 157–69 (2004).

15. Long, H. *et al.* Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* **42,** 213–23 (2004).

16. Bloch-Gallego, E., Ezan, F., Tessier-Lavigne, M. & Sotelo, C. Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. *J. Neurosci.* **19,** 4407–20 (1999).

17. Fujita, H. & Sugihara, I. FoxP2 expression in the cerebellum and inferior olive: development of the transverse stripe-shaped expression pattern in the mouse cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* **520,** 656–77 (2012).

18. Yurchenco, P. D. & Wadsworth, W. G. Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16,** 572–9 (2004).

19. Yebra, M. *et al.* Recognition of the neural chemoattractant netrin-1 by integrins ??6??4 and ??3??1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev. Cell* **5,** 695–707 (2003).

20. Brankatschk, M. & Dickson, B. J. Netrins guide Drosophila commissural axons at short range. *Nat. Neurosci.* **9,** 188–94 (2006).

21. Moore, S. W., Biais, N. & Sheetz, M. P. Traction on immobilized netrin-1 is sufficient to reorient axons. *Science (80-.).* **325,** (2009).

22. Xiao, T. *et al.* Assembly of Lamina-Specific Neuronal Connections by Slit Bound to Type IV Collagen. *Cell* **146,** 164–176 (2011).

23. Brose, K. *et al.* Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* **96,** 795–806 (1999).

24. Matsunaga, E. *et al.* RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat. Cell Biol.* **6,** 749–755 (2004).

25. Ramon y Cajal, S. La rétine des vertébrés. *Cellule* **1,** 121–247 (1892).

26. Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A. G., Dodd, J. & Jessell, T. M. Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* **336,** 775–778 (1988).

27. Ruiz de Almodovar, C. *et al.* VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1. *Neuron* **70,** 966–978 (2011).

28. Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A. P. & Tessier-Lavigne, M. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* **113,** 11–23 (2003).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Marc Tessier-Lavigne for providing the *Dcc* and *Netrin-1* knockout and Dr Patrick Charnay for the *Krox20:Cre* line. We also thank Stéphane Fouquet of the Vision Institute imaging facility for its technical support. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE13-0004-01). It was performed in the frame of the LABEX LIFESENSES (reference ANR-10-LABX-65) supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-

IDEX-0004-02. C.D was recipient of a PhD fellowship from the Fondation pour la recherche médicale.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Netrin-1 is expressed by ventricular zone progenitors.

Coronal cryostat sections of the hindbrain of E10.5, E11 and E13 embryos.

a, In wild type, *Netrin-1* mRNA is expressed in the floor plate (Fp) and in the ventricular zone (vz). **b**, Netrin-1 immunostaining shows that netrin-1 is expressed at the floor plate (asterisk) but also on commissural axons (arrowheads). **c, d**, netrin-1/ß-gal expression in *Netrin1*$^{+/-}$ (**c**) and *Netrin1*$^{-/-}$ (**d**) embryos. In *Netrin1*$^{+/-}$, both the endosomal-trapped Netrin-1 (yellow puncta) in vz and Fp and the wild type netrin-1 (red) localized on axons (arrowheads) are seen, whereas in *Netrin1*$^{-/-}$ mutant only the Netrin-1-ß-gal fusion protein is seen in the vz and Fp. **e, f**, at E10.5 (**e**) and E13 (**f**), Netrin-1 is highly expressed in Nestin+ radial processes of neuronal progenitors and at the pial surface. **g, h**, *Netrin-1* mRNA and protein are not expressed in *Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$ embryos. The floor plate still expresses Alcam (green). **i**, in the ventral hindbrain, Dcc is expressed by commissural axons and vz cell processes (arrowheads). **j**, this is also the case in the cerebellar plate where Dcc is found in Sox2+/EdU+ progenitors. **k**, Dcc is not expressed in *Dcc*$^{-/-}$ embryo. **l**, in *Dcc*$^{-/-}$ mutant, there is a strong reduction of Netrin-1 expression on Robo3+ commissural axons. Scale bars are 100µm on each panel.

Figure 2

Commissural axons develop normally in absence of floor plate-derived netrin-1.

Coronal cryostat sections of the hindbrain of E13 embryos.

a-c, netrin-1 is not expressed in the floor plate (arrowheads) of *Shh:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ embryos, but it is still present on commissural axons (short arrows in **a**). Floor plate cells (arrowheads in **b**) still express Alcam as in controls. Nestin+ processes appear normal in *Shh:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ embryos (right panel in a) and express high level of Netrin-1 at the pial surface (**c**). **d**, *in situ* hybridization with a riboprobe encoding netrin-1 exon3 confirms that netrin-1 is absent from the floor plate. **e**, in E11 *Shh:Cre* hindbrain, GFP is expressed by floor plate but not in the vz. Commissural axons are immunolabeled for Dcc. **f-h**, in wild type hindbrain (**f**) Robo3+ and Dcc+ commissural axons cross the floor plate (arrowheads) and Robo1 is expressed on post crossing axons. By contrast, in *Netrin-1*$^{-/-}$ mutant (**g**) midline crossing is strongly reduced (arrowheads) and this reduction is even more pronounced in *Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$ embryos (**h**). In both knockouts, Robo1 is still expressed on the few axons that cross the midline (arrowheads). **i**, by contrast, commissures are similar to control in *Shh:Cre;Netrin1*$^{L/L}$.

Scale bars are 100µm on each panel.

Figure 3

Ventricular zone-derived netrin-1 controls commissural axon guidance.

Coronal cryostat sections of the hindbrain of E13 embryos.

a, b, unlike in control (**a**) Netrin-1 mRNA and protein are not expressed in the hindbrain vz of *Foxg1:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ mutant (**b**). However netrin-1 is still found in the floor plate (black arrowheads). Netrin-1 expression on commissural axons is strongly reduced in *Foxg1:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ mutant compared to control (white arrowheads). Note that netrin-1 protein only diffuse at a short distance from the floor plate in *Foxg1:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ embryos (white arrows). **c,** commissural midline crossing is severely perturbed in *Foxg1:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ embryos. Most axons fail to reach the midline (arrow) and only a few cross it (arrowheads). d, in E13 wild type embryos, Foxp2+ olivary neurons (IO) have started to reach the floor plate (arrowhead) which also expresses Foxp2. In *Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$ and *Foxg1:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ embryos, most IO neurons fail to migrate ventrally. By contrast, IO migration is normal in *Foxg1:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ embryos.

Scale bars are 100µm on each panel.

Authors contribution

AC, AB and PM, designed the experiments. CD, JAMB, NR, QR and SRP performed the experiments. AC, CD and JAMB prepared the figures. AC and PM supervised the project and wrote the manuscript.

Competing Interests

We declare no competing interest

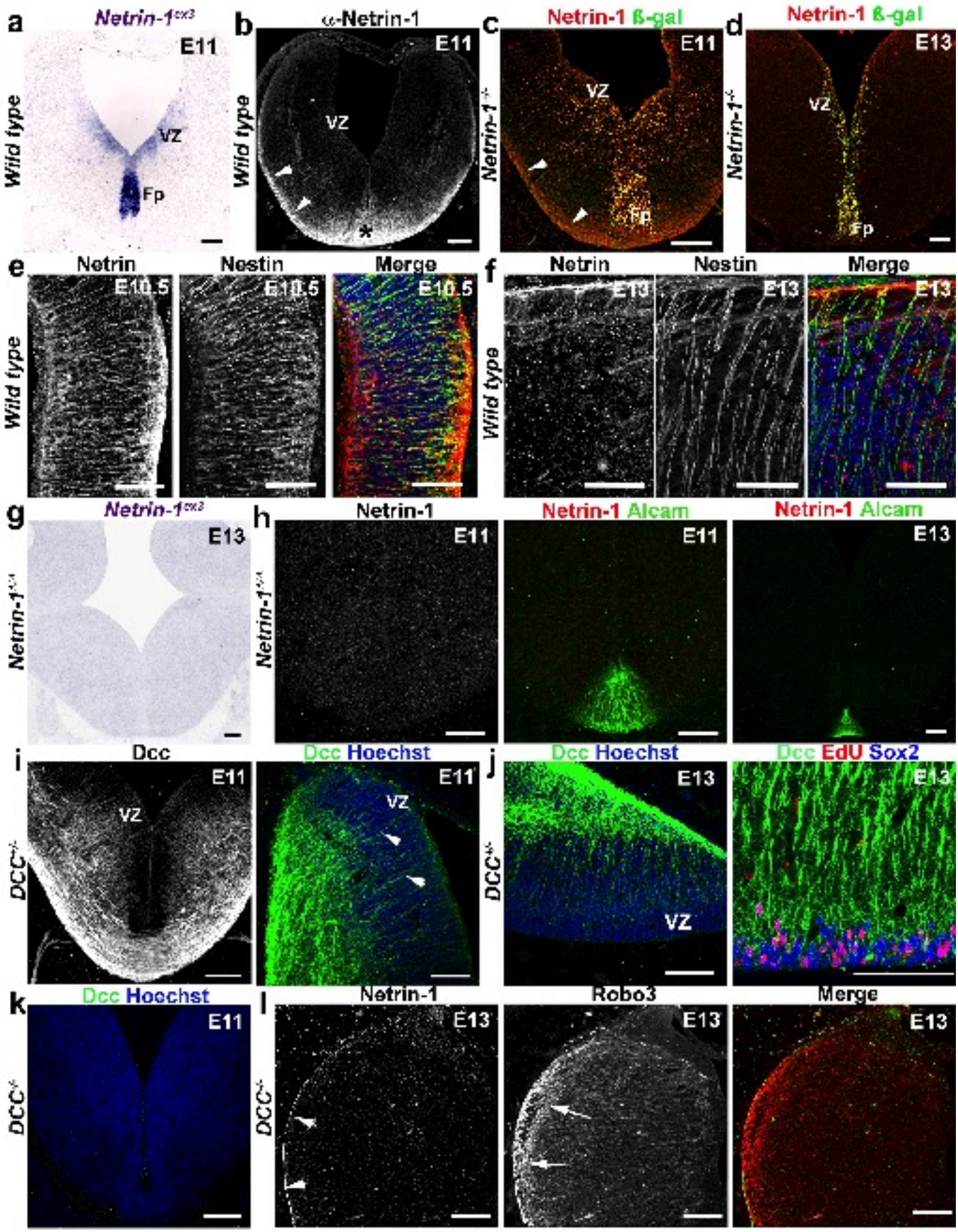

a
Netrin-1cx3
E11
Wild type
VZ
Fp
b
α-Netrin-1
E11
Wild type
VZ
c
Netrin-1 ß-gal
E11
Netrin-1-/-
VZ
Fp
d
Netrin-1 ß-gal
E13
Netrin-1-/-
VZ
Fp
e
Netrin
Nestin
Merge
E10.5
Wild type
f
Netrin
Nestin
Merge
E13
Wild type
g
Netrin-1cx3
E13
Netrin-1cx3
h
Netrin-1
E11
Netrin-1cx3
Netrin-1 Alcam
E11
Netrin-1 Alcam
E13
i
Dcc
E11
VZ
DCC-/-
Dcc Hoechst
E11
VZ
j
Dcc Hoechst
E13
DCC-/-
VZ
Dcc EdU Sox2
E13
k
Dcc Hoechst
E11
DCC-/-
l
Netrin-1
E13
DCC-/-
Robo3
E13
Merge
E13

Figure 1

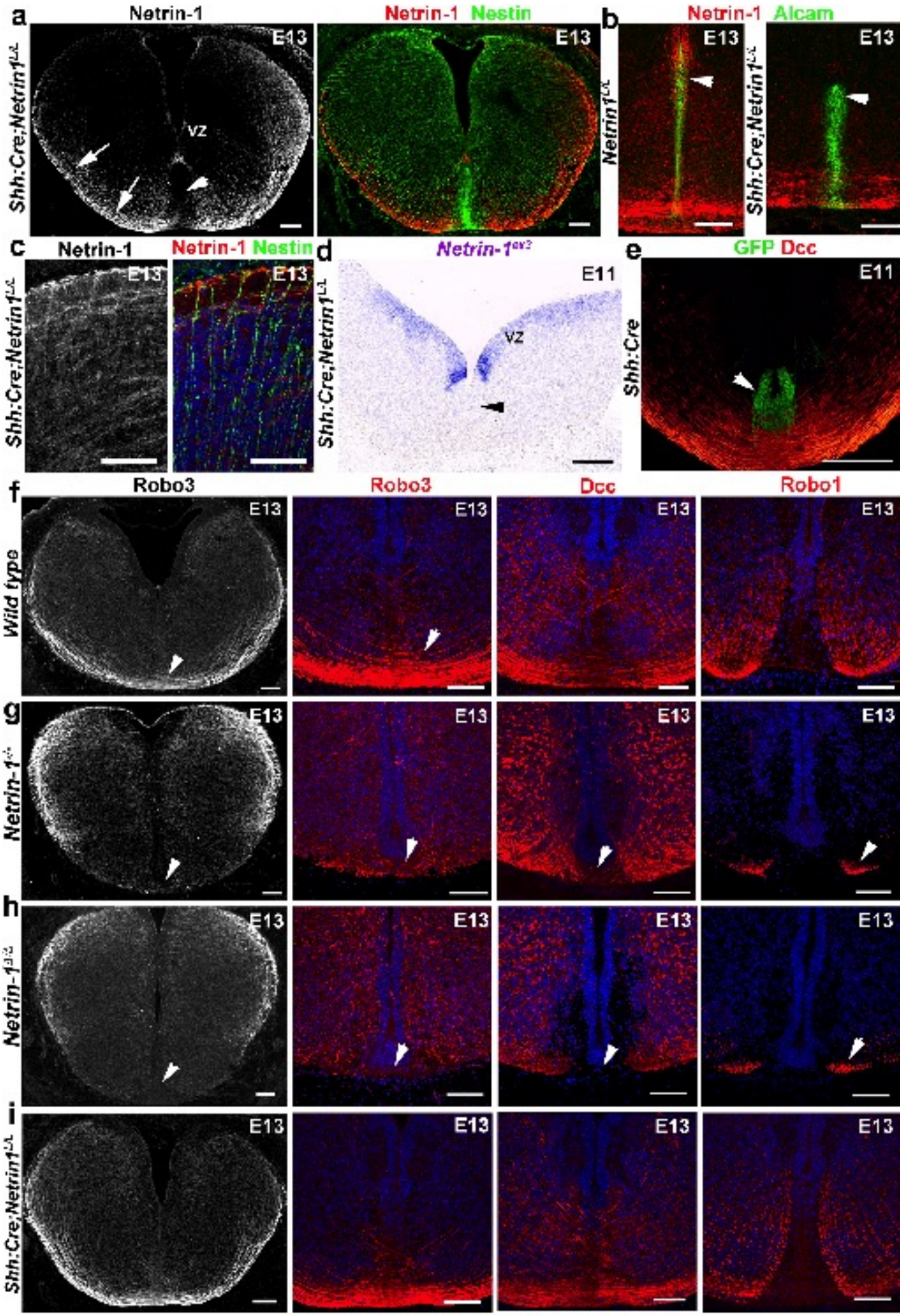

a
Netrin-1
Netrin-1 Nestin
E13
VZ
Shh:Cre;Netrin1LL
b
Netrin-1 Alcam
Netrin1LL
Shh:Cre;Netrin1LL
c
Netrin-1
Netrin-1 Nestin
d
Netrin-1av2
E11
e
GFP Dcc
Shh:Cre
f
Robo3
Dcc
Robo1
Wild type
g
Netrin-1-/-
h
Netrin-1LL
i

Figure 2

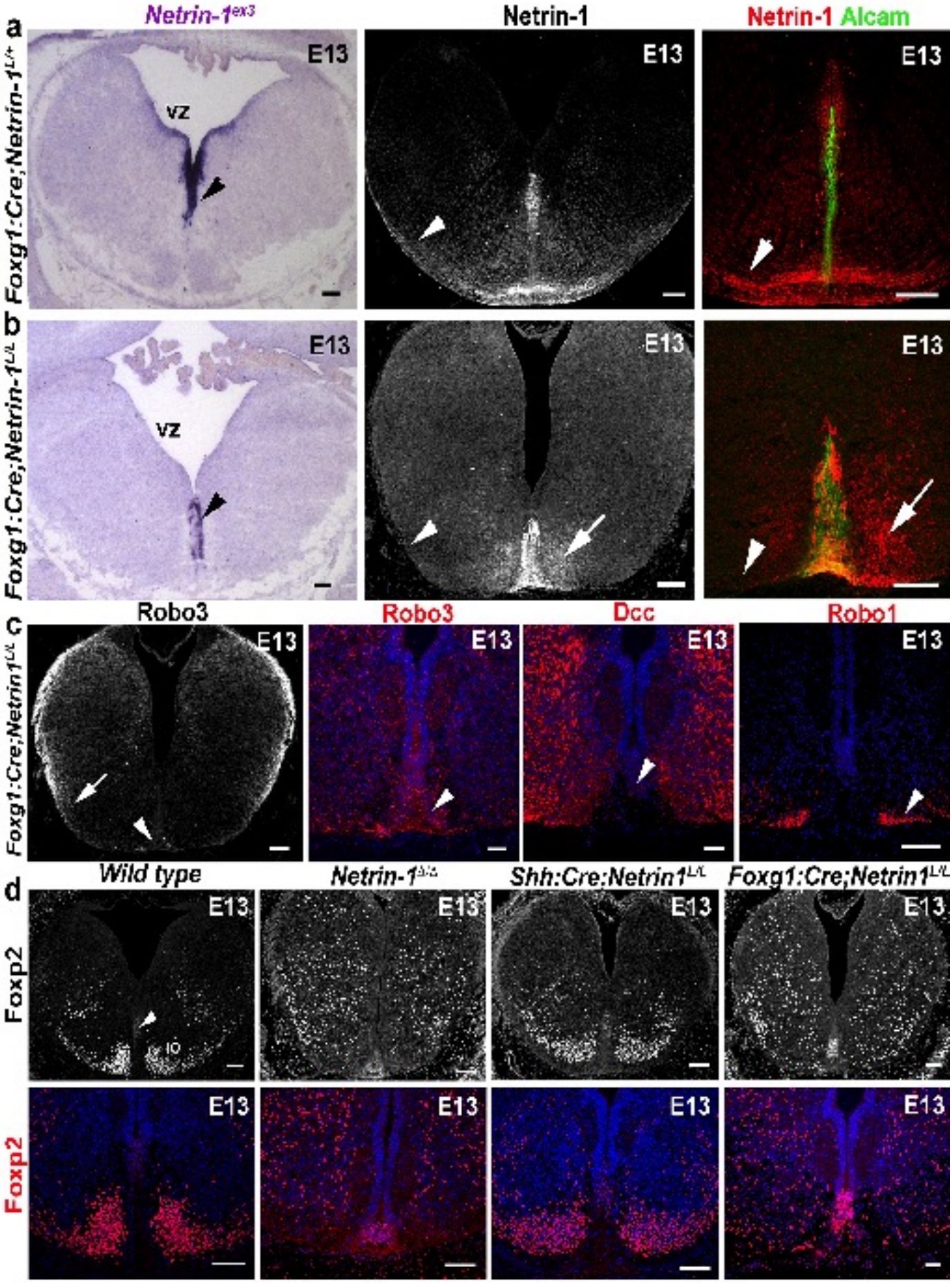

a
Netrin-1ex3
Netrin-1
Netrin-1 Alcam
Foxg1:Cre;Netrin-1L/+
E13
VZ
b
Foxg1:Cre;Netrin-1L/L
c
Robo3
Robo3
Dcc
Robo1
Foxg1:Cre;Netrin1L/L
d
Wild type
Netrin-1Δ/Δ
Shh:Cre;Netrin1L/L
Foxg1:Cre;Netrin1L/L
Foxp2
IO

Figure 3

Supplementary Information for

Floor plate-derived Netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance.

Chloé Dominici, Juan Antonio Moreno-Bravo, Sergi Roig Puiggros, Quentin Rappeneau, Nicolas Rama, Agnes Bernet, Patrick Mehlen* and Alain Chédotal*

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: alain.chedotal@inserm.fr or patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr

This PDF file includes:

Full Methods

Legends for Supplementary Figs 1 to 3

References

FULL METHODS

Mouse strains and genotyping

Netrin-1(Serafini et al., 1996) and *DCC*(Fazeli et al., 1997) knockout lines were previously described and genotyped by PCR. The *Netrin-1* conditional knockout line (Genoway, France) was generated by inserting two *loxp* sites around the third exon of the *netrin-1* gene. To generate a null-allele of netrin-1, *Netrin-1*$^{L/L}$ mice were crossed to *Krox20:Cre* mice which express Cre recombinase in the male and female germline after sexual maturity(Voiculescu et al., 2000). To ablate netrin-1 expression in the floor plate we used the *Shh:cre* line(Harfe et al., 2004) (Jackson laboratories). In this line, the eGFP reporter was also inserted in the Shh locus. Last, we crossed *Netrin-1*$^{L/L}$ mice to *Foxg1:Cre* mice (Hébert and Mcconnell, 2000). The *Rosa*^{tdtomato} reporter line (Ai9 line, Jackson Laboratories) was used to monitor Cre expression(Madisen et al., 2010). All mice are kept in C57BL/6 background. The day of the vaginal plug was counted as embryonic day 0.5 (E0.5). Mice were anesthetized with Ketamine (100mg/ml) and Xylazine (10mg/ml). All animal procedures were carried out in accordance to institutional guidelines and approved by the UPMC University ethic committee (Charles Darwin). Embryos of either sex were used.

EdU labelling

Pregnant females were injected i.p. with EdU(10mg/g) and sacrificed three hours later.

The proliferating cells were visualized after immunohistochemistry using the Alexa Fluor 647 Click-iT EdU Imaging Kit (Invitrogen).

In situ hybridization

Antisense riboprobes were labeled with digoxigenin-11-d-UTP (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) as described elsewhere (Marillat et al., 2002), by *in vitro* transcription of cDNA encoding mouse *Netrin1* (Serafini et al., 1996) or mouse Netrin exon 3.

Immunohistochemistry

Embryos were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer, pH 7.4 (PFA) over night at 4°C. Samples were cryoprotected in a solution of 10% sucrose in 0.12M phosphate buffer (pH7.2), frozen in isopentane at -50°C and then cut at 20µm with a cryostat (Leica). Immunohistochemistry was performed on cryostat sections after blocking in 0.2% gelatin in PBS containing 0.5% Triton-X100 (Sigma). Section were then incubated with the following primary antibodies: goat anti-human Robo3 (1:250, R&D Systems), goat anti-DCC (1:500, Santa Cruz), goat anti-Robo1 (1:500, R&D Systems),rat-anti mouse Netrin1 (1:500, R&D Systems), mouse anti-Nestin-488 (1:1000, Abcam), goat anti-Foxp2 (1:4000, Santa Cruz), rabbit anti-Foxp2 (1:1000, Abcam), rabbit anti-Sox2 (1:500, Abcam), rabbit anti-βgal (1:500, Cappel), goat anti-human Alcam (1:500, R&D Systems), rabbit anti-GFP (1:500, Life Technologies), rabbit anti-Dsred (1:500, Clontech).was followed by an overnight incubation in species-specific secondary antibodies directly conjugated to fluorophores (Cy-5, Cy-3, Alexa-Fluor from Jackson ImmunoResearch, or from Invitrogen). For Netrin-1 immunostaining, an antibody retrieval treatment was peformed on the sections before to process them for immunochemistry. The sections were boiled in citrate buffer (pH 6) during 9 minutes.

Sections were counterstained with Dapi (1 :1000,Sigma).

Section were scanned with a Nanozoomer (Hamamatsu) and laser scanning confocal microscope (FV1000, Olympus). Brightness and contrast were adjusted using Adobe Photoshop.

References

Fazeli, A., Dickinson, S.L.L., Hermiston, M.L., Tighe, R. V, Steen, R.G., Small, C.G.G., Stoeckli, E.T.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. Nature *386*, 796–804.

Harfe, B.D., Scherz, P.J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A.P., and Tabin, C.J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. Cell *118*, 517–528.

Hébert, J.M., and Mcconnell, S.K. (2000). Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. Dev. Biol. *222*, 296–306.

Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. Nat. Neurosci. *13*, 133–140.

Marillat, V., Chédotal, A., Cases, O., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., and Sotelo, C. (2002). Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. J. Comp. Neurol. *442*, 130–155.

Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. Cell *87*, 1001–1014.

Voiculescu, O., Charnay, P., and Schneider-Maunoury, S. (2000). Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. Genesis *26*, 123–126.

Supplementary figure legends

Supplementary Figure 1

Netrin-1 expression in Hindbrain and Spinal Cord

Coronal cryostat sections of the hindbrain of E11 and E13 embryos and spinal cord of E11 embryos

a, Netrin-1 is present in the floor plate (Alcam positive cells in green) but shows but also on commissural axons. **b**, at E13 Netrin-1 is still express in the floor plate and ventricular zone of the basal plate. **c**, at the same stage Netrin-1 is distributed in the midline and it is present in the commissural. **d**, In the spinal cord Netrin-1 is also express by the fp and the progenitors present in the ventricular layer. **e**, as in the hindbrain, Netrin-1 is present in the floor plate, commissural axons, radial glia and basal lamina. **f**, At E10.5, radial processes and commissural axons (Robo3 positive in green) are immunoreactive for Netrin-1. Also Netrin-1 its accumulated in the basal lamina. **g**,**h** *Netrin-1* protein is not expressed in *Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$ embryos. The floor plate (**g**) and the radial glia (**h**) are present in the mutant.

Scale bars are 100µm on each panel.

Supplementary Figure 2

Floor plate-derived netrin-1 is not necessary for the midline crossing in hindbrain and spinal cord.

Coronal cryostat sections of the hindbrain and spinal cord of E11 embryos

a-c, Netrin-1 is not expressed in the spinal cord floor plate (arrowhead in b) of *Shh:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ embryos, but it is still present in the radial glia and it is accumulated on the pial surface (short arrows in **b**).c-f. Netrin-1 is still expressed in the floor plate (arrowhead in b) of *Netrin-1*$^{-/-}$ unlike the *Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$ (e) and *Shh:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ (f) floor plates where is completely absence. **g-i**, at e11 in wild type hindbrain and spinal cord (**g**) commissural axons cross the floor plate (Robo3 and Dcc staining for the hindbrain and Dcc labeling for the spinal cord). In the *Netrin-1*$^{-/-}$ mutant (**h**) midline crossing is reduced (arrowheads) and this phenotype is severe in *Netrin-1*$^{\Delta/\Delta}$ embryos (**i**). Equivalents phenotypes are present in the spinal cord where the axons invade the motor column. By contrast, no midline crossing defects are present in *Shh:Cre;Netrin1*$^{L/L}$ embryos (**j**).

Scale bars are 100μm on each panel except the high magnifications in (c-f) where the scale bar are 25 μm:

Supplementary Figure 3

FoxG1cre driver line target the hindbrain but not the spinal cord ventricular zone.

Coronal cryostat sections of the hindbrain of E11 and E13 embryos and spinal cord of E11 embryos

a-b, In contrast to the wt, in the *Foxg1:cre;Netrin-1*$^{L/L}$ hindbrain Netrin-1 is absent in the ventricular zone(arrowheads in a and b) and in the commissural pathway (short arrows is **a** and **b**).**c**, FoxG1 transgenic line drives the cre expression in the hindbrain cells (Dsred+ cells in red) but not in the floor

plate(arrowheads). Only few floor plate cells are target in some levels of the hindbrain (short arrow). In green Robo3+ commissural axons. d,e In the *Foxg1:cre;Netrin-1*$^{L/L}$ spinal cord the Netrin-1 distribution is unaltered. **f**, In *Netrin-1*$^{-/-}$ the Foxp2+ olivary neurons fail to migrate (arrowheads) ventrally and only few of them are able to reach to the floor plate (arrowheads) .

Scale bars are 100µm on each panel.

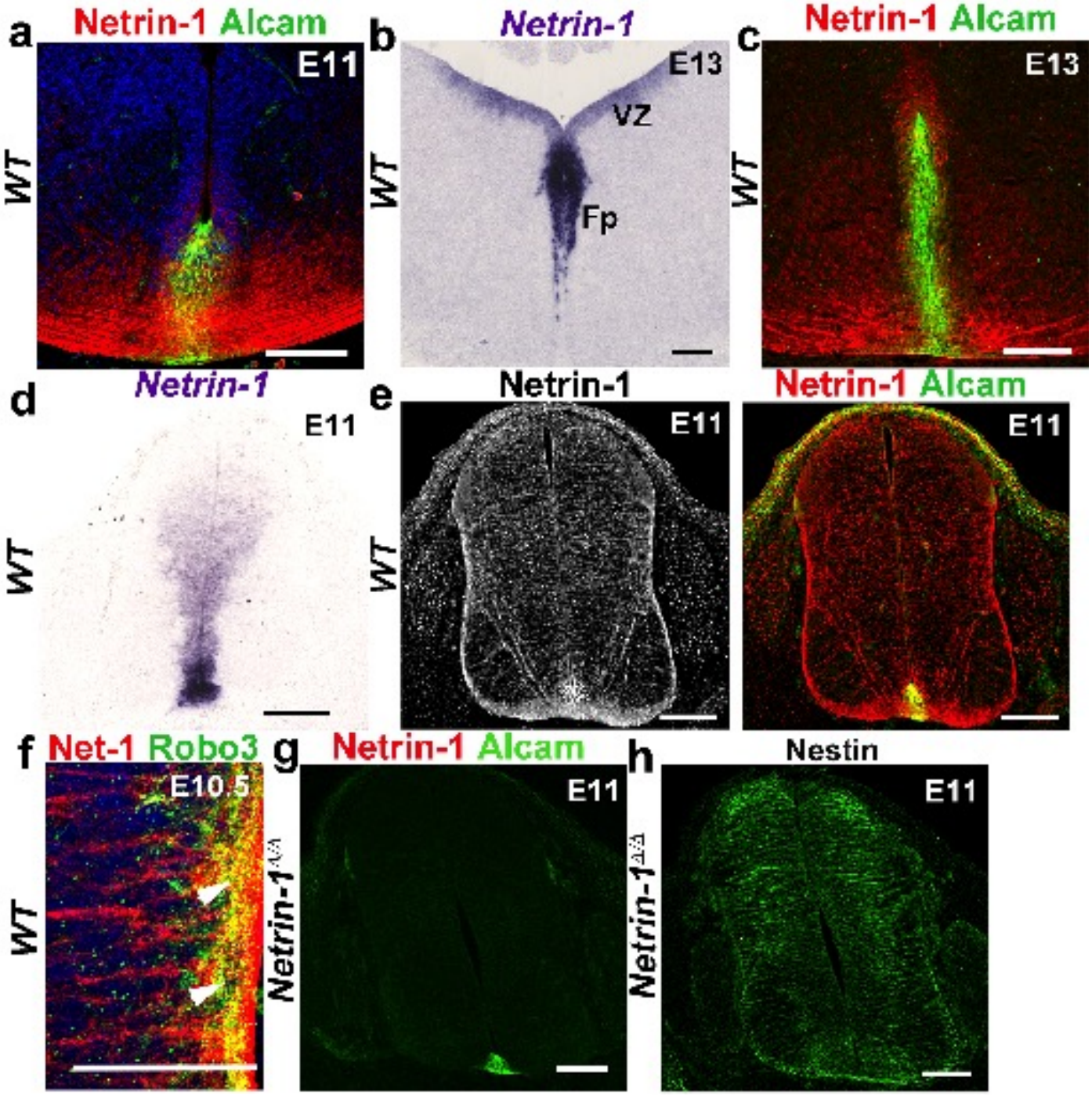

a
Netrin-1 Alcam
E11
WT
b
Netrin-1
E13
VZ
Fp
WT
c
Netrin-1 Alcam
E13
WT
d
Netrin-1
E11
WT
e
Netrin-1
E11
WT
Netrin-1 Alcam
E11
f
Net-1 Robo3
E10.5
WT
g
Netrin-1 Alcam
E11
Netrin-1Δ/Δ
h
Nestin
E11
Netrin-1Δ/Δ

Figure S1

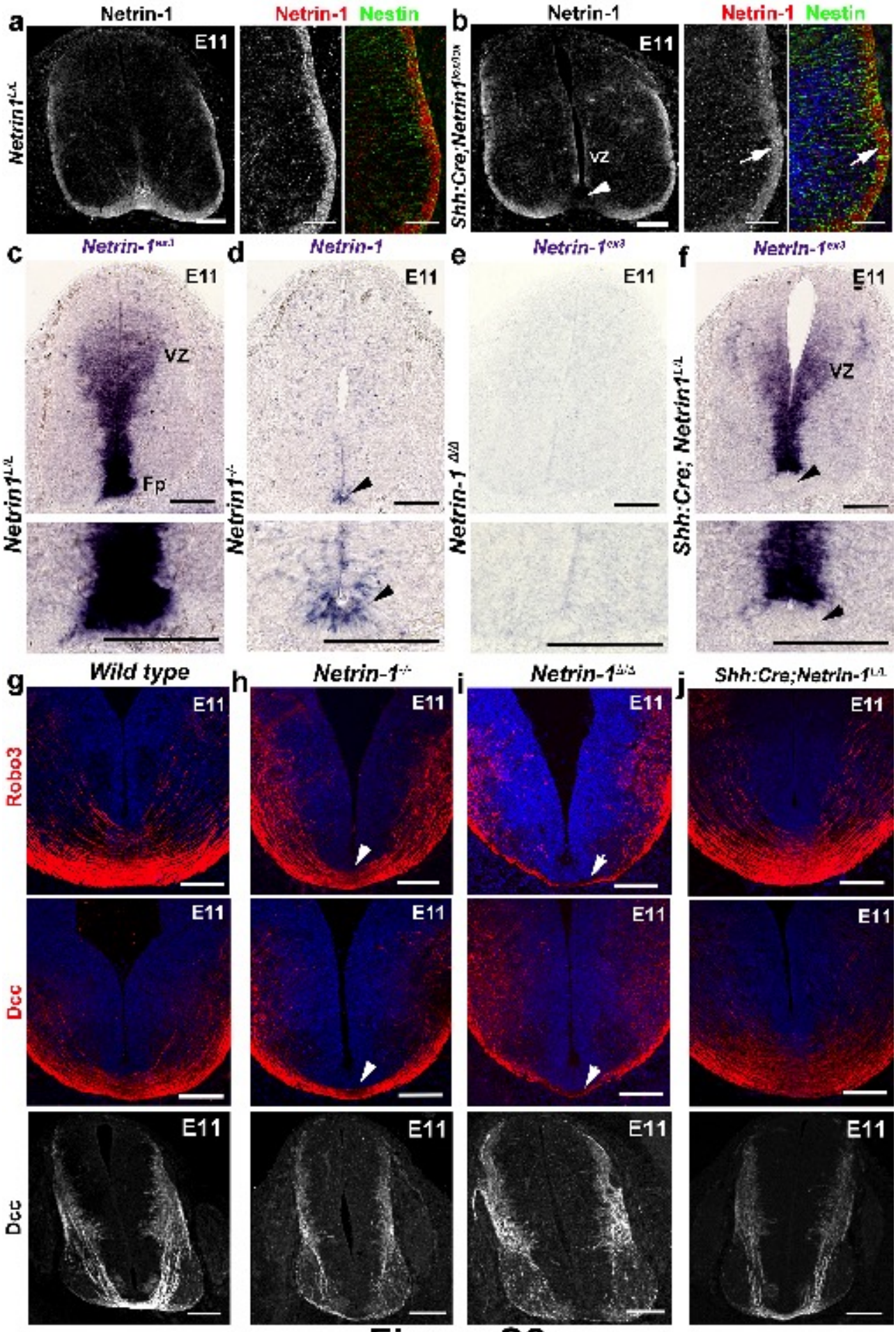

a
Netrin-1
Netrin-1 Nestin
E11
Netrin1L/L
b
Netrin-1
Netrin-1 Nestin
E11
VZ
Shh:Cre;Netrin1L/L
c
Netrin-1ex3
E11
VZ
Fp
Netrin1L/L
d
Netrin-1
E11
Netrin1-/-
e
Netrin-1ex3
E11
Netrin-1 Δ/Δ
f
Netrin-1ex3
E11
VZ
Shh:Cre; Netrin1L/L
g
Wild type
h
Netrin-1-/-
i
Netrin-1Δ/Δ
j
Shh:Cre;Netrin-1L/L
Robo3
Dcc
Dcc
E11

Figure S2

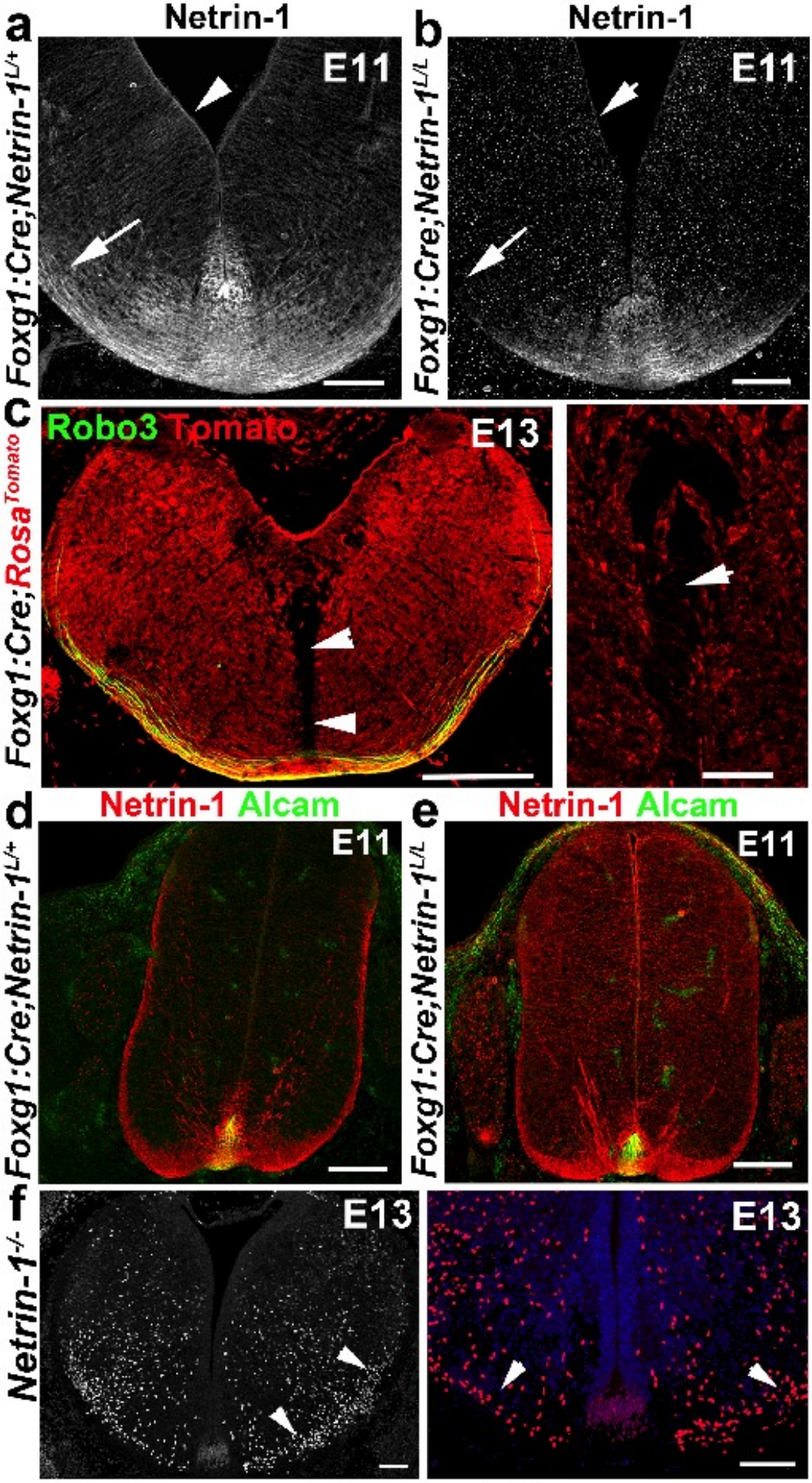

a
Netrin-1
E11
Foxg1:Cre;Netrin-1L/+
b
Netrin-1
E11
Foxg1:Cre;Netrin-1L/L
c
Robo3 Tomato
E13
Foxg1:Cre;RosaTomato
d
Netrin-1 Alcam
E11
Foxg1:Cre;Netrin-1L/+
e
Netrin-1 Alcam
E11
Foxg1:Cre;Netrin-1L/L
f
E13
E13
Netrin-1-/-

Figure S3

Discussion

Au cours ma thèse j'ai étudié l'effet d'une délétion ciblée dans le temps et dans l'espace des molécules de guidage Nétrine-1, Slit1-3 et Robo1-2. J'ai récapitulé l'ensemble des résultats obtenus au couts des précédentes analyses phénotypiques des KO conventionnels (Figure30) (Bloch-Gallego et al., 1999; Geisen et al., 2008; Jaworski et al., 2010; Long et al., 2004; Marcos et al., 2009; Di Meglio et al., 2008; Serafini et al., 1996; Yee et al., 1999).

1 L'attraction à la ligne médiane

1.1 Quels sont les signaux attirant les axones commissuraux ?

Les expériences de *turning assay* menées lors de l'étude du mutant hypomorphe de la *Nétrine-1* ont montré que la Netrine-1 n'était pas responsable à elle seule de l'attraction des axones commissuraux à la plaque du plancher (Serafini et al., 1996). En effet, les plaques du plancher issues des *Nétrine-1* KO sont toujours capables d'induire un changement de direction des axones commissuraux (Charron et al., 2003; Serafini et al., 1996). De plus, chez le mutant hypomorphe et le mutant complet *Nétrine-1*$^{\Delta/\Delta}$ certains axones sont toujours capables de croiser la ligne médiane. L'ensemble de ces observations sont en faveur de l'existence d'autres molécules de guidage impliquées dans l'attraction des axones commissuraux à la plaque du plancher.

1.1.1 Shh, un attractant complémentaire de la Nétrine-1 ?

Le morphogène Sonic Hedgehog (Shh) est exprimé à la plaque du plancher et diffuse sous forme de gradient (Jessell, 2000b). En plus de son rôle de régionalisation du système nerveux central, Shh exerce une action attractive sur les axones en croissance (Charron et al., 2003). L'action de Shh dans le guidage axonal s'exerce par le récepteur Boc exprimé dans les axones commissuraux lors de leur croissance vers la ligne médiane (Okada et al., 2006). Pour induire une transformation morphogénique Shh exerce une action sur la transcription par l'intermédiaire du récepteur Smoothened (Smo) qui active les facteurs de transcription Gli (voir Dessaud et al. 2008 pour revue). Pendant le guidage axonal, Shh agit toujours par

Système	Gène	Défauts chez les KO	Défauts chez les conditionnelles
moelle épinière	*Nétrine-1*	- Retard de la croissance axonal - Axones perdus	***Shhcre*** (plaque du plancher): Pas de défaut
	Slit1-3	Axones bloqués dans la ligne médiane	***Shhcre*** : axones incapables de sortir de la ligne médiane
	Robo1 *Robo2*	Axones bloqués dans la plaque du plancher (phénotype moins important que *Slit1-3 KO)*	
Olive inférieure	*Nétrine-1*	- Complexe atrophié et neurones ectopiques - Projections presque exclusivement ipsilatérales	***Shhcre*** : Pas de défaut
			Foxg1cre (zone ventriculaire): -Complexe atrophié et neurones ectopiques. - Projections: non étudiées
	Slit1-3	- Neurones olivaires franchissent la ligne médiane - Morphologie de l'olive altérée - Projections ipsi et contralatérales	***Shhcre*** : - Neurones olivaires franchissent la ligne médiane - Morphologie de l'olive altérée - Projections ipsi et contralatérales
	Robo1 *Robo2*	- Neurones olivaires franchissent la ligne médiane - Morphologie de l'olive altérée - Projections ipsi et contralatérales	***Ptf1acre*** (neurone olivaire): Pas de défaut
Pont	*Nétrine-1*	Les neurones quittent prématurément les lèvres rhombiques	***Shhcre*** : Pas de phénotype
			Foxg1cre : Les neurones quittent prématurément les lèvres rhombiques
	Slit1-3	Migration prématurée vers la ligne médiane d'une majorité de neurones	***Shhcre*** : Pas de phénotype ***Phox2bcre*** : Pas de phénotype ***Shhcre Phox2bcre*:** migration prématurée vers la ligne médiane d'une minorité de neurones
	Robo1 *Robo2*	Migration prématurée vers la ligne médiane d'une majorité de neurones	***Wnt1cre*** (neurones pontiques) : Pas de phénotype

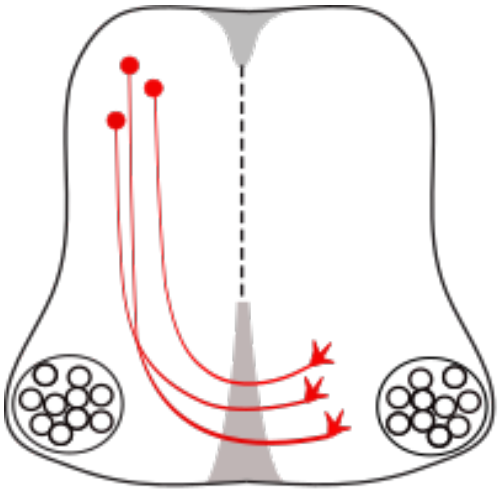
Figure 30 : Tableau récapitulatif des phénotypes obtenus chez les KO conditionelles

l'intermédiaire de Smo mais en agissant cette fois sur le cytosquelette du cône de croissance par l'intermédiare des kinases Src (Yam et al., 2009). *In vitro*, une source de Shh est capable de réorienter les axones commissuraux de la moelle épinière mais n'est pas capable de promouvoir leur croissance (Charron et al., 2003). La délétion conditionnelle de Smo, un médiateur de la voix de signalisation de Shh, induit une défasciculation des axones qui envahissent la moelle épinière ventrale ainsi que des projections ectopiques dans la colonne motrice (Charron et al., 2003). Cependant, une grande partie des axones est toujours capable d'atteindre la plaque du plancher et de la traverser (Figure31). Ce même phénotype est observé chez les mutants de *Boc* (Okada et al., 2006). Rappelons que chez l'hypomorphe de *Nétrine-1* deux défauts majeurs sont observés : les axones commissuraux présentent des défauts de guidage et des retards de croissance. Chez les mutants conditionnels *Smo*, la première phase de croissance vers la partie ventrale de la moelle épinière n'est pas affectée. Les axones sont capables de croître normalement vers la moelle épinière ventrale. Le phénotype observé chez les mutants conditionnels *Smo* est très différent de celui observé chez les mutants *Nétrine-1,* une majeur partie des axones sont toujours capables d'atteindre le plaque du plancher et de la traverser (Figure 31).

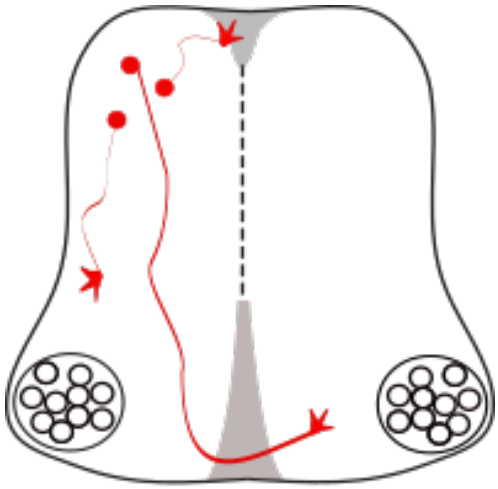
Aucune étude n'a été menée sur les doubles mutants conditionnels S*mo/Nétrine-1* ou *boc/Nétrine-1*. *In vitro*, l'inhibition conjointe de Nétrine-1 et Shh ne suffit pas à annuler complétement l'action attractive de la plaque du plancher sur les axones commissuraux. Cette attraction pourrait être dûe au caractère hypomorphe du mutant *Nétrine-1,* ou bien, cela suggère l'implication d'au moins une autre molécule attractive (Charron et al., 2003; Sloan et al., 2015). En outre, hormis au niveau du chiasma optique (Fabre et al., 2010) on ne sait pas si Shh est capable d'attirer tous les axones commissuraux, notamment dans le système précérébelleux.

1.1.2 Le Vegf à la plaque du plancher

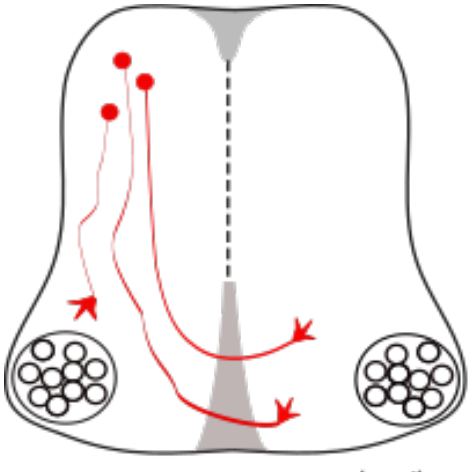
Le VEGF (facteur de croissance vasculaire endothélial), par l'intermédiaire de son récepteur Flk1 contrôle la migration des grains du cervelet (Ruiz de Almodovar et al., 2010). VEGF est aussi exprimé par la plaque du plancher et son récepteur Flk1 par les axones commissuraux (Ruiz de Almodovar et al., 2011). La délétion spécifique



Contrôle

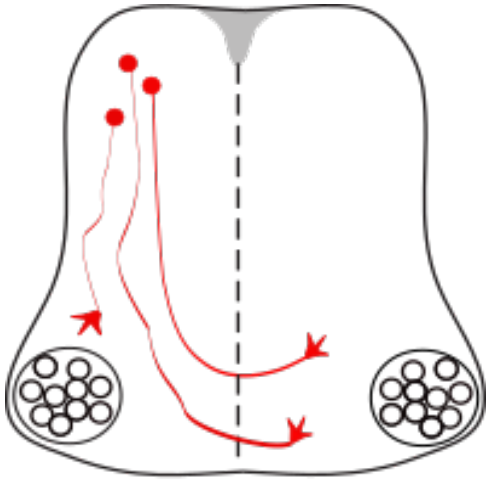


Nétrine-1$^{-/-}$



Wnt1:cre+ ; Smo$^{lox/lox}$

Hoxa1:cre+ ; Vegf $^{lox/lox}$



Gli2$^{-/-}$

Figure 31 : Commissures cérébrales en absence de molécules de guidage à la plaque du plancher.

Schémas de coupes coronales de moelle épinière d'embryon de souris. Chez les mutants *Nétrine-1* KO, une majorité des axones commissuraux (rouge) ne parviennent pas à atteindre la plaque du plancher et présentent de gros défauts de guidage. La délétion conditionnelle de Smo (un médiateur de la voie de signalisation de Shh) dans les axones commissuraux (*Wnt1cre Smo$^{lox/lox}$*) et de VEGF dans la plaque du plancher (*Hoxa1cre+ ; Vegf $^{lox/lox}$* **)** induit une defasciculation des axones qui envahissent la moelle épinière ventrale. Chez les mutants *Gli2* KO où la plaque du plancher est absente, un phénotype similaire est observé.

du gène codant pour *VEGF* de la plaque du plancher par la lignée *Hoxa1:cre* entraîne des défauts de fasciculation des axones commissuraux similaires au mutant conditionnel *Smo* mais encore une fois, bien loin des défauts observés chez le KO *Nétrine-1* (Ruiz de Almodovar et al., 2011) (Figure 31). A noter, comme Shh, VEGF contrôle aussi le croisement de la ligne médiane au niveau du chiasma optique (Erskine et al., 2011), mais on ne sait pas s'il agit sur d'autres populations d'axons commissuraux.

1.1.3 Quel est le rôle de la plaque du plancher ?

Chez le mutant *Gli2*, la plaque du plancher et totalement absente et par conséquent, toutes les molécules de guidage qui y sont normalement exprimées. Cependant, chez cette souris, une majeure partie des axones commissuraux traversent toujours la ligne médiane (Matise et al., 1999) (Figure 31). Toutefois, il existe un léger défaut de fasciculation similaire à celui observé chez les mutants conditionnels *Vegf* et *Smo* (Charron et al., 2003; Ruiz de Almodovar et al., 2011). Il est important de préciser que chez ce mutant, la Nétrine-1 exprimée dans la zone ventriculaire est toujours présente. En accord avec nos résultats montrant que la Nétrine-1 exprimée à la plaque du plancher n'est pas responsable de l'attraction des axones commissuraux il a été suggéré que la Netrine-1 de la zone ventriculaire jouait un rôle important dans le guidage axonal. Il est utile de souligner que même en absence totale de plaque du plancher, les axones commissuraux restent attirés vers la ligne médiane ventrale. Le rôle exact que joue la plaque du plancher dans le guidage des axones commissuraux reste donc à établir. De plus, l'analyse des mutants Robo3 KO a montré que les axones qui ne sont plus capables de croiser la ligne médiane se projettent sur les bonnes cibles mais du côté ipsilatéral (Michalski et al., 2013; Renier et al., 2010). Il semble donc que la traversée de la ligne médiane ne soit pas non plus nécessaire à la continuation du programme de guidage.

1.1.4 Un trajet aléatoire des axones ?

Une autre hypothèse afin d'expliquer la présence de commissures chez le mutant *Nétrine-1* hypomorphe était qu'une quantité suffisante de Nétrine-1 était toujours présente due au vecteur de « *gene-trap* » utilisée pour générer ce mutant (voir

introduction). En effet, nous avons constaté que la Netrine-1 est toujours détectable en hybridation *in situ*. De plus, il est probable qu'une faible quantité de Nétrine-1 soit toujours fonctionnelle et accessible aux axones en développement. Cependant chez le mutant complet *Nétrine1* $^{\Delta/\Delta}$, généré par recombinaison homologue, certains axones, en moindre quantité que chez le mutant hypomorphe, sont toujours capables de traverser la ligne médiane. Chez ce mutant aucune trace de Nétrine-1 résiduelle n'est détectable, ni en hybridation *in situ* ni en immunocytochimie. Par conséquent, ce n'est pas la Nétrine-1 qui guide ces axones résiduels. La présence d'autres molécules de guidage comme vu précédemment pourrait contribuer à cette attraction d'une minorité d'axones. Chez le mutant total, nous avons observé que les axones empruntaient des trajectoires aléatoires : une partie des axones traverse la ligne médiane dorsale, une autre partie quitte le cerveau par les points de sortie des axones sensoriels et moteurs, d'autres restent bloqués dans la moelle épinière et une dernière partie croise la ligne médiane ventrale (Figure 32). Il se pourrait donc que cette diversité de trajectoire d'axones en l'absence de nétrine-1 reflète simplement un trajet aléatoire des axones commissuraux.

1.2 Rôle de la Nétrine-1 au cours du développement

1.2.1 Rôle de la Nétrine-1 à la plaque du plancher

La souris *Shhcre ;Netrine*$^{lox/lox}$ ne présente pas de défauts notables de guidage des axones commissuraux dans la moelle épinière et le tronc cérébral. L'ensemble des commissures semblent intactes d'après les immunomarquages effectués avec différents marqueurs des commissures cérébrales ainsi que les traçages rétrogrades effectués dans le cervelet et la moelle épinière. La nétrine-1 produite à la plaque du plancher ne serait donc pas responsable de l'attraction des axones commissuraux vers la ligne médiane. Quel est alors son rôle ? Une étude récente a montré que la Sémaphorine 3B exprimée dans la plaque du plancher serait sécrétée dans le liquide céphalo-rachidien et contrôlerait ainsi l'orientation des fuseaux de divisions des progéniteurs dans la zone ventriculaire de la moelle épinière (Arbeille et al., 2015). Les corps cellulaires des progéniteurs sont positionnées adjacent à la zone

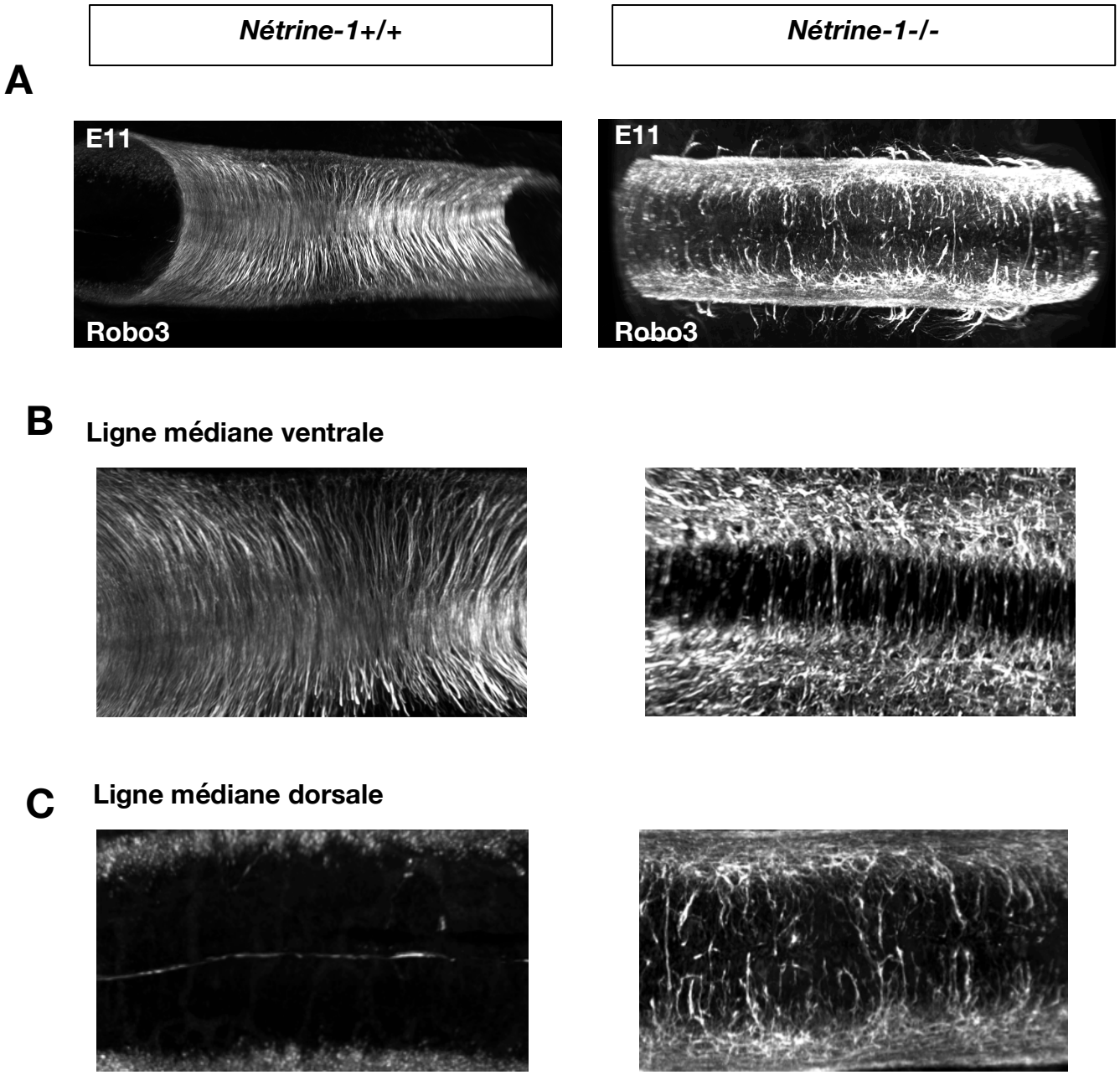


Figure 32 : Visualisation 3D des commissures cérébrales chez les mutants *Nétrine-1-/-*
Marquage Robo3 d'une moelle épinière d'embryon de souris E11, vue dorsale (A), zoom sur la ligne médiane ventrale (B), zoom sur la ligne médiane dorsale (C). Chez les mutants *Nétrine-1-/-* certains axones commissuraux sortent du SNC (flèche) au niveau des points de sortie et d'entrée des axones moteurs et sensoriels, d'autres parviennent à atteindre et croiser la ligne médiane ventrale (ligne pointillé). Pour finir, une autre partie croise la ligne médiane dorsale (ligne de traits discontinus).

ventriculaire et sont en contacte avec le liquide céphalorachidien. Nous avons pu voir par immunotransfert que la Nétrine-1 était présente dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Il se pourrait donc que la plaque du plancher sécrète de la Nétrine-1 dans le liquide céphalo-rachidien et qu'elle agisse sur la différentiation des cellules de la zone ventriculaire ou leur migration radiaire. Le LCR est produit par les plexus choroïdes (Davson, 1976) et nous avons pu voir que la Nétrine-1 était exprimée dans ces structures au cours du développement. Une lignée de souris conditionnelle permettant de supprimer l'expression de Nétrine-1 dans les plexus choroïdes nous permettrait de vérifier cette hypothèse et d'en connaître le rôle. Shh est exprimée dans la plaque du plancher et dans les plexus choroïdes au cours du développement (Huang et al., 2009; Nielsen and Dymecki, 2010). La lignée *Shh::cre Nétrine-1^{lox}* serait donc intéressante pour tenter d'approfondir nos connaissances quant au rôle de la Nétrine-1 dans le liquide céphalo-rachidien.

1.2.2 La Nétrine-1 dans la glie radiaire et la lame basale

1.2.2.1 Expression de la Nétrine1 dans les précurseurs de la glie radiaire

Par immunocytochimie, nous avons mis en évidence deux zones d'expression de Nétrine-1 jusqu'alors inconnues ou négligées : la glie radiaire et la lame basale (Figure 33). La glie radiaire joue un rôle important dans la mise en place du système nerveux central. Elle présente une morphologie radiaire avec de long prolongements s'étendant de la zone ventriculaire jusqu'à la lame basale (Figure 10) (Barry and McDermott, 2005; Misson et al., 1988; Rakic, 1972).

Dans les mutants *Foxg1:cre;Netrin1lox,* chez lesquels la Nétrine-1 est absente de la zone ventriculaire dans le tronc cérébral, aucun marquage positif pour la Nétrine-1 n'a été détecté dans la glie radiaire ni dans la lame basale. Inversement, lorsque la Nétrine-1 est spécifiquement supprimée de la plaque du plancher, la Nétrine-1 est toujours présente dans la glie radiaire. Il est donc probable que la Nétrine-1 soit exprimée dans les progéniteurs de la glie radiaire dans la zone ventriculaire et transportée jusqu'à la lame basale. Il est difficile de savoir si la Nétrine-1 présente dans la glie radiaire est sécrétée à la surface piale ou bloquée dans cytoplasme. Cependant, d'après nos observations, il semblerait que la Nétrine-1 soit sécrétée

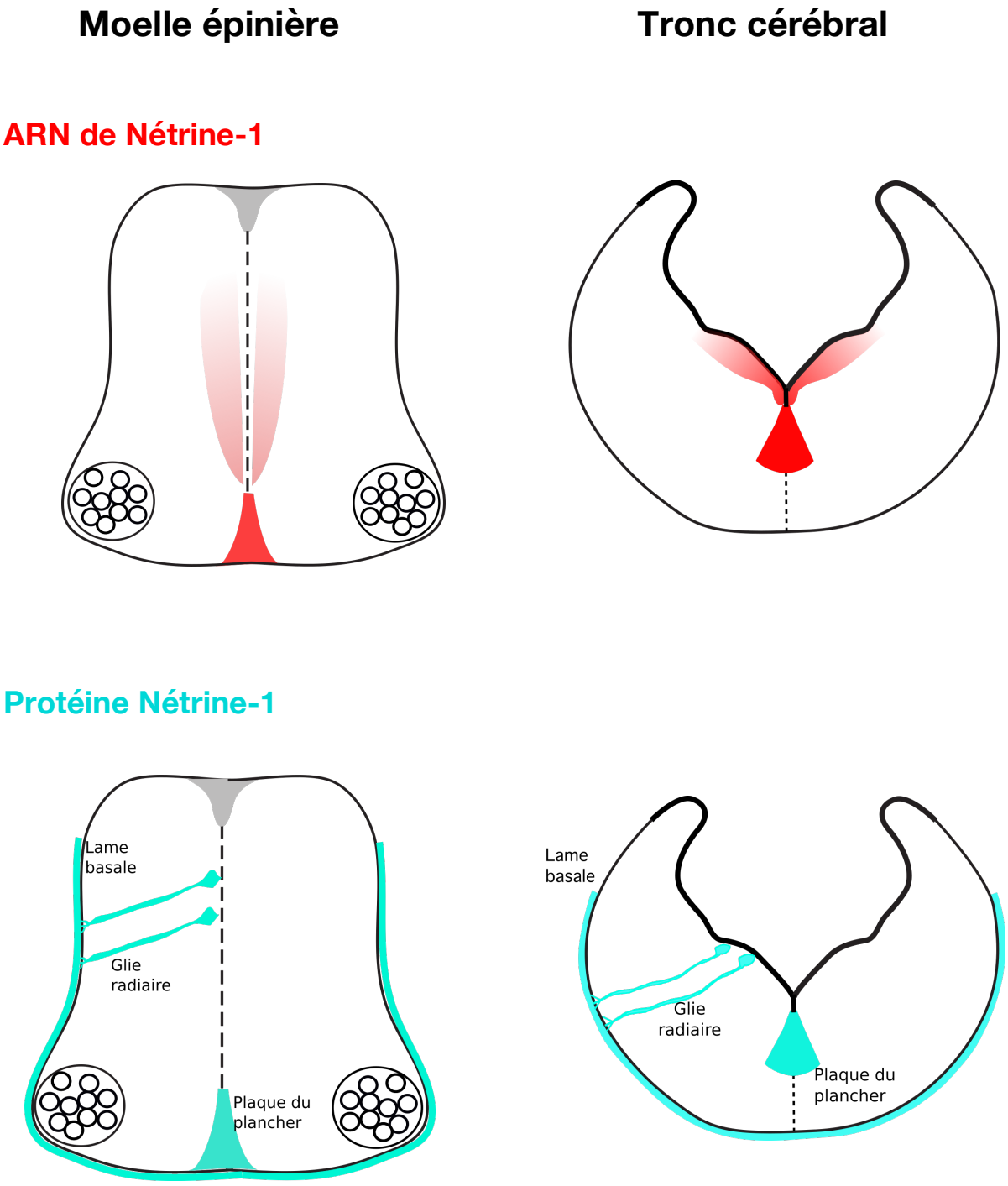


Figure 33 : Expression et localisation de Nétrine-1 dans la moelle épinière et le tronc cérébral
Schémas de coupe coronale de moelle épinière et de tronc cérébral d'embryon de souris. L'ARN est exprimée (en rouge) dans la plaque du plancher et la zone ventriculaire du tronc cérébrale et de la moelle épinière. En revanche, la protéine (en bleu) est située dans la glie radiaire, la lame basale et la plaque du plancher.

une fois sortie de la zone ventriculaire dans le tronc cérébral. En d'autres termes, la glie radiaire pourrait permettre de transporter la Nétrine-1 en dehors de la zone ventriculaire. Elle serait ensuite sécrétée dans la matrice extracellulaire et la lame basale et agirait sur le guidage des axones commissuraux.

Il a été montré que la glie radiaire jouait un rôle structurant dans la moelle épinière et permettait de compartimenter les axones en développement (Barry et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs montrent que la glie radiaire entoure le funiculus dorsal lorsqu'il se développe dans la moelle épinière et qu'elle formerait un couloir permissif à travers lequel les axones seraient temporairement dirigés. Un mécanisme similaire a été décrit au cours du développement du nerf optique (Silver and Rutishauser, 1984) et du corps calleux (Silver et al., 1982). Dans l'hypothèse où la Nétrine-1 serait secrétée par la glie radiaire, elle pourrait participer à l'organisation des axones dans ce couloir permissif. Les axones seraient ainsi dirigés ventralement jusqu'à la plaque du plancher.

Il ne nous a pas été possible d'enlever spécifiquement la Nétrine-1 dans la zone ventriculaire de la moelle épinière. Toutefois, nous pouvons supposer qu'un mécanisme commun contrôlerait la mise en place des commissures cérébrales dans la moelle épinière et le tronc cérébral. Nous avons toutefois montré que les axones commissuraux poussaient normalement en l'absence de Nétrine-1 à la plaque du plancher.

1.2.2.2 Rôle de la Nétrine-1 dans la lame basale

La lame basale établit la frontière entre le système nerveux central et périphérique. Tout comme la matrice extracellulaire, elle est composée, entre autres, de laminines, collagène IV et d'heparan sulfate protéoglycanes et est en contact avec les pieds de la glie radiaire au cours du développement (Halfter et al., 2002; Rakic, 1972; Sievers et al., 1994). Chez les mutants *Nétrine-1*, les axones Robo3 positifs sortent du système nerveux central par les points d'entrée des projections sensorielles et de sortie des axones moteurs. Il se pourrait donc que la Nétrine-1 de la lame basale participe au confinement des axones dans le système nerveux central.

Dans la moelle épinière, des trous dans la jonction entre la lame basale et la glie radiaire induisent un rétrécissement et une déviation de certaines fibres de la glie

radiaire mais aucun défaut dans la prolifération ou la survie des progéniteurs n'est observé (Zhu et al., 2015). Ce phénotype s'accompagne d'un mauvais positionnement des cellules de capsules frontalières normalement situées aux points d'entrée et de sortie des projections sensorielles et motrices et qui participe au confinement des neurones moteurs au système nerveux central (Altman and Bayer, 1984; Golding and Cohen, 1997; Niederländer and Lumsden, 1996) (Figure 10). Le maintien de la glie radiaire attachée à la lame basale lors du développement permet donc de conserver les frontières entre le système nerveux central et périphérique.

La Nétrine-1 présente dans la lame basale pourrait donc contribuer à l'adhérence des fibres de la glie radiaire à cette dernière. L'absence de Nétrine-1 à la lame basale pourrait perturber la mise en place de la frontière entre le système nerveux central et périphérique, notamment via un mauvais positionnement des cellules de capsules frontalières.

Cependant, nous n'avons pas observé de défaut majeur dans la mise en place de la glie radiaire, notamment pas un immunomarquage du collagène IV. Même si des expériences plus approfondies sont nécessaires pour tester cette hypothèse, celle-ci reste peu probable.

La présence des cellules de capsules frontalières chez les mutants *Nétrine-1* n'a pas encore été vérifiée. En outre l'organisation des commissures cérébrales chez les embryons présentant un défaut de positionnement des cellules de capsules frontalières ou un défaut de structure de la lame basale et la glie radiaire n'a malheureusement pas été étudiée.

Il est donc difficile de savoir si une perturbation ou l'absence de cellules de capsules frontalières induirait une sortie des axones du système nerveux central. De plus, en absence de cellules de capsules frontalières, les motoneurones sortent du système nerveux central (Vermeren et al., 2003), un tel phénotype n'est pas observé chez les mutants *Nétrine-1* (Kim et al., 2015).

Une autre hypothèse intéressante, serait que la Nétrine-1 présente dans la lame basale exerce une action répulsive sur les axones commissuraux et les empêcherait ainsi de sortir de la moelle épinière. La Nétrine-1 peut induire un signal répulsif par l'intermédiaire de son récepteur Unc5 (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995).

Cependant, Unc5 n'est pas exprimé dans les axones commissuraux (Engelkamp, 2002), de plus, chez les mutants *Unc5* aucun axone commissural ne sort du système nerveux central (Laumonnerie et al., 2014). En revanche, chez les mutants *DCC*, les axones commissuraux quittent le système nerveux central ce qui suggère que le confinement des axones commissuraux à la moelle épinière et au tronc cérébral repose sur l'interaction Nétrine-1/DCC (Laumonnerie et al., 2014). Néanmoins, ce couple ligand récepteur n'est pas connu pour ses capacités à générer un signal répulsif. Une possibilité serait que DCC agisse via un autre ligand que la Nétrine-1 ou via des molécules modulant sa réponse à la Nétrine-1. La Draxin et la laminine1 seraient des candidats potentiels. La Draxin est une molécule qui a une activité répulsive des neurones par l'intermédiaire de DCC (Ahmed et al., 2011). *In vitro,* la laminine-1 transforme la réponse de DCC à la Nétrine-1 de répulsif à attractif pour les axones rétiniens (Höpker et al., 1999).

1.2.3 Quel est le mode d'action de la Nétrine-1 ?

Actuellement, la Nétrine-1 est considérée comme une protéine diffusible, agissant à longue distance par chimiotropisme afin d'attirer les axones à la plaque du plancher (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1996). Nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence de gradient de Nétrine-1 dans la moelle épinière ni dans le tronc, remettant ainsi en cause ce mode d'action de la Nétrine-1 à longue distance. La Nétrine-1 est une molécule de la famille des laminines de la matrice extracellulaire (Serafini et al., 1996). Il est donc fort probable qu'elle puisse être attachée à la matrice extracellulaire et agir à courte distance. Chez la drosophile il a été montré que la Nétrine peut agir à courte distance dans la guidage des axones commissuraux (Brankatschk and Dickson, 2006). Il existe deux homologues de Nétrine-1 chez la drosophile : Net-A et Net-B. En utilisant une forme membranaire de la NetB dans un fond génétique mutant pour *Net-A* et *Net-B*, il a été montré que la Nétrine immobilisée était capable de restaurer le franchissement de la ligne médiane par les axones commissuraux (Brankatschk and Dickson, 2006). Chez la souris, une étude a montré *in vitro* que lorsque la Nétrine-1 était immobilisée sur des billes, elle pouvait faire tourner le cône de croissance de façon purement mécanique en exerçant une force de traction par l'intermédiaire de DCC (Moore et al., 2009). *In vivo*, la Nétrine-1 agit à courte distance dans de nombreux systèmes. Dans le

système visuel, elle est exprimée autour du nerf optique et agit directement sur les axones des cellules ganglionnaires rétiniennes afin de les faire sortir de la rétine et ainsi former le nerf optique (Deiner et al., 1997). Dans la glande mammaire et le pancréas, Nétrine-1 régule la morphogénèse de l'épithélium en influençant l'adhérence cellulaire (Srinivasan et al., 2003; Yebra et al., 2003). Dans l'épithélium des glandes mammaires en développement, Nétrine-1 et son récepteur Néogénine induisent une interaction adhésive entre les couches cellulaires (Srinivasan et al., 2003). Dans le pancréas, la liaison des intégrines α6β4 et α3β1 avec la partie C-terminale de la Nétrine-1 régule l'adhérence et la migration des cellules pancréatiques embryonnaires (Yebra et al., 2003). Dans la moelle épinière, il a été montré qu'une interaction adhésive s'effectuait entre Nétrine-1 attachée à la matrice extracellulaire et son récepteur DCC qui agirait comme un pont transmembranaire liant la Nétrine-1 au cytosquelette induisant la formation des filopodes et l'extension de la membrane (Shekarabi et al., 2005).

Afin de mieux comprendre le rôle de la Nétrine-1 et son action à longue ou courte portée, il serait intéressant de supprimer l'expression de la Nétrine-1 dans des populations distinctes de la zone ventriculaire. Dans la lignée *Gbx2::cre*, la CRE recombinase est exprimée dans la partie la plus dorsale de la moelle épinière. La lignée *Gbx2::cre Nétrine1*^{lox} nous permettrait donc de déterminer si la délétion de la Nétrine-1 dans la partie la plus dorsale de la moelle épinière induit un défaut de guidage des axones commissuraux et si la molécule agit localement, à courte portée.

2 La répulsion à la ligne médiane

Dans le modèle actuel il est proposé que la Nétrine-produite par la plaque du plancher attire les axones commissuraux par chimiotropisme via son récepteur DCC. Afin de sortir de la ligné médiane, les axones sont repoussés par Slit/Robo les chassant de cette cible intermédiaire.

Bien que la délétion spécifique des molécules Slit1-3 dans la plaque du plancher confirme leur rôle dans le guidage des axones commissuraux de la moelle épinière,

il en est tout autrement pour la migration des neurones précérébelleux. En effet, chez les mutants conditionnels, la délétion spécifique des Slits à la plaque du plancher et Robo1/2 dans les neurones précérébelleux ne reproduit pas les phénotypes observés dans la migration des neurones de l'olive inférieur et des neurones du pont chez les KO classiques (voir tableau récapitulatif).

Compte-tenu de nos résultats, Slit/Robo semblent donc jouer un rôle différent dans chaque système. Dans la moelle épinière, Slit/Robo permettrait, comme montré préalablement, de repousser les axones commissuraux de la plaque du plancher.

Dans l'olive inférieure, la délétion spécifique de Slit dans la plaque du plancher nous a permis de confirmer son rôle dans le guidage des neurones olivaires. Dans ce système, l'action répulsive de Slit se ferait par l'intermédiaire d'un autre récepteur qui reste à identifier.

Pour finir, l'absence de phénotype lorsque Slit1-3 et Robo1-2 sont spécifiquement délétés du pont suggère que le couple Slit/Robo n'est pas impliqué dans la migration de ces neurones précérébélleux. Plusieurs questions se posent alors : quels sont les récepteurs des Slits ? Quelles autres molécules de guidage pourraient guider les neurones précérébelleux ? A quoi sont dûs les défauts de guidage observés chez les KO ?

2.1 Robo1 et Robo2 sont-ils les seuls récepteurs des Slits ?

Dans la moelle épinière des mutants *Slit1-3 KO* les axones commissuraux sont désorganisés à la plaque du plancher. Certains axones semblent bloqués à la ligne médiane, incapables de la quitter. La différence de phénotype entre les mutants *Slit1-3* et *Robo1-2* suggère l'existence de récepteurs additionnels pour les molécules Slit (Jaworski et al., 2010; Long et al., 2004). En effet, le phénotype observé chez les embryons déficients pour les gènes *Slit* est plus fort que celui observé chez les *Robo1/2* KO : les injections de DiI dans la moelle épinière montrent que 45% des axones restent bloqués à la plaque du plancher chez les double KO *Robo1/Robo2* contre 73% pour les *Slit1-3* (Jaworski et al., 2010; Long et al., 2004).

Dans l'olive inférieure, la délétion spécifique des Slits à la plaque du plancher reproduit le même phénotype observé que chez le triple mutant : la morphologie du

complexe olivaire est affectée et une fraction significative de neurones olivaires franchit la ligne médiane et migre du côté controlatéral formant des connections bilatérales (Di Meglio et al., 2008).
Lorsque Robo-1 et -2 sont spécifiquement supprimés des neurones olivaires, aucun défaut de migration ni de projections des axones olivaires n'est observé. De plus, les immunomarquage de Robo1 et Robo2 n'ont montré aucune présence de ces deux molécules de guidage dans ce système. Ce résultat suggère donc lui aussi l'existence d'autres récepteurs aux Slit1-3.

Récemment, PlexineA1 a été identifié comme récepteur de Slit2, ou plus précisément du fragment C terminal de Slit2 (Delloye-Bourgeois et al., 2014). PlexineA1 est un co-récepteur de Sémaphorine 3B (Sem3B) dont l'interaction génère un signal répulsif (Charoy et al., 2012; Nawabi et al., 2010).
Chez les KO *PlexineA1* et *Robo1-2KO,* des injections de DiI dans la moelle épinière ont montré que près de la moitié des axones restent bloqués à la plaque du plancher (Delloye-Bourgeois et al., 2014). Chez les triples mutants *Robo1/Robo2 /PlexineA1 KO*, le pourcentage d'axones bloqués à la ligne médiane s'élève à 72%, comme chez les triples mutants *Slit1-3* (Delloye-Bourgeois et al., 2014). L'étude des phénotypes des triple KO *Robo1/Robo2/PlexineA1* KO ainsi que les expériences d'immunoprécipitation et de *binding* ont montré que PlexineA1 était un récepteur du fragment C-terminal de Slit2 intervenant dans le guidage des axones commissuraux dans la moelle épinière.
L'interaction de Slit/PlexineA1 existe-elle en dehors de la moelle épinière ? Le guidage axonal et la migration cellulaire dans le tronc cérébral n'ont pas été étudiés chez les mutants *PlexineA1*. Il est donc envisageable que Slit/PlexineA1 interviennent dans le guidage des neurones précérébelleux par les signaux répulsifs qu'ils émettent. Toutefois, aucune étude n'a pu montrer l'expression de PlexineA1 dans les noyaux précérébelleux.
Les Slits se lient à l'ensemble des récepteurs Plexine A *in vitro*, il est donc probable qu'il en soit de même *in vivo* (Delloye-Bourgeois et al., 2014). Il a été montré que les récepteurs PlexineA4 et PlexineA2 étaient exprimés dans les neurones du pont et les neurones olivaires à P4 (Runker et al., 2008) et seraient donc des récepteurs

potentiel aux molécules Slit. Les protéines Slit ne se liant pas à la Plexine B1, il est probable que l'association Slit/Plexine ne s'applique à l'ensemble des Plexines. Toutefois, Plexine D1 est exprimée dans l'olive inférieure et le pont lors du développement (Vilz et al., 2005) et pourrait donc être elle aussi un récepteur des Slits.

Eva1C est une protéine transmembranaire, qui chez *C.elegans* est un récepteur de Slit. Eva1C est nécessaire au guidage ventral des axones comme Sax3, l'orthologue de Robo (Fujisawa et al., 2007). Non seulement Eva1C et Slt-1/Sax3 sont colocalisés, mais ils sont aussi sont capables de se lier. L'homologue murin du récepteur Eva1C est exprimé dans les axones et neurones moteurs, les axones sensitifs et dans une partie des axones commissuraux (James et al., 2013). Eva1C est aussi présent dans le système olfactif et le système visuel en développement ainsi que dans les axones du cortex, de l'hippocampe et du thalamus (James et al., 2013). L'ensemble de ces résultats montre que le récepteur Eva1C est exprimé dans des régions du système nerveux au niveau desquelles les Slits jouent un rôle dans le guidage axonal. Malheureusement, la présence de Eva1C dans les axones ou les neurones en migration du tronc cérébral n'a pas été analysée dans cet article. L'étude de souris déficientes pour *Eva1C* permettrait de montrer de façon plus approfondie son rôle dans la mise en place du système nerveux central.

2.1.1 Guidage des neurones du pont

Les délétions spécifiques de *Slit1-3* dans la plaque du plancher et de leurs récepteurs *Robo1-2* dans les neurones du pont n'ont montré aucun défaut dans le pont. De plus, tout comme dans le système olivaire, Robo1/2 sont absents des neurones du pont. Quelles sont les molécules impliquées dans le guidage de la migration des neurones du pont ?

Il a été montré que des molécules de guidage sécrétées par les méninges sont impliquées dans la migration tangentielle des cellules de Cajal-Retzius dans le cortex (Borrell and Marín, 2006). La chimiokine Cxcl12 stimule la migration des cellules de Cajal-Retzius qui expriment le récepteur Cxcr4 (Borrell and Marín, 2006). Le récepteur Cxcr4 contrôle de manière cellulaire autonome la migration des neurones pontins (Vilz et al., 2005; Zhu et al., 2009). Chez les embryons déficients

pour *Cxcr4,* les neurones migrent de façon ectopique, le long de la plaque du plancher, comme chez les mutants *Slit1/2* et *Robo1/2*. Les deux phénotypes sont toutefois légèrement différents car l'asymétrie des neurones ectopiques est plus importante chez les souris KO *Cxcr4.* Le défaut observé chez les mutants *Cxcr4* est identique à celui des souris *Wnt1cre ;Cxcr4*$^{lox/lox}$ chez lesquels Cxcr4 est supprimé dans les neurones pontins (Heike Blockus et Alain Chédotal, données non publiées). Les souris *Shh :Cre ;Slit1*$^{-/-}$*Slit2*$^{lox/lox}$*Slit3*$^{-/-}$ne présentant pas de phénotype dans le pont, quelle est donc la source de Slit ? Une hypothèse, qui certes reste à vérifier, serait que les Slits sont exprimés dans les méninges et interagiraient avec d'autres récepteur que Robo. Cependant, cela n'expliquerait pas le phénotype des KO *Robo1/Robo2*.

2.1.2 Phénotypes chez les KO : un défaut secondaire ?

Chez les triples KO *Slit1-3* KO et les doubles KO *Robo1/2*, les neurones du pont migrent de façon prématurée vers la plaque du plancher (Geisen et al., 2008). D'après l'étude des mutants conditionnels où les molécules Slit/Robo sont spécifiquement enlevées de la plaque du plancher et des neurones du pont respectivement, le couple Slit/Robo ne semble pas jouer un rôle dans la guidage des neurones pontins. Il est donc fort probable que le phénotype observé chez les KO soit un défaut secondaire.

Le défaut de migration des neurones olivaires et la migration normale des neurones pontins lorsque Slit est spécifiquement déplété de la plaque du plancher suggèrent un rôle différent des Slits dans ces deux systèmes. Cependant, on ne peut exclure que le phénotype olivaire des embryons *Shhcre ;Slit1*$^{-/-}$*Slit2*$^{lox/lox}$*Slit3*$^{-/-}$ soit lui aussi un défaut secondaire. En effet, Slit étant supprimé dans tout l'axe antéro-postérieur, induisant des défauts de guidage des axones commissuraux et des axones longitudinaux, il est probable que la migration des neurones olivaires puisse être altérée. Dans ce cas de figure, on pourrait supposer que Slit/Robo n'est ni impliqué dans la migration des neurones du pont, ni dans celle des neurones olivaires. Slit/Robo joueraient un rôle important dans d'autres systèmes ou d'autres voies de

signalisation dans le système nerveux engendrant ainsi des défauts de migration des neurones précérébelleux.

L'acide rétinoïque est une molécule issue de la Vitamine A et produite dans les méninges (Niederreither et al., 1997; Zhang et al., 2003). L'influence de l'acide rétinoïque sur le développement du système nerveux central a été largement étudiée, notamment dans la formation de l'axe antéro-postérieur du tube neural (Durston et al., 1989; Thaller and Eichele, 1987; Tickle et al., 1982). Il a été montré que la voie de signalisation de l'acide rétinoïque jouait un rôle dans la migration des neurones olivaires et des neurones du pont. Un excès d'acide rétinoïque lors du développement à un mauvais endroit au mauvais moment perturbe fortement la migration de ces neurones (Yamamoto, 2003; Yamamoto et al., 2005). En effet, chez les embryons ayant reçu un traitement à l'acide rétinoïque à des stades précoces du développement (E9,5-10,5) les neurones du pont s'étendent dans tout le tronc cérébral antérieur, (Yamamoto, 2003). L'injection d'acide rétinoïque à ce stade de développement affecte le développement du complexe olivaire : l'olive est plus étendue le long de l'axe antéro-postérieur jusqu'à pratiquement atteindre le noyau pontin et plus resserrée prés de la ligne médiane (Yamamoto et al., 2005). Cette étude montre donc qu'une altération précoce, avant même l'initiation de la migration cellulaire dans le pont et l'olive inférieure, induit des défauts de guidage important. Plus de 500 gènes ont été listés comme étant régulés par l'acide rétinoïque (Balmer and Blomhoff, 2002). Il est donc possible que le couple Slit/Robo soit impliqué dans la voie de signalisation de l'acide rétinoïque lors du développement. Chez le poulet, une étude a montré que Slit/Robo intervenait très tôt pendant la neurulation en agissant sur la prolifération et la différenciation cellulaire (Wang et al., 2013).

3 Conclusions

Dans ce chapitre, je vais tenter de récapituler tous les résultats obtenus dans les trois systèmes étudiés.

3.1 Moelle épinière

Dans la moelle épinière en développement, la Nétrine-1 est exprimée dans la plaque du plancher mais aussi dans la zone ventriculaire. Elle se trouve également le long des prolongements de la glie radiaire et dans la lame basale. Contrairement au modèle classique qui se base sur une fonction attractive de la Nétrine-1 à la plaque du plancher pour les axones commissuraux, je propose une autre hypothèse. La Nétrine-1 de la glie radiaire et de la lame basale, formerait une voie permissive pour les axones commissuraux afin de favoriser leur accès à la moelle épinière ventrale. Elle interviendrait ainsi sur la croissance axonale et le guidage avec une action à courte portée. Une fois la ligne médiane traversée, les Slits prennent le relais et éloignent les axones de la ligne médiane (Figure 34).

3.2 Les noyaux précérébélleux

Que ce soit dans l'olive inférieure ou dans le pont, la Nétrine-1 issue de la plaque du plancher n'intervient pas dans le développement de ces deux structures. C'est la Nétrine-1 sécrétée par la zone ventriculaire qui serait impliquée dans le guidage de la migration des neurones (Figure 35). Par contre dans ce système, c'est la fonction des Slits et des Robos qui est remise en question. En effet, nos résultats montrent que les phénotypes observés chez les *Slit1-3* KO et *Robo1-2* KO sont différents de ceux des mutants conditionnels.

Dans l'olive inférieure, chez les triples KO *Slit1-3* et les doubles KO *Robo1/2,* le complexe olivaire est plus compacté sur la ligne médiane. Par ailleurs, les neurones olivaires traversent la ligne médiane. Ce phénotype de croisement a été retrouvé chez les *Shh :Cre Slit1*$^{-/-}$*Slit2*$^{lox/lox}$*Slit3*$^{-/-}$, mais pas chez le *Ptf1a :Cre ;Robo1*$^{-/-}$

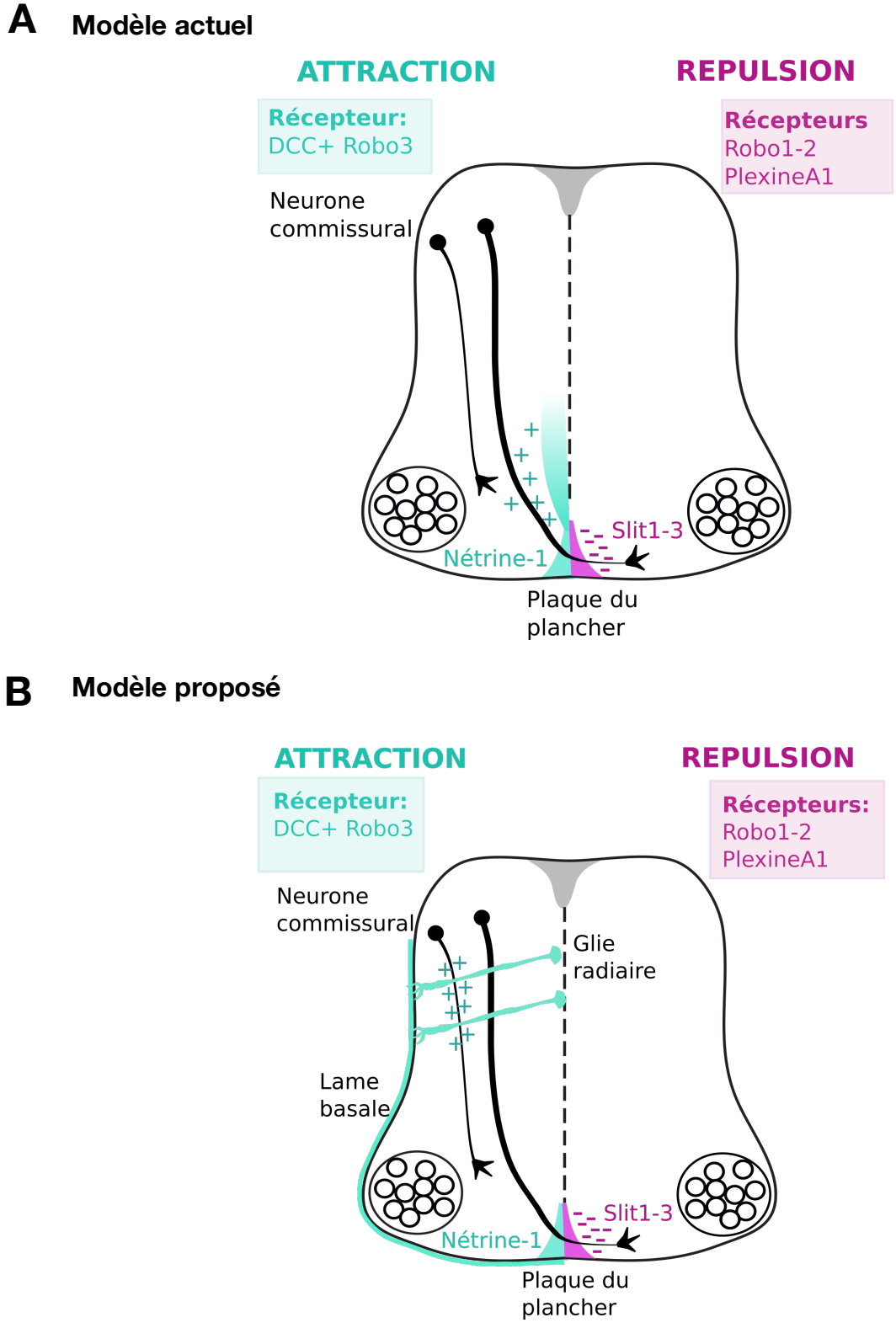
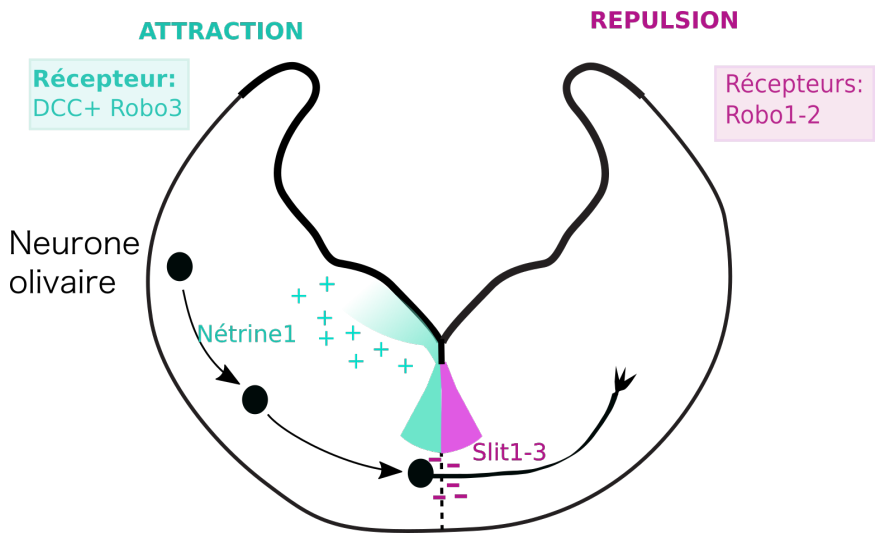


Figure 34 : Attraction et répulsion des axones commissuraux dans la moelle épinière

(A) Dans le modèle actuel, un gradient de Nétrine-1 (bleu) à la plaque du plancher attire les axones commissuraux dans la partie ventrale par l'intermédiaire de DCC et Robo3. Une fois qu'ils ont traversé, ils sont repoussés par les molécules Slit (rose) se liant aux récepteurs Robo1-2 et PlexineA1.

(B) Dans le modèle proposé, la Nétrine-1 de la glie radiaire et la lame basale, formerait une voie permissive pour les axones commissuraux afin de favoriser leur accès à la moelle épinière ventrale. Une fois qu'ils ont traversé, la liaison Slit1-3 avec les récepteurs Robo1-2 et PlexineA1 permettrait de repousser les axones commissuraux.

A Modèle actuel



B Modèle proposé

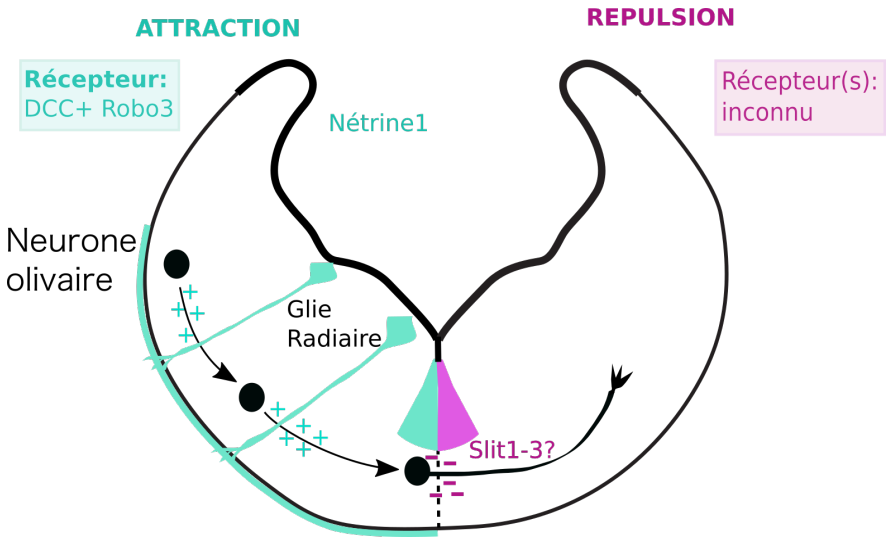


Figure 35 : Guidage des neurones olivaires

(A) Dans le modèle actuel, la Nétrine-1 à la plaque du plancher attire les neurones olivaires par le gradient qu'elle émet. Le couple Slit/Robo, permet d'arrêter les neurones à la plaque du plancher et les empêche ainsi de traverser.

(B) Dans le modèle proposé, comme dans la moelle épinière, la Nétrine-1 de la glie radiaire et la lame basale, formerait une voie permissive pour les axones commissuraux afin de favoriser leur accès à la plaque du plancher. Après avoir atteint cette dernière, Slit1-3 (ou un autre ligand présent à la plaque du plancher) interagit avec un récepteur inconnu afin d'arrêter les neurones olivaires dans leur migration.

Robo2$^{lox/lox}$. Deux hypothèses permettraient d'expliquer ces différences de phénotypes :

1. Les Slits se lieraient à un autre récepteur que Robo et donc le phénotype observé chez le *Robo1-2* KO serait un défaut secondaire.
2. Les phénotypes observés chez les KO conditionnels ou non, sont des défauts secondaires.

Dans le cas du pont, aucun des KO conditionnels étudiés ne montre le phénotype des *Slit1-3* KO et *Robo1/2* KO : les neurones migrent de manière ectopique vers la plaque du plancher.

Que ce soit pour le pont ou l'olive inférieure, il est donc probable que Slits et Robos interviennent en amont de la formation de ces noyaux. Les Slits sont probablement exprimés dans la plaque du plancher très tôt au cours du développement. Malheureusement aucun élément de la littérature ne décrit l'expression des Slits et des Robos à cette période. Cependant, il a été montré chez le poulet que Slit/Robo1 agissent déjà pendant la neurulation sur la prolifération et la différenciation cellulaire.

De façon générale, ma thèse a permis de montrer que les souris mutantes conditionnelles sont des outils génétiques essentiels à l'étude du guidage axonal. Elles nous ont permis de comprendre avec plus de précision le rôle des molécules de guidage au cours du développement. Ainsi, il nous a été possible de montrer que contrairement au modèle établi depuis 30 ans, la Nétrine-1 de la plaque du plancher ne permet pas le guidage des axones commissuraux à la ligne médiane ventrale et que le couple Slit/Robo n'est pas essentiel dans le guidage des neurones précérébelleux.

L'ensemble de nos résultats a permis d'identifier de nouvelles sources de Nétrine-1 lors de la mise en place des commissures cérébrales. D'autres systèmes nécessitent une source de Nétrine-1 lors de leur développement telle que le corps calleux, le système visuel ou la commissure antérieure. Il serait intéressant de reconsidérer leur formation sous un nouvel angle.

Annexes

Article 3 : en préparation

Partial ipsilateral wiring of subcortical sensory inputs duplicates the facial map

Nicolas Renier[1, 2, 3], Chloé Dominici[1, 2, 3], Reha S. Erzurumlu[4], Patricia Gaspar[2,5] & Alain Chédotal[1, 2, 3, †]

1 INSERM, U968, Paris, Institut de la Vision, F-75012, France

2 Université Pierre et Marie Curie, Paris 06, Paris, F-75012, France

3 CNRS, UMR_7210, Paris, F-75012, France

4 Department of Anatomy and Neurobiology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD 21201-1075, USA

5 INSERM, U839, Institut du Fer à Moulin, Paris, F-75005, France

†Correspondence and request for materials should be addressed to Alain Chedotal. E-mail: alain.chedotal@inserm.fr

Abstract

In mammals, tactile information is mapped topographically onto the contralateral side of the brain in the primary somatosensory cortex forming one to one periphery related patterns that are particularly striking in the mouse barrel cortex. Here we describe a mouse mutant where, after an invalidation of the *Robo3* gene in rhombomeres 3, a sizeable fraction of the trigeminothalamic inputs project ipsilaterally rather than contralaterally. The ensuing mixture of crossed and uncrossed sensory inputs creates bilateral whisker maps in the thalamus and somatosensory cortex. This results in the formation of two nested functional maps of the principal whiskers from both sides of the face, with a similar topographic organization. Surprisingly however, they were organized as two separate representations sharing the same cortical space for facial whisker representation. Thus one whisker on the snout was mapped bilaterally in two different positions within the S1. This suggests that ipsi/contralateral competition among the sensory afferents prevails over topographic guidance cues for positioning these afferents in the target. Unilateral sensory afferent removal at birth supports an activity-dependent competition between the ipsi/contralateral sensory inputs for cortical space. This study reveals that the somatosensory system is capable of reorganizing the topographic map to integrate bilateral sensory information, shows the importance of competitive interactions between afferents carrying dissimilar sensory inputs as a predominant mapping rule in the somatosensory system, and therefore could provide an original model to study plasticity and axonal competition in the mammalian brain.

Introduction

The contribution of genetic and activity-dependent mechanisms to the wiring of sensory maps has been the subject of intense study and debate. Current view is that the general position and orientation of the sensory maps in the cerebral cortex is determined by gradients of morphogens (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2003), the specific organization of the maps varies across species (Kaas and Catania, 2002), and according to the sensory modality that it receives. One point of continued controversy however, is the degree to which bilateral representations of a single sensory modality (e.g. vision) are genetically encoded or whether they are shaped by activity-dependent competitive mechanisms. Recent studies in the visual system, suggest that a small change in the crossing of the midline could be the main driver for bilateral sensory representations (Petros et al., 2008). Here we examined the result of partial crossing of presynaptic afferents to the somatosensory thalamus in the whisker to barrel pathway of mice, which is normally entirely crossed.

The sensory afferents from the whisker follicles first synapse in the brainstem trigeminal complex. Second order neurons in the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve (PrV) carry the whisker-specific inputs entirely to the contralateral ventroposteromedial nucleus (VPM) of the thalamus (**Fig. 1A**; reviewed in (Erzurumlu et al., 2010). Whisker-specific PrV neurons mostly originate from rhombomere 3 (Oury et al., 2006). Ablation experiments and genetic models, where changes in whisker number are faithfully reproduced in the brain map (Erzurumlu and Gaspar, 2012; Welker and Van der Loos, 1986) showed the influence of sensory neurons in the layout of the facial map.

In vertebrates, midline crossing by developing axons involves many attractive and repulsive axon guidance molecules such as slits and netrin (Chédotal, 2011). In the

spinal cord and brainstem, one of the key molecules required for crossing is the Roundabout 3 (Robo3) receptor. Several studies in various systems have shown that mice deficient for Robo3 lack commissures in the hindbrain (Marillat et al., 2004; Renier et al., 2010; Sabatier et al., 2004). Interestingly, human patients suffering from a rare congenital disease named HGPPS (horizontal gaze palsy with progressive scoliosis) carry mutations in the *ROBO3* gene and have uncrossed sensory pathways (Jen et al., 2004). In this study we focused on a conditional mutant mouse in which the *Robo3* gene was inactivated in rhombomere 3 (Renier et al., 2010). We anticipated that interference with Robo3 signaling in rhombomere 3-specific fashion would result in purely ipsilateral trigeminothalamic projections and subsequently ipsilateral face and whisker representations in the somatosensory cortex. Unexpectedly, this only caused a partial crossing of the trigeminothalamic axons, resulting in a unique model to analyze the consequence of having both ipsilateral and contralateral sensory afferents in the whisker to barrel pathway. We found that this resulted in the appearance of two functional whisker maps in both the thalamic relay and the barrel cortex. Most interestingly, these maps were entirely segregated as early as postnatal day 4 (P4), indicating a competitive interaction between the ipsi/contra afferents that prevailed over a strict topographic organization. This was supported by deprivation experiments showing that the crossed and uncrossed sensory afferents compete for space in both the thalamic relay and the cerebral cortex.

Results

Genetic perturbation of midline crossing signals and emergence of bilateral somatosensory maps.

The whisker to barrel cortex pathway is comprised of three neuronal relays with strict topographic organization and patterning. Each whisker input is represented by a small group of neurons in the PrV (barrellettes), in the VPM (barreloids), and in layer IV of the primary somatosensory cortex (S1, barrels). As schematized in Fig. 1A, the pathway is ipsilateral in the brainstem and entirely crossed en route to the thalamus and thalamic VPM neurons project ipsilaterally to layers IV and VI of the S1 cortex (Belford and Killackey, 1979; Erzurumlu and Gaspar, 2012).

We analyzed the whisker to barrel projection in the *Krox20-Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ conditional mice that lack most commissural axons in rhombomeres 3 (r3) and r5 (Renier et al., 2010). During development, *Robo3* is transiently expressed in r3 neurons, with an expression that stops shortly after axon crossing, suggesting that it does not play a role in later stages of development such as axon targeting (Renier et al., 2010). Trigeminal ganglion neurons, which project to PrV do not express Robo3 (**Fig. 1B** and not shown). As expected, *in situ* hybridization confirmed that *Robo3* expression is deleted from r3 in *Krox20-Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ 12 days old (E12) embryos (**Fig. 1B**, n= 3/3).

To visualize the trigeminothalamic pathway, *Krox20-Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice were crossed to *Tau-lox-Stop-lox-mGFP-IRES-nls-lacZ* mice (*Tau*^{GFP}) {Hippenmeyer, 2005 #3012}. In E12 *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/+}$*;Tau*^{GFP} controls many GFP+ axons cross the midline at the r3 and r5 level (**Fig. 1B-D)**. The ßGal nuclear reporter showed as expected (Oury) a dense distribution of Krox20+ cell bodies in the ventral region of the PrV nucleus. Neither the distribution of Krox20+ neurons, nor the organization of the Barrelettes was affected in the *Krox20-Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice, suggesting that the development of the PrV nucleus was not perturbed (**Fig 1C**). By contrast, in *Krox20-*

Cre;Robo3$^{lox/lox}$;Tau^{GFP} mutants, most of the GFP+ axons failed to cross although they still projected rostrally towards the midbrain (**Fig. 1B-D**; n=3/3). At E13, coronal sections at the level of r3 confirmed that the density of GFP+ commissural axons at the ventral midline was strongly reduced in *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/lox}$;Tau^{GFP}* but also confirmed that a subset of axons still cross (**Fig. 1B**). To determine whether all neurons in the ventral part of the PrV expressed Cre recombinase in *Krox20::cre;Robo3$^{lox/+}$;tau^{GFP}* mice, we performed double staining for NeuN and ß-gal in adult sections (**Sup. Fig 1B;** n=5**).** This showed that 88% NeuN+ neurons in the ventral part of PrV express ßgal but that a small subset of the NeuN+ PrV neurons (10.7± 1.5%) was not ßgal+ and therefore probably did not expressed Cre recombinase.

However, as the vast majority of PrV ventral neurons were Krox20+, we imaged the trajectory of the Trigemino-Thalamic (TT) tract in both controls and *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/lox}$;Tau^{GFP}* mutant mice from the brainstem through the thalamus using iDISCO whole-mount immunostaining and tissue clearing (Belle et al., 2014; Renier et al., 2014) (**Fig. 2A**). The GFP+ axons had a similar trajectory in the TT tract in control and mutant mice (n=5) at P4, although the tract appeared slightly more defasciculated in the mutants. GFP+ Axon terminals arborized in the VPM in both control and mutant mice, forming barreloid-shaped structures (**Fig 2A, B**). To look at the distribution of r3-derived axons in the *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/lox}$;Tau^{GFP}* mutant VPM, we cut thalamic sections of P4 brains, and stained them with cytochrome oxidase to reveal the barreloids, and co-immunostained for GFP. In all mutants and controls (n=14 for each genotype), the r3-derived GFP+ (r3-GFP+) axons projected to the dorsolateral VPM containing the barreloids (**Fig. 2B**). An abnormal organization of the whisker barreloids was noted in

the mutant VPM. In controls, all the barreloid rows coincided with a dense r3-GFP+ axon territory (**Fig. 2B**; n=4/4), whereas in mutants two distinct zones were observed (n=4/4): a lateral VPM domain containing a high density of GFP+ axons and a medial VPM domain with only sparse patches of GFP+ axons (**Fig. 2B**). These two VPM domains, contained barreloids as noted with cytochrome oxydase staining and were of comparable surface (0.19±0.006 mm^2 for the lateral dense GFP+ domain and 0.18±0.003 mm^2 for the medial patches of GFP+ domain, P=0.46). Moreover, they were separated by a cytochrome oxidase-free septum. These observations suggested that in the *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice, the VPM became split into two functionally separate domains, each with a different barreloid patterns (although the lateral one contains the highest density of the r3-derived projections, and the larger barreloids).

To map the inputs of those two different VPM domains in the *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mutant mice, we anterogradelly traced the PrV to VPM projections in P4 mice using carbocyanine dyes. In control mice the PrV-VPM projection was completely crossed, whereas in mutants, the VPM received a bilateral innervation from the PrV (**Fig. 2C**). This shows that two ascending sensory pathways co-exist in the mutants, a normally crossed PrV-VPM pathway and a new ipsilateral PrV-VPM pathway. Moreover, the position, shape, size and densities of the filled axons in the VPM was reminiscent of the two domains described previously, suggesting that in the mutants, the dense GFP+ lateral region might correspond to abnormal ipsilateral projections from the PrV, while the medial GFP patches might be originating from the contralateral side.

This suggested that the mutant VPM could receive ipsilateral and contralateral trigeminothalamic inputs. To test this hypothesis, we performed retrograde tracing experiments. We injected DiI in one VPM and DiA in the contralateral VPM in P4

mice. In the *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/+}$ controls, DiI and DiA labeled neurons were found only in the contralateral PrV nucleus, dorsally and ventrally, as expected for commissural neurons (**Fig. 2D**; n=4/4). By contrast, in the *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mutants, DiA and DiI labeled neurons were found in the PrV on both sides of the hindbrain (**Fig. 2D**; n=4/4). While the dorsal part of the PrV almost only contained neurons projecting to the contralateral VPM (as expected from their r2 origin (Oury et al., 2006)) the ventral domain contained a mixture or DiI and DiA labeled neurons, with 3.3 times more neurons traced ipsilaterally than contralaterally. This indicates that in the *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mutants, the ventral part of the PrV, which relays whisker inputs to the VPM, projects bilaterally.

Overall these data suggest that a large fraction of the r3-derived trigeminothalamic axons project ipsilaterally in *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mutants but that some still project contralaterally and might have escaped Cre recombination or started expressing Cre after crossing (see below and discussion). Interestingly, the comparison of the carbocyanine tracings and of the GFP staining (**Fig. 2**) further revealed that: i) although the ipsilaterally and contralaterally projecting neurons in ventral PrV are intermingled, their projections in the VPM are segregated; and, ii) while the ipsilateral projection corresponded to the lateral VPM domain targeted by GFP^{+} r3-derived axons, the contralateral PrV-VPM projections targeted the medial VPM and corresponded to, at least, two subpopulations: the few GFP^{+} sparsed fibers originating from r3 that likely escaped the deletion of ROBO3 (**Fig. 1f-i**) and GFP^{-} projections, likely originating from r2.

To determine the organization of the VPM map in the *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mutants, as well as the origin of the GFP+ patches, we performed whole-mount imaging of *Krox20-Cre;Tau*^{GFP} controls and mutant mice at P8 using iDISCO (**Fig 3**).

To better reveal the VPM map, 3D datasets where oriented at a 45° oblique angle from both coronal and horizontal planes (**Fig 3A**). In control mice, the VPM showed the conspicuous topographical organization of the barreloids in those preparations. In the *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$*;Tau*^{GFP} mutants, the GFP dense and patched regions where manually segmented to show their individual 3D projections. Both segmentations showed barreloids organized in rows reminiscent of the control VPM map (**Fig 3A**, n=3).

To determine whether both regions corresponded to a functionally distinct projection, we performed unilateral lesions of the Infra-Orbital Nerve (ION) at P0 in *Krox20-Cre;Tau*^{GFP} controls and mutant mice. The GFP+ projections in the VPM were imaged at P8. The unilateral ION lesions at P0 caused a fusion of the barreloids in the contralateral VPM in control mice at P8 (**Fig 2B**; n=3**).** In mutants, we observed that the lesions where causing the fusion of the barreloids on the ipsilateral side for the GFP-dense region, and on the contralateral side for the GFP patched region (**Fig 2B**, n=5). This suggests that, as suspected from the tracing experiments, the GFP dense region in the VPM receives ipsilateral inputs from the PrV, whereas the GFP patched region receives contralateral inputs. This also shows that the GFP-patched region is carrying somatosensory information originating from the orbital branch of the trigeminal nerve. Moreover, we noticed that the map having sustained a sensory deprivation where shrinking in size, while the adjacent non-deprived map was expanding in size (**Fig 3C**, n=5). This shows that activity-based competition is driving the development of the adjacent ipsilateral and contralateral maps in the dorsal VPM. Combined with the tracing results, the ION lesions enable the establishment of a model for the organization of the VPM in the *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mutant mice (**Fig 3D**). In the mutant VPM, sensory information from the ipsilateral whiskers project

to a dorso-lateral map, forming dense projections from r3 resembling the organization of the wild-type contralateral barreloids. Adjacent to this map, r3-originating axons carrying information from the contralateral PrV project to the dorso-medial VPM in discrete patches also organized in rows reminiscent of the normal map.

Formation of bifacial cortical maps

Next, we determined how these segregated ipsi and contrateral whisker representations in the VPM would influence the formation of the somatosensory map in the cerebral cortex. Tangential sections through layer IV were stained for cytochrome oxidase and Vglut2 immunoreactivity to label thalamocortical afferents (Nahmani and Erisir, 2005) (**Fig. 4A**). A striking abnormality in the layout of thalamic afferents was noted in the posteromedial barrel subfield (PMBSF, which corresponds to the representation of the large whiskers) of S1 the *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice (n=5/5; **Fig. 4A**). Barrels were more numerous (52±2 barrels in mutant PMBSF *vs.* 33±0 in controls), and were reduced in size (0.04mm^2 ± 0.01 per barrel in mutants, compared to 0.09mm^2±0.02 in controls, P<0.0001). Moreover they were arranged into 8 rather than the usual 5 whisker rows, with a clear delineation of two separate cortical zones, a central zone, and a peripheral zone, each containing distinct barrel rows (**Fig. A4 and Fig. S2-3**). These defects were comparable in both hemispheres and at all ages analyzed (with only slight individual variations; n=25/25; **Fig. S2-3**). To map the functional whisker representation in this unusual map, we monitored the activation of the immediate early gene c-fos following a 1-hour exposure to an enriched sensory environment (Staiger et al., 2000). In mice with unilateral trimming of the whiskers (**Fig. 4B**) strong c-fos labeling is normally observed only in the S1 contralateral to the intact whiskers. In *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice with unilateral

whisker trimming, c-fos was activated in the PMBSF of both hemispheres (**Fig. 4B**). Contralateral to the intact whiskers, c-fos activation was visible in the peripheral barrel rows (Contra domain; **Fig. 4B**). Ipsilateral to the intact whiskers, a mirror image was noted with c-fos activation in the central barrel rows (Ipsi domain; **Fig. 4B**). In both contralateral and ipsilateral patterns, c-fos+ cells were recorded in all layers from the columns of the stimulated barrels. These results showed that in *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice, the crossed and uncrossed trigeminothalamic domains are mapped as two segregated nested domains: a central one processing ipsilateral inputs surrounded by an outer domain processing contralateral inputs (**Fig. 4B**).

Orientation and polarity of the maps.

The segregation of the two maps led to the crucial question of its topographic organization. Indeed there are two possibilities: i) the thalamic afferents follow topographic guidance cues that are determined by molecular guidance cues expressed in the cortex, with complementary receptor expression in the thalamus; in this case one would expect that neighboring whiskers of the ipsi and contralateral map lie in register with one another; and, ii) the thalamic afferents are clustered following activity-based rules leading functionally coordinated afferents to cluster together, in this case the topographical rule of near neighbors would prevail over the notion of molecular gradients. To analyze the topographic alignment of the crossed and uncrossed somatosensory maps by monitoring c-fos expression in S1 after clipping all whiskers except one row or one arc of whiskers on one side (**Fig. 4C** and data not shown). When the 5 posterior most whiskers of the whisker pad (A1-E1; **Fig. 4C**) were left intact in control mice, this resulted in the activation of c-fos in a caudal arc of 5 barrels exclusively in the contralateral S1 (**Fig. 4C**). Likewise, when the second whisker row (B1-B4; **Fig. 4C**) was left intact, the corresponding row of barrels

was activated in the contralateral S1 (**Fig. 4C**). In mutants, c-fos activation was bilateral, with a labeling that was in register in both the central (ipsi) and peripheral (contra) PMBSF domains (**Fig. 4C**). The orientation of the two nested maps was similar to control mice probably due to the patterning activity of morphogens that determine the polarity of the map (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001; 2003). However, unlike the visual or auditory bilateral maps, we observed that there were discontinuities in the organization of the bilateral somatotopic map, such as a lack of topographic proximity of the ipsi/contra representation of a given barrel or barrel row. Rather, there appeared to be a clear separation and independence of the ipsi- and contralateral inputs.

Competition between ipsi- and contralateral inputs for cortical space

To evaluate whether the bilateral thalamocortical maps recruited new cortical space or were included within the normal boundaries of S1, we measured the overall size of the PMBSF. This space was not increased (2.32±0.05 mm^2 in controls *vs* 1.90±0.12 mm^2 in mutants, P=0.04) unlike in other mouse models with duplication of the S1 map where a second S1 map is formed at the expense of other cortical areas (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001; 2003). This suggested that the ipsi- and contralateral thalamic inputs compete to occupy a defined cortical space in S1, a feature reminiscent of ocular dominance columns (ODC) in the visual cortex. Accordingly, individual barrels in mutants were roughly half the size (44± 2%) of controls. To prove the existence of such a competition, we studied the consequence of unilateral deprivation of whisker inputs induced by a neonatal (P1) lesion of the infraorbital nerve (Waite and Cragg, 1982). In control mice, barrels were only observed in S1 ipsilateral to the lesion (**Fig. 5A**; n=3/3). In contrast, in mutants, barrels formed on both sides corresponding to the ipsi- and contralateral

representations of the intact whisker pad (**Fig. 5A**; n=5/5). Furthermore, while the infraorbital nerve lesioned side ipsi- and contralateral representations shrunk in size (50±4% of the unlesioned mutant PMBSF), those corresponding to the intact whiskerpad enlarged in both cortices (138±10% of the unlesioned mutant PMBSF). This suggests that there is an activity-dependent competition for cortical space between the ipsilateral and contralateral sensory inputs in the mutant S1.

Finally, we wanted to check whether the ipsilateral and contralateral maps where functionally isolated, or whether activity in upper cortical layers could spread from one map to another. We used iDISCO+ based c-fos mapping to isolate the c-fos+ cells from the upper cortical layers (Renier et al., 2016). In those layers, the activity pattern is not sharply restricted to the stimulated barrels as in layer 4 (**Fig 5B**), but spills over adjacent barrels, likely due to the integration from exploratory whisking between adjacent barrels ((Peron et al., 2015)). Spill-over of c-fos+ cells was observed within both maps in between activated barrels (**Fig 5B**), but not across the boundary of each map, suggesting that the ipsilateral and contralateral might have little to none direct horizontal integration in the upper cortical layers.

Discussion

There is a vast literature on the dependence of whisker-specific patterning of facial brain maps on sensory periphery and cortical positioning and size of these maps on intrinsic molecular cues (reviewed in (Erzurumlu and Gaspar, 2012)). The present observations demonstrate a novel aspect of whisker-related map formation and show that a genetic defect in the crossing of sensory axon tracts at the midline leads to a completely unexpected anatomical and functional reorganization: duplication of the facial whisker representation with two completely separate maps sharing the same

cortical space allotted to somatosensory function. The segregation of these two whisker maps indicates that competitive interactions for space in the S1 cortex are not only based on periphery related signals from the whisker pads, but also on signals that axons acquire while travelling together in the trigeminothalamic pathway.

Role of Robo 3 in the trigeminal crossing of the midline.

Robo 3 has been identified as a major player in the crossing of the midline by comissural spinal and brainstem neurons (Chédotal, 2011; Marillat et al., 2004; Sabatier et al., 2004). Here, we found that the trigeminal neurons also depend on Robo3 for midline crossing, indeed PrV neurons transiently expresses Robo 3 at embryonic stages when these neurons cross the midline (E11-E14), and loss of robo3 prevents the crossing of a large majority of the trigeminothalamic axons. However the axons that remain on the same side have a normal ascending path in the medial lemniscus and target normally the VPM nucleus of the thalamus. Thus although the axons do not cross the midline, the subsequent axon path finding is undisturbed, showing that the molecular switch occurring at the midline is not required for the development/orientation of axons. This observation extends previous findings in the visual and the olivary systems, which showed that uncrossing of normally crossed pathways does not alter their normal targeting (Marillat et al., 2002; Rebsam et al., 2009; Renier et al., 2010).

A fraction of the trigeminal axons continued to cross the midline after deletion of robo3 in rhombomere 3, which gives rise to the largest number of PrV neurons (Oury et al., 2006). There are several reasons that might explain this incomplete effect. On one hand, robo3 invalidation may be incomplete since not all PrV neurons express Cre, and some PrV neurons may have escaped the recombination. On the other

hand, some PrV neurons may be derived from neighbouring rhombomeres and may have migrated at early embryonic stages. Finally, there may be some functional redundancy in the combination of receptors that guide axons towards the midline and across.

While we cannot explain definitively the mechanisms underlying partial crossing of PrV trigeminothalamic axons, the fact remains that in *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ conditional mice the trigeminothalamic pathway is comprised of a combination of crossed and uncrossed components. Thus, sensory information arising from one whisker is mapped onto one barrellette in the brainstem, but the same information is mapped bilaterally in the secondary relay in the thalamus and then in the cerebral cortex.

Duplication and segregation of whisker maps.

Because afferents of one barrelette in the PrV carry functional information from one whisker, one could expect that in the following sensory relay stations the information arising from the homologous whiskers on each side of the brain would be mapped side by side, maintaining topographic rules. However, quite unexpectedly, these representations were separate, each being included in a distinct/autonomous map. This indicated a high degree of segregation of afferents arising from the ipsi and contralateral whisker pads/ PrV barrellette. The reason for this is unclear. It is unlikely that segregation of the ipsi- and contralateral projections would be based on a differential rhombomeric origin. Indeed a mixture of r2 and r3 derived trigeminothalamic axons were identified within the ipsilateral thalamic representation. Based on somewhat comparable segregation mechanisms in the visual system, one may surmise that spontaneous neural activity in the trigeminothalamic pathway plays

a role in this segregation. Spontaneous activity has been demonstrated in the perinatal PrV (Ho and Waite, 1999; Waite et al., 2000), thus, one would expect that the nearby cells in the PrV on each side would fire synchronously, whereas the activity would not be synchronous between both sides of the brainstem. However, the fact that within either the ipsi or contra whisker maps, topographic proximity is maintained among whisker barrels of similar laterality, indicated that local “proximity” cues among axons traveling together on each side may over-rule the topographic cues in the target areas (as is the case in the olfactory system or in drosophila visual system Luo and Flanagan, 2007). Thus the particular organization of the two embedded whisker maps emphasizes an important characteristic of the somatosensory system which combines two different mapping rules, the first being the continuous topographic representation of the body surface, the second being an organization into distinct functional units.

Orientation and competition of the representations.

Contrary to previous observations of experimental map duplication (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001) the present orientation of the two whisker maps was similar in the general rostrocaudal and mediolateral axes, indicating that matching gradients of guidance molecules and their receptors was most likely unchanged. This contrasts with the mirror image organization of the sensory maps obtained after experimentally inducing novel source of molecular gradients in the somatosensory cortex (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001). This also contrasts with observations of map duplication in the visual system, caused by a change in the retinal axon crossing at the midline (Petros et al., 2008), by lack of one eye (Trevelyan et al., 2007) or by lack of one hemisphere (Muckli et al., 2009). However in the latter case the mirror

image maps are probably due to a conflict between maintaining functionality and mapping labels.

Since the initial description of the whisker “barrels” in the mouse primary somatosensory cortex and their dependence on an intact sensory periphery (Van der Loos and Woolsey, 1973; Woolsey and Van der Loos, 1970) the rodent trigeminal pathway has been used as a model system to investigate mechanisms underlying formation of orderly brain maps and their plasticity. Numerous studies showed that infraorbital nerve lesions or whisker follicle damage during the first few days after birth irreversibly alter or prevent formation of cortical barrels and whisker-specific patterns in the subcortical stations (reviewed in (Erzurumlu and Gaspar, 2012)). Furthermore, when a supernumerary whisker follicle develops on the snout a corresponding neural representation or barrel also forms in the brain (Welker and Van der Loos, 1986). Collectively, these findings underscored the role of sensory periphery (the whisker pad) in dictating the patterning of neural elements in the brain. More recent studies focused on the role of intrinsic cortical (or subcortical) molecular gradients that delineate the position and the size of the sensory maps in the cortex and confer specific identities to different populations of cortical neurons. Here we show that a specific mutation that misdirects subpopulations of trigeminothalamic projection neurons can lead to development of bilateral whisker maps in the thalamus and neocortex, independent of the sensory periphery or the cortical positional cues.

While we do not know the functional/behavioral consequences of whisker map duplication in the thalamus and neocortex, our results revealed competitive interactions between the ipsi- and contralateral maps in the cortical territory. Interestingly the polarity of the two maps in the cerebral cortex was similar in both the

rostrocaudal and mediolateral orientations, indicating that the thalamocortical maps orient essentially according to molecular gradients expressed in the cerebral cortex.

From a phylogenetic point of view our observations brings new perspectives on how novel sensory representations emerge in evolution, with either parallel or mirror image representations and unilateral or bilateral representations. In this respect our observations are interesting to compare with mechanisms of eye-specific segregation in the visual maps.In the mammalian visual system, ipsilateral and contralateral visual inputs from both eyes segregate within distinct domains in the lateral geniculate nucleus and in the cortex (Torborg et al., 2005). Activity-dependent segregation of sensory inputs that do not normally innervate the same target region has been demonstrated previously in the optic tectum of 3-eyed frogs (Constantine-Paton and Law, 1978). Our results show for the first time that *de novo* bilateral maps can be created for a sensory representation in which mixing of inputs from the two sides normally does not occur. This suggests that the developmental program, which controls the bilateral segregation of visual and auditory inputs is conserved and can be activated in thalamic nuclei processing the somatosensory modality, with some differences such as continuity in the visual map or discontinuities in the somatosensory maps that may be the reflection of intrinsic functional differences between these modalities. Although brain wiring largely relies on genetically encoded processes our results further illustrate the remarkable plasticity of the mammalian brain and its ability to accommodate changes in afferent wiring in evolution to create new representations, and also its ability, in the context of developmental brain disorders to compensate for major axon guidance defects that otherwise would lead

to severe brain dysfunction (Jen et al., 2004; Muckli et al., 2009; Williams et al., 1994).

Experimental Procedures

Mice

All animal procedures were carried out in accordance to institutional guidelines (UPMC and INSERM). Mice were anesthetized with Ketamine (Virbac) and Xylazine (Rompun). The day of vaginal plug is embryonic day 0 (E0) and the day of birth corresponds to postnatal day 0 (P0).

The Robo3 conditional knockout, *Krox20::Cre* knock-in and Tau^{GFP} lines were previously described (Hippenmeyer et al., 2005; Renier et al., 2010; Voiculescu et al., 2000). Unless otherwise mentioned, controls were *Robo3*$^{lox/lox}$ or *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/+}$ animals. Double heterozygotes were always similar to wild-type mice. Mice were genotyped by PCR.

The following primers were used for genotyping: the conditional Robo3 allele 5'-CCA AGG AAA AAC TTG AGG TTG CAG CTA G-3' and 5'-GAT TAG GGG AGG TGA GAC ATA GGG-3', the Krox20::Cre 5'-AGT CCA TAT ATG GGC AGC GAC-3' and 5'-ATC AGT GCG TTC GAA CGC TA-3', the Tau^{GFP} : 5'-GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG-3' and 5'-CTC AGG GCG GAC TGG GTG CTC AGG-3'. All PCR run have 34 cycles with an annealing temperature of 58°C.

In the Tau^{GFP} line, upon Cre recombination in neurons, the Stop cassette is excised leading to the permanent expression of a myristoylated GFP in axons and of ß-galactosidase in nuclei {Hippenmeyer, 2005 #3012}.

The *r2::mCherry* line was created by replacing the LacZ gene of the pKS-ß-globin-

lacZ vector (BGZ40; (Studer et al., 1996) with a mCherry cassette (Clontech) using homologous recombination. A r2-specific enhancer from the Hoxa2 regulatory region (Ren et al., 2002) was subcloned 5`of the ß-globin promoter using the restriction sites SmaI and AvaI, thus generating the pR2::mCherry construct. pR2::mCherry was linearized, purified and microinjected into the pronuclei of embryos. Founders were identified by PCR using 5`-GGT GTA CGC GGT TCT CAG AC-3` and 5`- TTA GCG GCC GCA TTA CTT GTA-3` primers and r2-specific expression.

Primers for homologous recombination:

5`-CCT TCC AGA AGC AGA AGC GCG GCG CCA CCA TGG TGA GCA AGG GGC GAG GAT AAC A-3`

5`-TGG CCT GCC CGG TTA TTA TTA TTT TTT ACT TGT ACA GCT CGT CCA TGC CG-3`

Histology and immunocytochemistry

Mice were perfused transcardially with a 4% PFA in 0.12mM phosphate buffer. Cortices were flattened between microscope slides and post-fixed in 4% PFA and vibratome (Leica) sectioned at 50µm. Hindbrains and thalamus were post-fixed in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose and sectioned at 35µm with a freezing microtome (Microm).

For Cytochrome oxidase staining (Melzer et al., 1994), sections were incubated at room temperature for 24 hours in 10% sucrose, 0,3g/L cytochrome c from equine heart (Sigma), 0,02g/L catalase from bovine liver (Sigma) and 0,25g/L DAB (Sigma). The endogenous fluorescence of the GFP in *Krox20::Cre;Tau*^{GFP} was not affected after the treatment and could be imaged on the same sections, however the GFP signal was further enhanced by immunostaining, as follows:

For immunohistochemistry, neonatal and adults brains were processed as described previously (Marillat et al., 2002). The following primary antibodies were used: guinea pig anti-Vglut2 (1:1000, Millipore), rabbit anti-βGal (1:1000, Cappel), rabbit anti-c-fos (1:1000, Santa-Cruz), rabbit anti-GFP (1:300, Invitrogen), chicken anti-GFP (1:800, Abcam). The following secondary antibody were used: Donkey Anti-Mouse, Anti-Rabbit and Anti-Guinea pig coupled to CY3 or CY5 (1:600, Jackson Laboratories), Donkey Anti-Mouse, Anti-Rabbit and Anti-Chicken coupled to Alexa Fluor 488 (1:600, Invitrogen). Sections counterstained with Hoechst 33258 (10 µg ml^{-1}, Sigma)

Sections were examined with a fluorescent microscope (DM6000, Leica) equipped with a CoolSnapHQ camera (Roper Scientific), a confocal microscope (FV1000, Olympus), or a slide scanner (Nanozoomer, Hamamatsu).

In situ hybridization

Antisense riboprobes were labeled with digoxigenin-11-D-UTP (Roche Diagnostics) as described previously (Marillat et al., 2002) by in vitro transcription of mouse cDNAs encoding *robo3* or an exon specific probe of *robo3* targeting the floxed region (Renier et al., 2010).

DiI tracing

4% PFA fixed P4 pups were injected with small crystals of 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, Invitrogen) and 4-(4-(dihexadecylamino)styryl)-*N*-methylpyridinium iodide (DiA, Invitrogen) using glass micropipettes. For anterograde tracing, the dye crystals were injected unilaterally in the PrV. For retrograde tracing of the PrV nuclei, the cortices were removed to expose the thalamus and DiI or DiA crystals were at the level of the VPM.

Brains were kept at 37°C for 4 weeks. Brains were cut in 80 µm sections with a vibratome (Leica) and counterstained with Hoechst.

Infra-orbital nerve lesions

P0-P1 pups were cold anesthetized, and an incision was made between the whisker pad and the eye. The nerve was cut with scissors under a dissecting scope. The pups were allowed to recover for 10 days and then perfused.

c-fos expression and whisker activity

P20-P30 mice were anesthetized with ketamine, and all whiskers were trimmed on the left side. In different experiments, either all whiskers were spared on the right side, or only selected whisker rows or arcs were spared. Mice were allowed to recover from anesthesia for 6 to 12 hours, and then left alone in a large (1m x 60cm) "enriched" cage in the dark for 1 hour before being perfused and processed for c-fos immunostaining.

Quantifications and statistical analysis

Areas were calculated with NDPview (Hamamatsu) from cytochrome oxidase staining at P10 or Vglut2 stainings when done in adults. For quantification of map areas from P10 flattened cortices, the surface in controls was limited to the first 4 barrels in row A, 4 in row B, 6 in row C, 7 in row D and 8 in row E. In *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mutants, the central (ipsi) map area comprises the domain bordered by a thick Vglut2-negative boundary. The peripheral (contra) map area was limited to the barrels located immediately above and below the border of the central ipsi map. To determine individual barrel areas in adults, only the largest unambiguous barrels were measured (first 3 barrels for rows E,D,C and first barrels

for rows A and B). Areas where assessed on the tangential section showing the most complete map of the PMBSF.

The areas of the VPM nucleus were calculated with NDPview from frontal sections of P4 *Krox20::Cre;Tau*^{GFP} mice stained with cytochrome oxidase and immunostained for GFP, at a mid-level of the VPM, where the barreloids organization was the most obvious.

Results are presented as means ± SEM. Differences of the means between two sample sets were assed by two-tailed non-parametric Mann-Whitney test. Statistics were carried out with Prism (Graphpad software).

Acknowledgements

We thanks P. Charnay for providing the *Krox20::Cre* line, and S. Arber for the Tau^{GFP} mice. We also thank N. Narboux-Nême for technical help, G. Goodhill, L.J. Richards, M. Feller and C. Sotelo for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (Programme “équipe FRM”) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-MNP-030) to A.C, (ANR-08, MNP-032) to PG, and the Ecole des Neurosciences de Paris (ENP) and NIH/NINDS RO1 NS039050 to R.S.E. FMR laboratory is supported by the Swiss National Science Foundation (CRSI33_127440), ARSEP, and the Novartis Research Foundation. N. R. is recipient of a PhD fellowship from the Association Française contre les Myopathies (AFM).

Figure legends

Figure 1. Rewiring of r3 and r5 hindbrain to midbrain/forebrain projections in *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/lox}$* mice.

(**A**) schematic representation of the mouse whisker to barrel somatosensory pathway. (**B**) Top panels: coronal sections at r3 level in E12 embryos hybridized with a *robo3* probe. No staining is observed in *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/lox}$* mice in r3. Trigeminal ganglion (V) neurons do not express *Robo3*. Bottom panels: coronal sections at r3 level in E13 *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/+}$;Tau^{GFP}* or *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/lox}$;Tau^{GFP}* embryos stained for GFP. GFP+ commissures are strongly reduced in mutants, but a few axons are still crossing (arrows)**.** (**C**) Cytochrome oxidase staining, and ßGal co-Immunostaining of coronal sections of P4 *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/+}$;Tau^{GFP}* or *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/lox}$;Tau^{GFP}* brains at the level of the PrV, showing the barrellettes. Rows A to E are indicated. The barellette patterns and ßGal+ cells distribution is similar in Control and *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/lox}$* mutant mice. aVCN: anterior Ventral Cochlear Nucleus. (**D)** flat-mount view and scheme of the hindbrain of E12 *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/+}$;Tau^{GFP}* or *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/lox}$;Tau^{GFP}* embryos. Commissures are strongly reduced at r3 and r5 levels in mutants but a subset of axons still cross in r3 (arrowheads). GFP+ axons still project rostrally towards the midbrain.

Figure 2. Organization of the projections to the VPM

(**A**) Whole-mount immunostaining for GFP in *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/+}$;Tau^{GFP}* and *Krox20::Cre;Robo3$^{lox/+}$;Tau^{GFP}* P4 brains. Dorsal projections (left) and lateral projections (right) are shown for each case. The Trigemino Thalamic tract has been color-coded in gray, while the rest of the GFP signal is in red. (**B**) Coronal sections of

P4 mouse brain through the sensory thalamus (VPM) stained for cytochrome oxidase. In *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/+}$*;Tau*^{GFP} mice, GFP+ axons project to the barreloid area of the VPM (rows A-E are indicated). In *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$*;Tau*^{GFP} mice barreloids are found in two regions, a lateral one containing most of the GFP+ axons and a medial one (arrows) containing only a few patches of GFP axons. (**C**) P4 mice injected bilaterally with DiI and DiA at the level of the PrV nucleus. Sections were collected at the level of the VPM. In controls, the PrV-VPM projection is entirely crossed. In mutants, the VPM receives bilateral inputs from the ipsilateral and contralateral PrV. (**D**) P4 hindbrains cross sections at the level of the PrV in controls and mutants after unilateral injections of DiA and DiI in the VPM (depicted in the schematics). In controls, PrV are labeled by the dye injected in the contralateral VPM. In mutants, the dorsal PrV also has only contralaterally labeled neurons, whereas the ventral PrV contains interspersed ipsilaterally and contralaterally labeled neurons.

Figure 3. Structure of the VPM maps revealed by ION lesions

Whole-mount scans of cleared P8 *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/+}$*;Tau*^{GFP} and *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/+}$*;Tau*^{GFP} brains immunostained for GFP. Optical sections and 3D oblique projections are presented. (**A**) Control and mutant brains, ION intact. The oblique projection reveals the barreloids topographic organization in controls (left panels) or mutants (right panels). For the mutant, the domains from GFP dense axons (green) and GFP patched axons (red) were manually segmented. (**B**) Control and mutant brains, unilateral ION lesions. The data are presented the same way as in **A**. On the side contralateral to the lesion, the barreloids are fused in the control brains (n=3), while only the barreloids from the patched axons are fused (red). The GFP dense cluster still has barreloids visible. On the side ipsilateral to the lesion, the

control brains show apparent barreloids, while only the patched GFP axons (red) have them in the mutants. The GFP dense axons (green) reveal a fused map. (**C**) Expansion and retraction of the VPM domains in *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/+}$*;Tau*^{GFP} P8 brains after lesions. (**D**) Model of the VPM organization.

Figure 4. Bilateral inputs to the barrel cortex in *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice.

(A) tangential sections through the barrel cortex from P10 mice stained for cytochrome oxidase or anti-Vglut2. Barrels are more numerous and smaller in mutants. The black dotted line indicate a clear boundary delimiting two regions within the large whisker representation. (**B)** After unilateral whisker trimming in adults : only the contralateral cortex receives normal sensory, while the ipsilateral cortex is sensory-deprived. Flat-mount of S1 and coronal transverse sections in whisker-deprived adult mice immunostained for Vglut2 and c-fos. In *Robo3*$^{lox/lox}$ controls, c-fos staining is high contralateral to the intact whiskers, whereas in *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mutants, c-fos expression is induced bilaterally in complementary domains processing ipsilateral and contralateral inputs. (**C**) Flat-mount of S1 in whisker-deprived adult mice immunostained for Vglut2 and c-fos. (**D**) schematic representation of the whisker map deduced from c-fos activation patterns. (**E**) General model for the wiring of the *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mutants mice.

Figure 5 Activity-dependent competition between ipsilateral and contralateral inputs in mutant barrel cortex

(**A**) cytochrome oxidase staining of P10 cortices after unilateral lesion of the infra-orbital nerve at P1. In controls, the barrels do not form in S1 contralateral to the lesion, whereas a normal map is seen on the ipsilateral side. In

Krox20::Cre;Robo3$^{lox/lox}$ mutants, contralateral to the lesion, barrels form in the domain processing ipsilateral inputs and ipsilateral to the lesion a barreless region is noted in the domain processing ipsilateral inputs. (**B**) Whole-mount c-fos immunostaining and imaging of adult brains after unilateral stimulation of the rows A, C and E, manually segmented by cortical layers. The pattern in the lower right panel show the spread of c-fos+ cells between active rows, but no spread from the contralateral map to the adjacent ipsilateral map.

Supplementary Figure 1

Normal organization of the principal trigeminal nucleus (PrV) in *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice

(a-d) Cytochrome oxidase staining of coronal sections of P4 brains at the level of the PrV, showing the barrellettes. Rows A to E are indicated. The barellette pattern is similar in Control and *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mutant mice. 5m: Trigeminal motor nucleus, d: dorsal PrV, v: ventral PrV. (**e**,**f**) Coronal sections at the level of the PrV in adults *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/+}$*;Tau*^{GFP}, stained with anti NeuN and anti ßGal. ßGal- and NeuN+ cells can be found in the ventral PrV (arrowheads).

Scale bars, 400µm (**a**, **c**); 100µm (**b**, **d**); 200µm (**e**); 50µm (**f**)

Supplementary Figure 2

Abnormal organization of the barrel cortex in *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice

Barrels cortices of adult mice stained with anti-VGLUT2. Left and right cortices of the same animals are presented, showing the similarities in the shape of the map

processing ipsilateral inputs (delineated by the dashes line) and contralateral inputs in *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice.

Scale bars, 200µm

Supplementary Figure 3

Surface of individual barrels in *Robo3*$^{lox/lox}$ and *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ mice

Individual barrels were matched with c-fos activity and surfaces were quantified on 6 *Krox20::Cre;Robo3*$^{lox/lox}$ adult mice and 4 *Robo3*$^{lox/lox}$ and compared using ANOVA and Bonferroni Post-test. ns: $p>0.05$; *: $0.05<p<0.01$; **: $0.01<p<0.001$.

References

Belford, G.R., and Killackey, H.P. (1979). Vibrissae representation in subcortical trigeminal centers of the neonatal rat. J Comp Neurol *183*, 305–321.

Belle, M., Godefroy, D., Dominici, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., Bradke, F., and Chédotal, A. (2014). A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a transparent nervous system. Cell Rep *9*, 1191–1201.

Chédotal, A. (2011). Further tales of the midline. Curr Opin Neurobiol *21*, 68–75.

Constantine-Paton, M., and Law, M.I. (1978). Eye-specific termination bands in tecta of three-eyed frogs. Science *202*, 639–641.

Erzurumlu, R.S., and Gaspar, P. (2012). Development and critical period plasticity of the barrel cortex. Eur J Neurosci *35*, 1540–1553.

Erzurumlu, R.S., Murakami, Y., and Rijli, F.M. (2010). Mapping the face in the somatosensory brainstem. Nat Rev Neurosci *11*, 252–263.

Fukuchi-Shimogori, T., and Grove, E.A. (2001). Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. Science *294*, 1071–1074.

Fukuchi-Shimogori, T., and Grove, E.A. (2003). Emx2 patterns the neocortex by regulating FGF positional signaling. Nat Neurosci *6*, 825–831.

Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D.R., and Arber, S. (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. PLoS Biol *3*, e159.

Ho, S.M., and Waite, P.M. (1999). Spontaneous activity in the perinatal trigeminal nucleus of the rat. Neuroreport *10*, 659–664.

Jen, J.C., Chan, W.-M., Bosley, T.M., Wan, J., Carr, J.R., Rüb, U., Shattuck, D., Salamon, G., Kudo, L.C., Ou, J., et al. (2004). Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. Science *304*, 1509–1513.

Kaas, J.H., and Catania, K.C. (2002). How do features of sensory representations develop? Bioessays *24*, 334–343.

Luo, L., and Flanagan, J.G. (2007). Development of Continuous and Discrete Neural Maps. Neuron *56*, 284–300.

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.

Marillat, V., Sabatier, C., Failli, V., Matsunaga, E., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., and Chédotal, A. (2004). The slit receptor Rig-1/Robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. Neuron *43*, 69–79.

Melzer, P., Welker, E., Dörfl, J., and Van der Loos, H. (1994). Maturation of the neuronal metabolic response to vibrissa stimulation in the developing whisker-to-barrel pathway of the mouse. Brain Res. Dev. Brain Res. *77*, 227–250.

Muckli, L., Naumer, M.J., and Singer, W. (2009). Bilateral visual field maps in a patient with only one hemisphere. Proc Natl Acad Sci USA *106*, 13034–13039.

Nahmani, M., and Erisir, A. (2005). VGluT2 immunochemistry identifies thalamocortical terminals in layer 4 of adult and developing visual cortex. J Comp Neurol *484*, 458–473.

Oury, F., Murakami, Y., Renaud, J.-S., Pasqualetti, M., Charnay, P., Ren, S.-Y., and Rijli, F.M. (2006). Hoxa2- and rhombomere-dependent development of the mouse facial somatosensory map. Science *313*, 1408–1413.

Peron, S.P., Freeman, J., Iyer, V., Guo, C., and Svoboda, K. (2015). A Cellular Resolution Map of Barrel Cortex Activity during Tactile Behavior. Neuron *86*, 783–799.

Petros, T.J., Rebsam, A., and Mason, C.A. (2008). Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. Annu. Rev. Neurosci. *31*, 295–315.

Rebsam, A., Petros, T.J., and Mason, C.A. (2009). Switching Retinogeniculate Axon Laterality Leads to Normal Targeting but Abnormal Eye-Specific Segregation That Is Activity Dependent. J Neurosci *29*, 14855–14863.

Ren, S.-Y., Angrand, P.-O., and Rijli, F.M. (2002). Targeted insertion results in a rhombomere 2-specific Hoxa2 knockdown and ectopic activation of Hoxa1 expression. Dev. Dyn. *225*, 305–315.

Renier, N., Adams, E.L., Kirst, C., Wu, Z., Azevedo, R., Kohl, J., Autry, A.E., Kadiri, L., Venkataraju, K.U., Zhou, Y., et al. (2016). Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. Cell *0*, 1789–1802.

Renier, N., Schonewille, M., Giraudet, F., Badura, A., Tessier-Lavigne, M., Avan, P., de Zeeuw, C.I., and Chédotal, A. (2010). Genetic dissection of the function of hindbrain axonal commissures. PLoS Biol *8*, e1000325.

Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. Cell *159*, 896–910.

Sabatier, C., Plump, A.S., Le Ma, Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., Lee, E.Y.-H.P., 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.

Staiger, J.F., Bisler, S., Schleicher, A., Gass, P., Stehle, J.H., and Zilles, K. (2000). Exploration of a novel environment leads to the expression of inducible transcription factors in barrel-related columns. Neuroscience *99*, 7–16.

Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A., and Krumlauf, R. (1996). Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. Nature *384*, 630–634.

Torborg, C.L., Hansen, K.A., and Feller, M.B. (2005). High frequency, synchronized bursting drives eye-specific segregation of retinogeniculate projections. Nat Neurosci *8*, 72–78.

Trevelyan, A.J., Upton, A.L., Cordery, P.M., and Thompson, I.D. (2007). An experimentally induced duplication of retinotopic mapping within the hamster primary visual cortex. Eur. J. Neurosci. *26*, 3277–3290.

Van der Loos, H., and Woolsey, T.A. (1973). Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. Science *179*, 395–398.

Voiculescu, O., Charnay, P., and Schneider-Maunoury, S. (2000). Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. Genesis *26*, 123–126.

Waite, P.M., and Cragg, B.G. (1982). The peripheral and central changes resulting from cutting or crushing the afferent nerve supply to the whiskers. Proc. R. Soc.

Lond., B, Biol. Sci. *214*, 191–211.

Waite, P.M.E., Ho, S.M., and Henderson, T.A. (2000). Afferent ingrowth and onset of activity in the rat trigeminal nucleus. Eur. J. Neurosci. *12*, 2781–2792.

Welker, E., and Van der Loos, H. (1986). Quantitative correlation between barrel-field size and the sensory innervation of the whiskerpad: a comparative study in six strains of mice bred for different patterns of mystacial vibrissae. J Neurosci *6*, 3355–3373.

Williams, R.W., Hogan, D., and Garraghty, P.E. (1994). Target recognition and visual maps in the thalamus of achiasmatic dogs. Nature *367*, 637–639.

Woolsey, T.A., and Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. Brain Res *17*, 205–242.

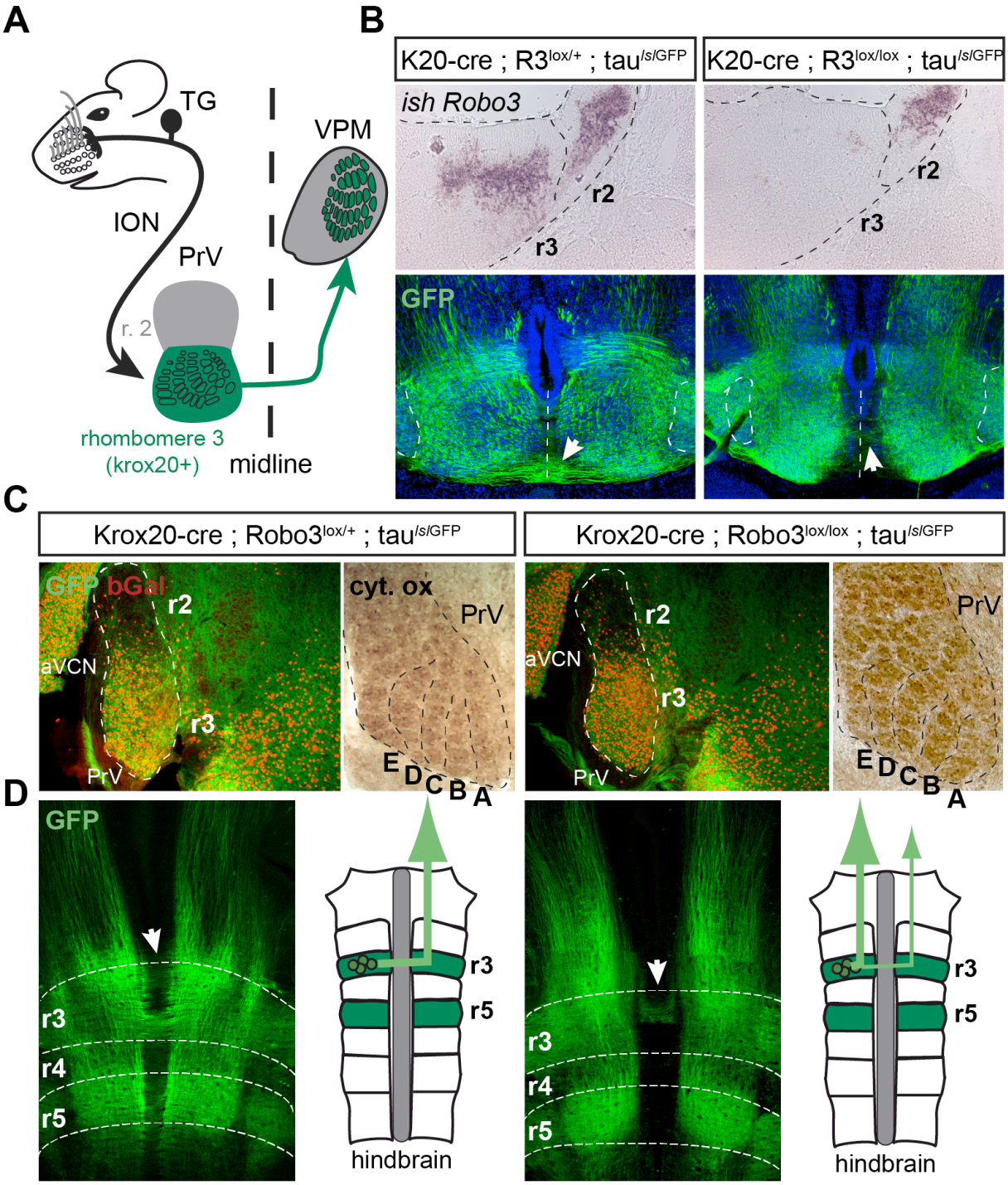

A
TG
VPM
ION
PrV
r. 2
rhombomere 3
(krox20+)
midline
B
K20-cre ; R3lox/+ ; tauls/GFP
K20-cre ; R3lox/lox ; tauls/GFP
ish Robo3
r2
r3
GFP
C
Krox20-cre ; Robo3lox/+ ; tauls/GFP
Krox20-cre ; Robo3lox/lox ; tauls/GFP
GFP bGal
r2
aVCN
r3
PrV
cyt. ox
PrV
E D C B A
D
GFP
r3
r4
r5
hindbrain

Figure 1

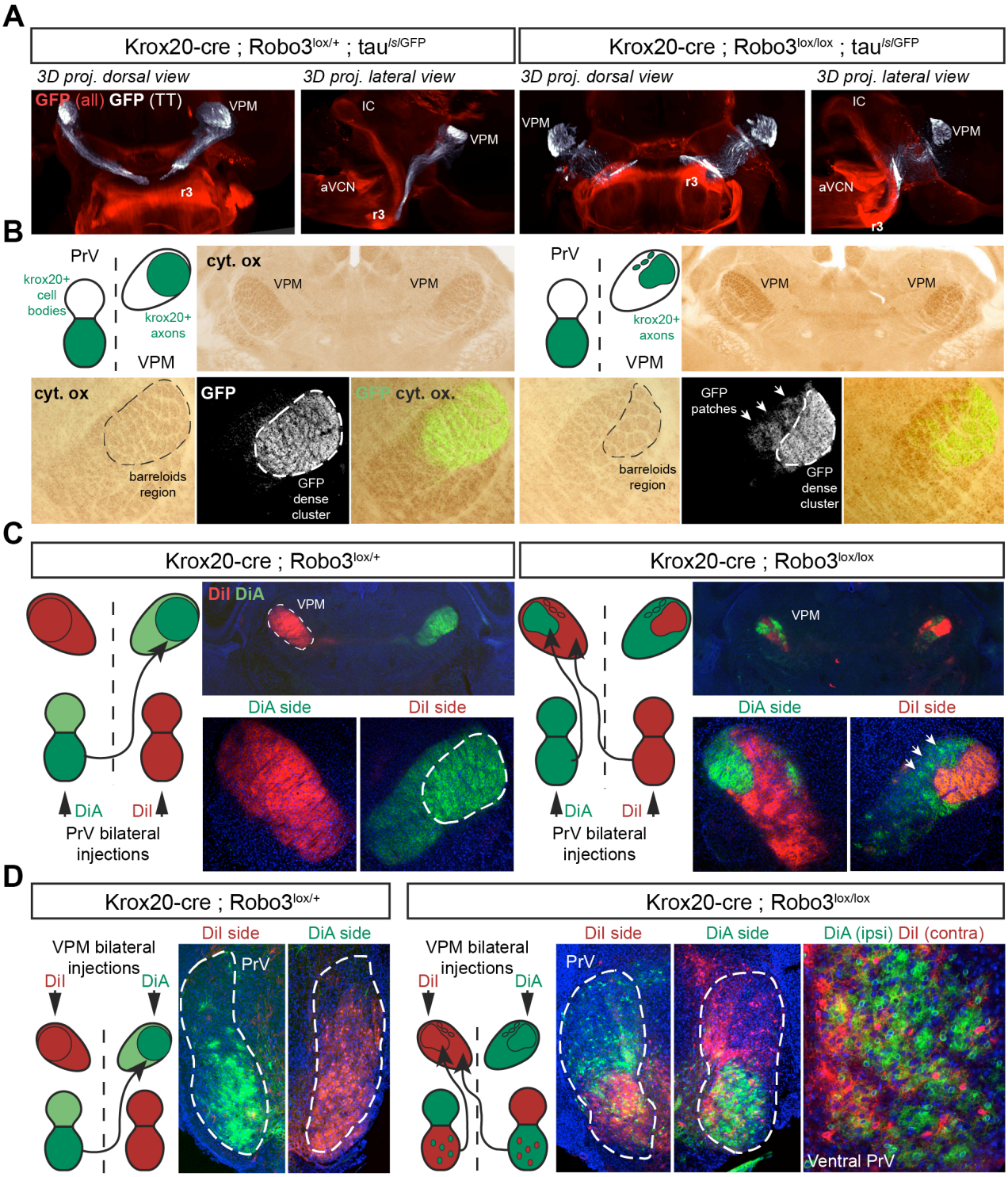

A
Krox20-cre ; Robo3lox/+ ; tauls/GFP
Krox20-cre ; Robo3lox/lox ; tauls/GFP
3D proj. dorsal view
3D proj. lateral view
3D proj. dorsal view
3D proj. lateral view
GFP (all) GFP (TT)
VPM
r3
IC
aVCN
B
PrV
krox20+ cell bodies
krox20+ axons
VPM
cyt. ox
barreloids region
GFP
GFP dense cluster
GFP cyt. ox.
GFP patches
C
Krox20-cre ; Robo3lox/+
Krox20-cre ; Robo3lox/lox
DiI DiA
DiA side
DiI side
DiA
DiI
PrV bilateral injections
D
VPM bilateral injections
DiA (ipsi) DiI (contra)
Ventral PrV

Figure 2

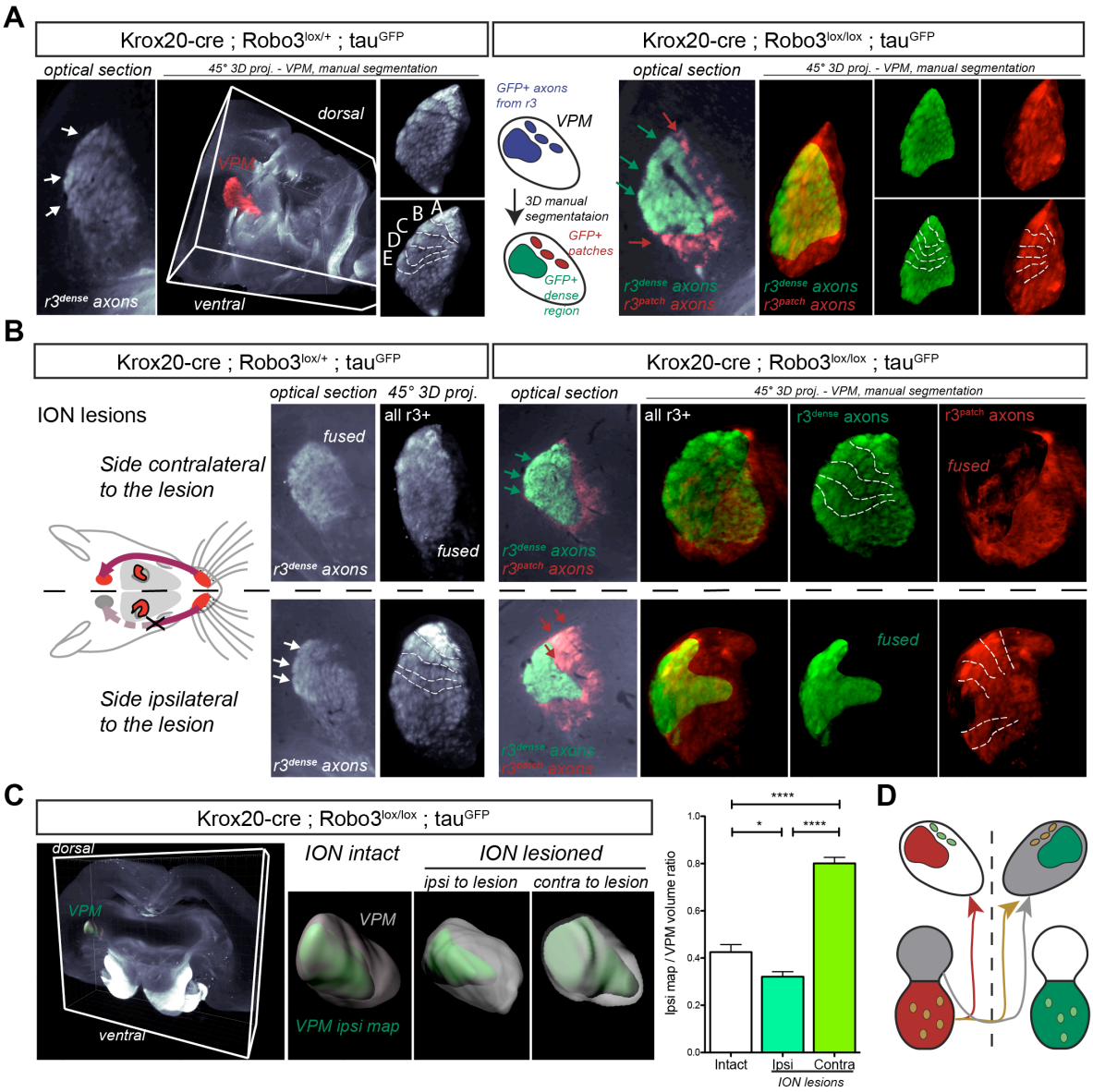

A
Krox20-cre ; Robo3lox/+ ; tauGFP
Krox20-cre ; Robo3lox/lox ; tauGFP
optical section
45° 3D proj. - VPM, manual segmentation
dorsal
VPM
ventral
r3dense axons
GFP+ axons from r3
3D manual segmentataion
GFP+ patches
GFP+ dense region
r3patch axons
B
ION lesions
Side contralateral to the lesion
Side ipsilateral to the lesion
fused
all r3+
C
ION intact
ION lesioned
ipsi to lesion
contra to lesion
VPM ipsi map
Ipsi map / VPM volume ratio
Intact
Ipsi
Contra
ION lesions
D

Figure 3

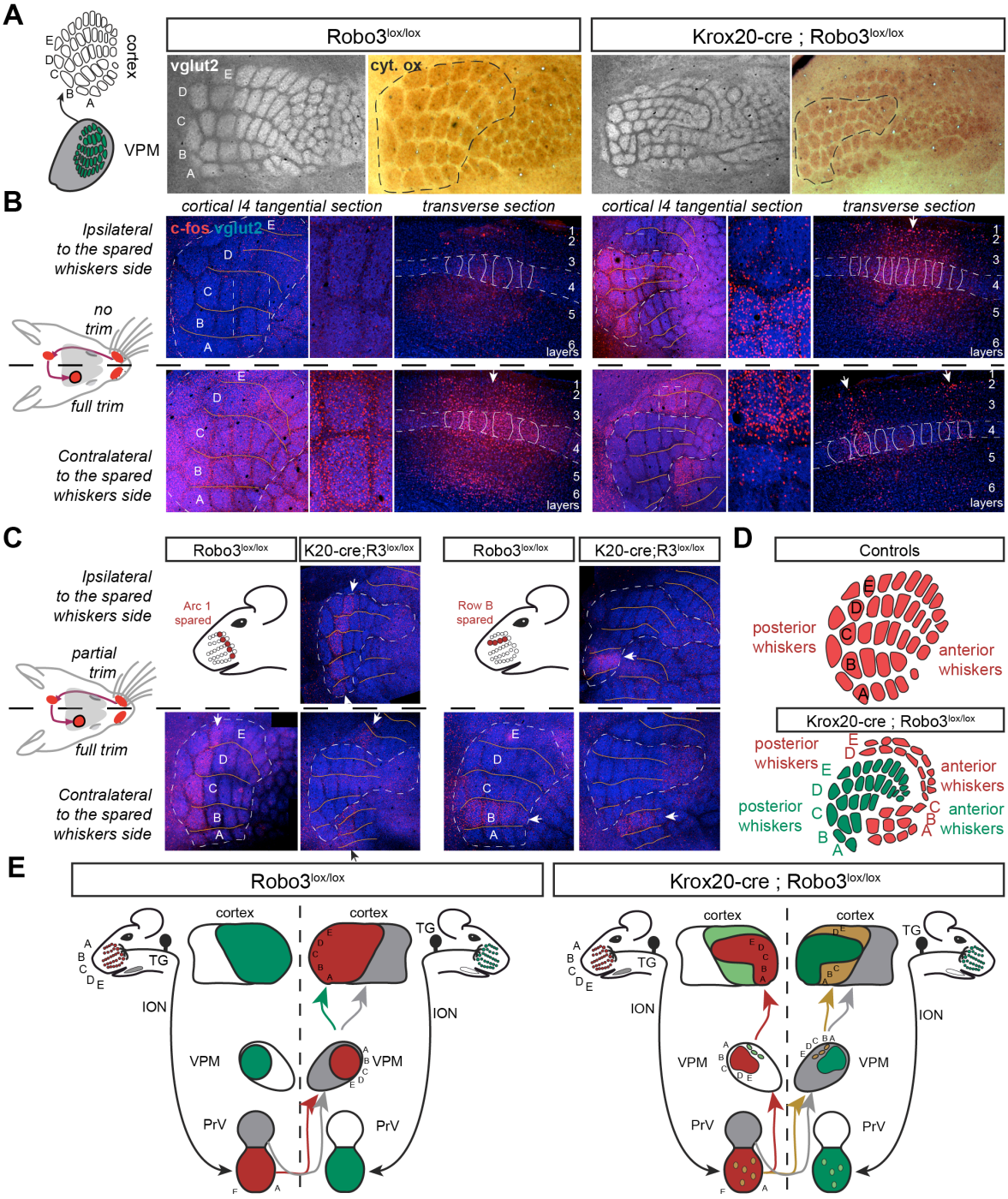

A
cortex
VPM
Robo3lox/lox
Krox20-cre ; Robo3lox/lox
vglut2
cyt. ox
B
cortical l4 tangential section
transverse section
Ipsilateral to the spared whiskers side
no trim
full trim
Contralateral to the spared whiskers side
c-fos vglut2
layers
C
Robo3lox/lox
K20-cre;R3lox/lox
Arc 1 spared
Row B spared
partial trim
D
Controls
posterior whiskers
anterior whiskers
Krox20-cre ; Robo3lox/lox
E
cortex
TG
ION
VPM
PrV

Figure 4

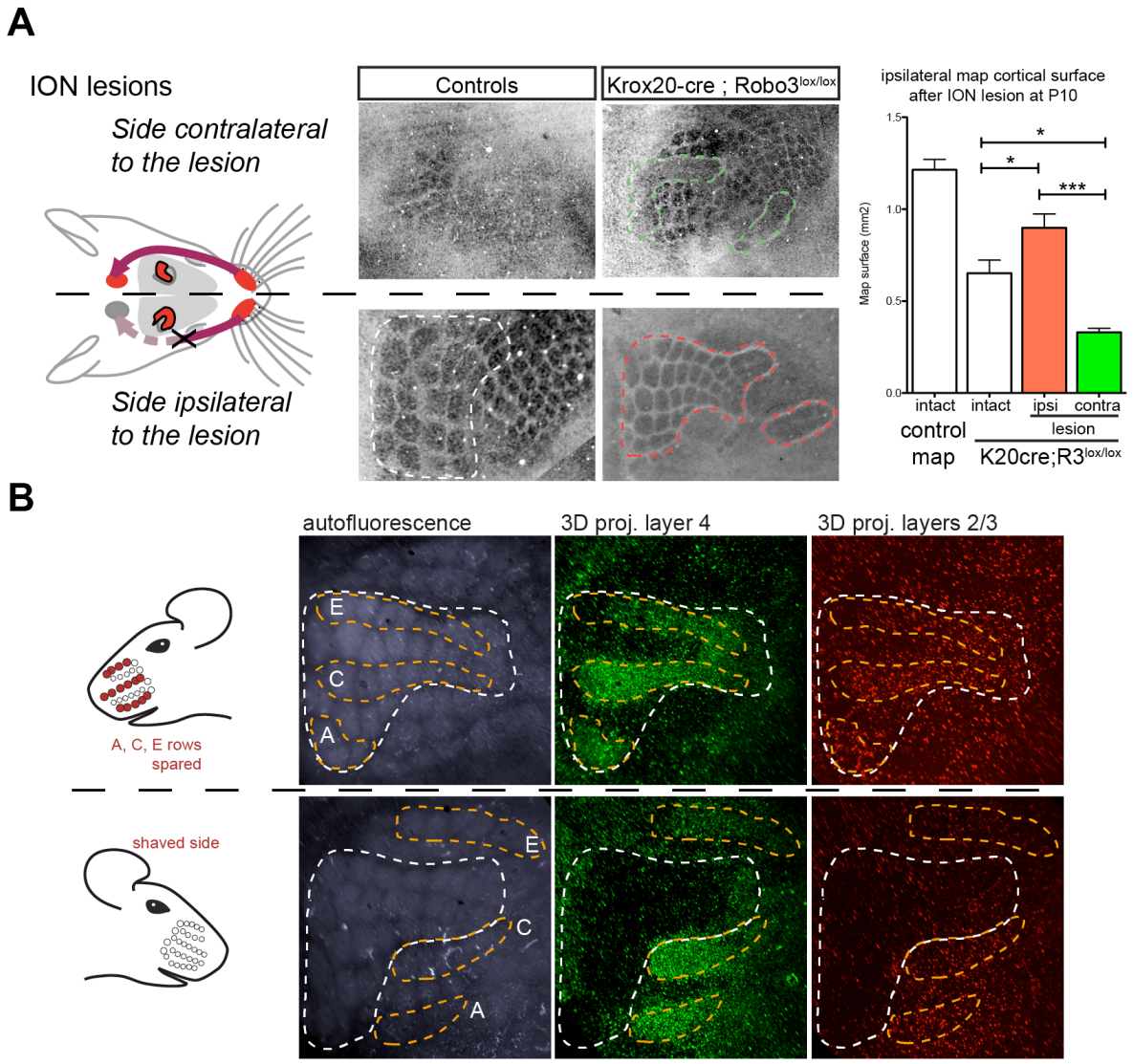

A
ION lesions
Side contralateral to the lesion
Side ipsilateral to the lesion
Controls
Krox20-cre ; Robo3lox/lox
ipsilateral map cortical surface after ION lesion at P10
Map surface (mm2)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
***
intact
intact
ipsi
contra
control map
lesion
K20cre;R3lox/lox
B
autofluorescence
3D proj. layer 4
3D proj. layers 2/3
A, C, E rows spared
shaved side
E
C
A

Figure 5

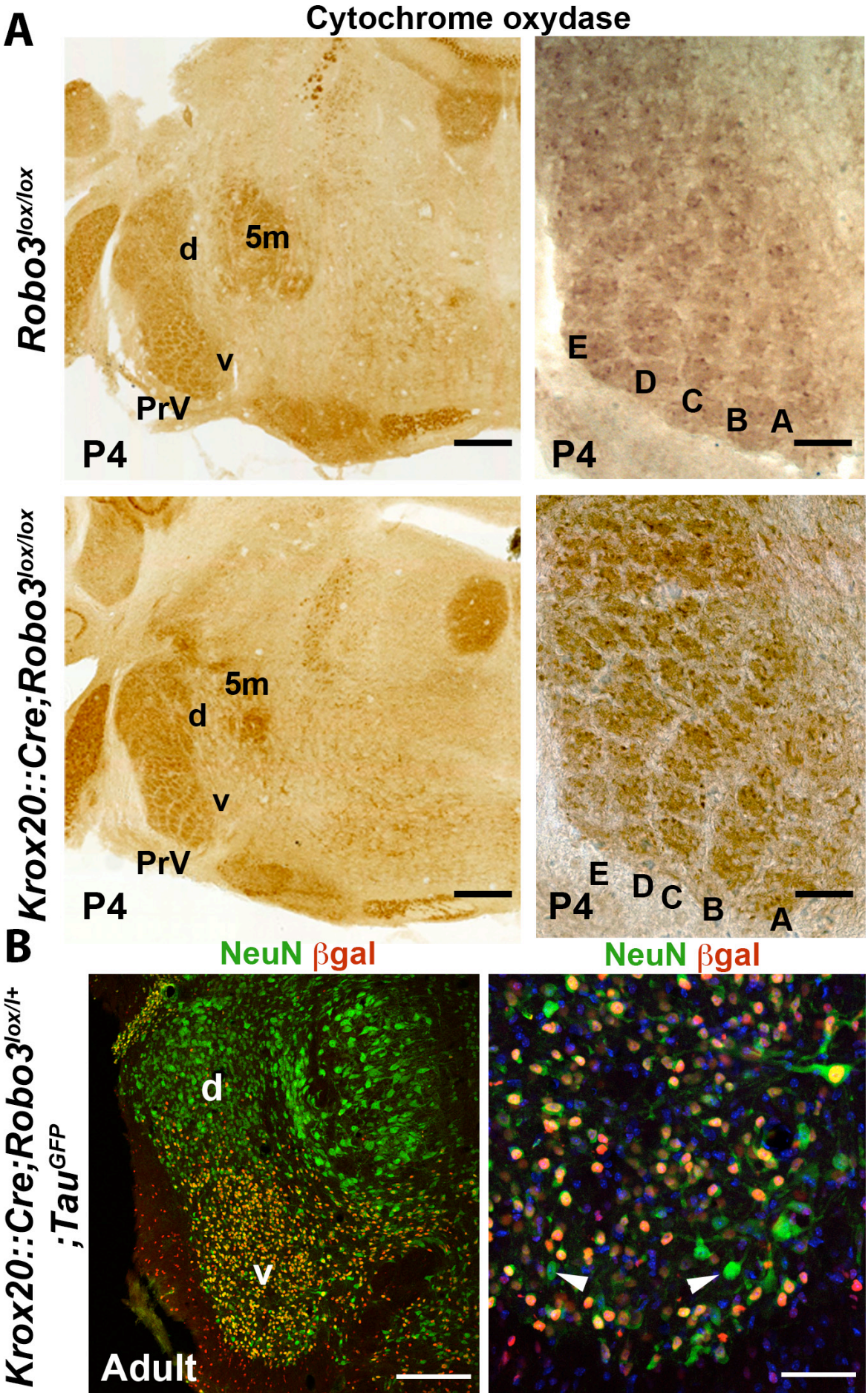

A
Cytochrome oxydase
Robo3lox/lox
d
5m
v
PrV
P4
E
D
C
B
A
P4
Krox20::Cre;Robo3lox/lox
5m
d
v
PrV
P4
E
D
C
B
A
P4
B
NeuN βgal
NeuN βgal
Krox20::Cre;Robo3lox/l+
;TauGFP
d
v
Adult

Figure S1

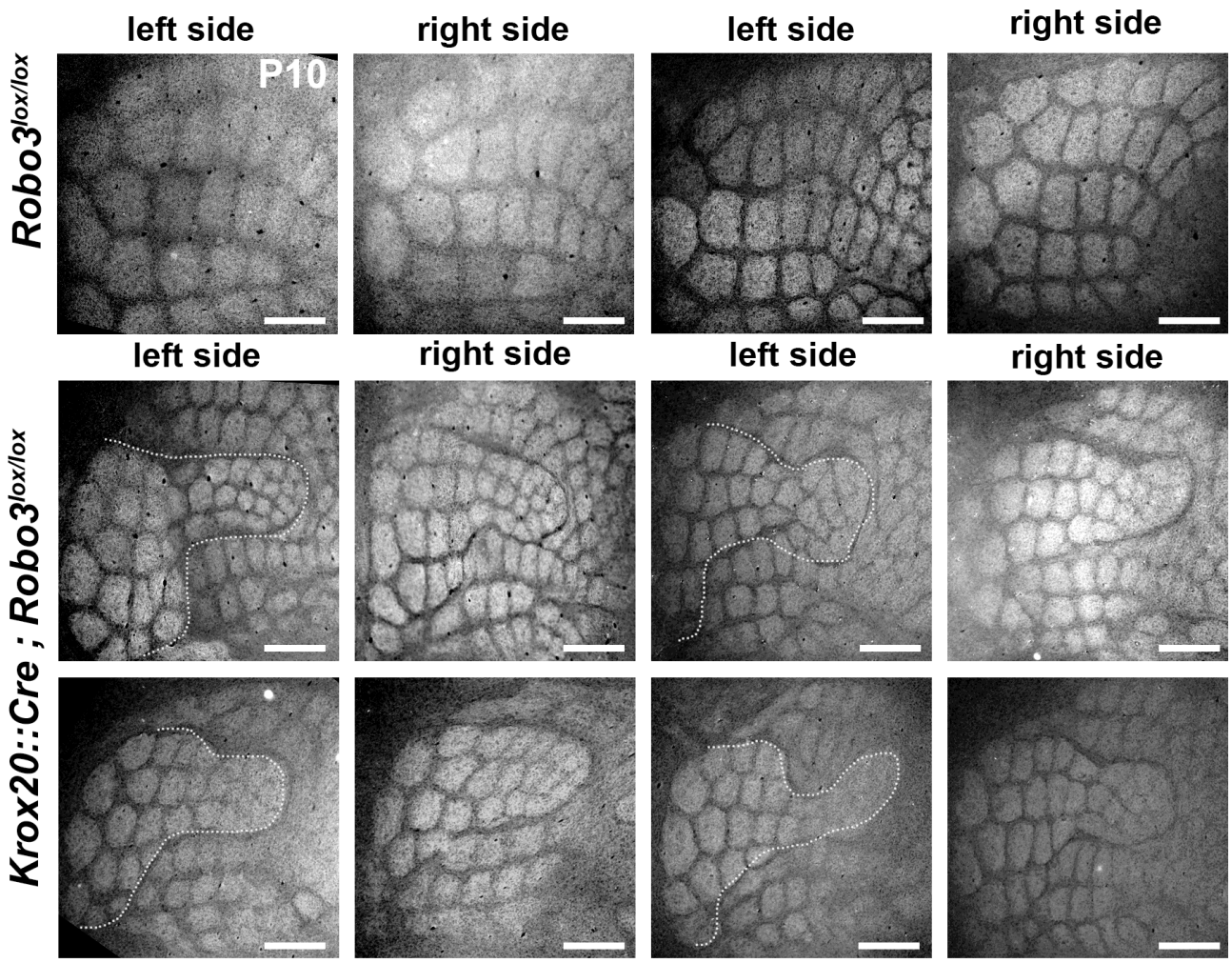

left side
right side
left side
right side
P10
Robo3lox/lox
left side
right side
left side
right side
Krox20::Cre ; Robo3lox/lox

Figure S2

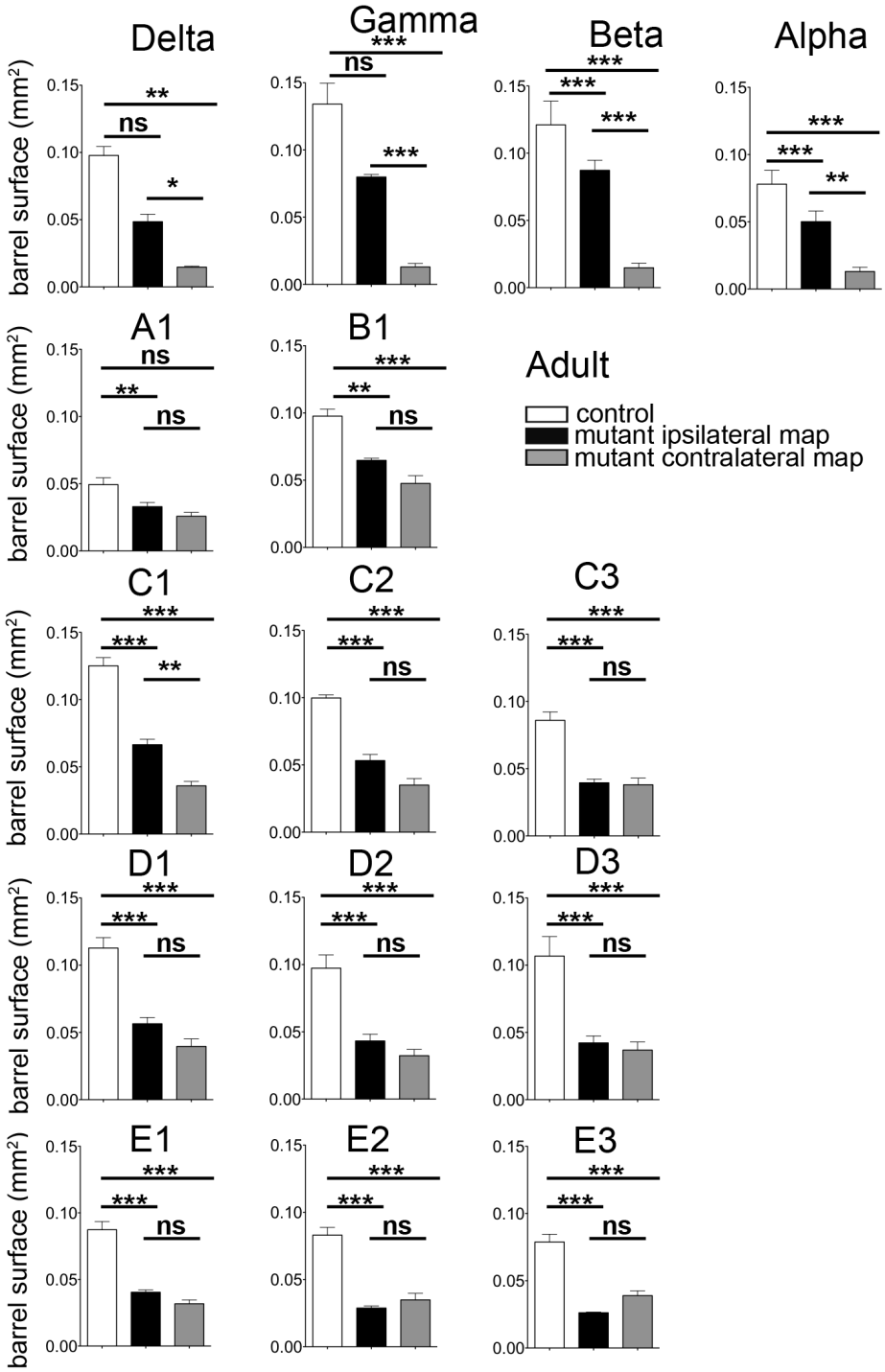

Delta
Gamma
Beta
Alpha
A1
B1
Adult
control
mutant ipsilateral map
mutant contralateral map
C1
C2
C3
D1
D2
D3
E1
E2
E3
barrel surface (mm²)
0.15
0.10
0.05
0.00
ns
*
**
***

Figure S3

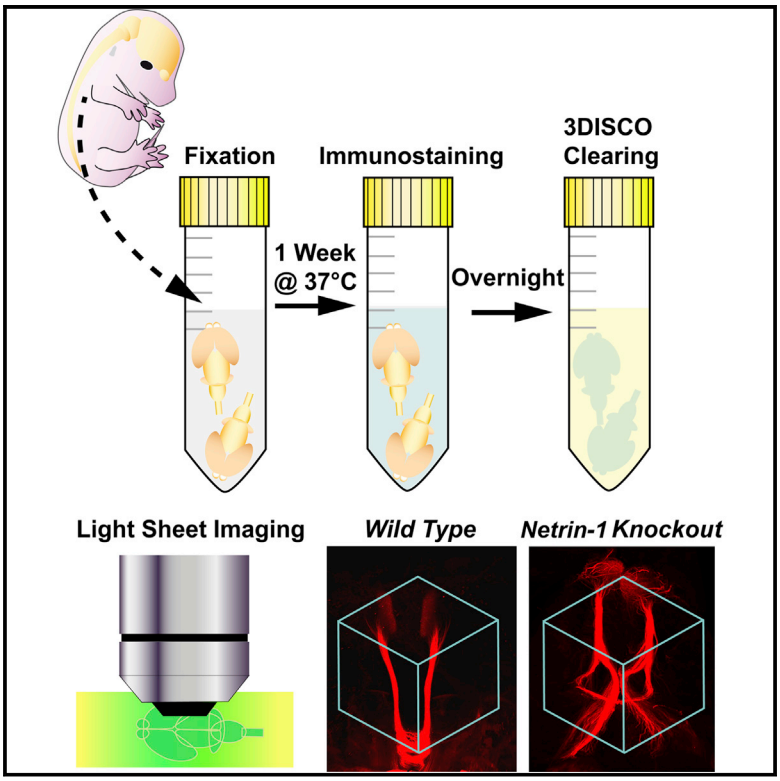
Article 4

Report

Cell Reports

A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System

Graphical Abstract



Highlights

Immunostaining and 3DISCO clearing: a powerful method for studying brain connections

3D analysis of axon guidance defects in midline mutant mice

Unexpected roles for Slits and Netrin-1 in fasciculus retroflexus development

Authors

Morgane Belle, David Godefroy, ..., Frank Bradke, Alain Chédotal

Correspondence

alain.chedotal@inserm.fr

In Brief

Clearing techniques have recently been developed to look at mouse brains, but they are complex and expensive. Belle et al. now describe a simple procedure that combines immunolabeling, solvent-based clearing, and light-sheet fluorescence microscopy. This technique allows large-scale screening of axon guidance defects and other developmental disorders in mutant mice.

Belle et al., 2014, Cell Reports 9, 1–11
November 20, 2014 ©2014 The Authors
http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037

Please cite this article in press as: Belle et al., A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System, Cell Reports (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037

Cell Reports
Report

OPEN ACCESS
CellPress

A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System

Morgane Belle,[1,2,3,5] David Godefroy,[1,2,3,5] Chloé Dominici,[1,2,3] Céline Heitz-Marchaland,[1,2,3] Pavol Zelina,[1,2,3] Farida Hellal,[4,6] Frank Bradke,[4] and Alain Chédotal[1,2,3,*]
[1]Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMRS 968, Institut de la Vision, Paris 75012, France
[2]INSERM, UMRS 968, Institut de la Vision, Paris 75012, France
[3]CNRS, UMR 7210, Paris 75012, France
[4]Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Axon Growth and Regeneration, Ludwig-Erhard-Allee 2, 53175 Bonn, Germany
[5]Co-first author
[6]Present address: Institute for Stroke and Dementia Research (ISD), Experimental Stroke Research, Max-Lebsche Platz 30, 81377 Munich, Germany
*Correspondence: alain.chedotal@inserm.fr
http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037
This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

SUMMARY

Clearing techniques have been developed to transparentize mouse brains, thereby preserving 3D structure, but their complexity has limited their use. Here, we show that immunolabeling of axonal tracts followed by optical clearing with solvents (3DISCO) and light-sheet microscopy reveals brain connectivity in mouse embryos and postnatal brains. We show that the Robo3 receptor is selectively expressed by medial habenula axons forming the fasciculus retroflexus (FR) and analyzed the development of this commissural tract in mutants of the Slit/Robo and DCC/Netrin pathways. Netrin-1 and DCC are required to attract FR axons to the midline, but the two mutants exhibit specific and heterogeneous axon guidance defects. Moreover, floor-plate-specific deletion of Slit ligands with a conditional Slit2 allele perturbs not only midline crossing by FR axons but also their anteroposterior distribution. In conclusion, this method represents a unique and powerful imaging tool to study axonal connectivity in mutant mice.

INTRODUCTION

3D imaging of solvent-cleared organ (3DISCO) is a simple solvent-based clearing method used for transparentizing the brain of adult transgenic mice expressing fluorescent proteins such as GFP (Ertürk et al., 2012a) and Alexa-conjugated axonal tracers (Ertürk et al., 2012a, 2012b). In combination with light-sheet fluorescence microscopy (LSM), 3DISCO allows one to quickly generate 3D images of axonal tracts (Dodt et al., 2007; Ertürk et al., 2012a, 2012b). However, the fluorescence of GFP and related proteins rapidly vanishes after clearing. A handful of clearing methods using solvent-free reagents have since been described with which the fluorescence is better preserved (Chung et al., 2013; Hama et al., 2011; Ke et al., 2013; Susaki et al., 2014; Yang et al., 2014), but they are more complex technically. Clearing takes several days or even weeks and requires large volumes of expensive reagents, such as polymers, that impregnate the samples. Moreover, the number of fluorescent mouse lines that have been validated with these methods is still limited (in most cases, only Thy1-YFP transgenic lines were tested), and in any case, using them to study axonal projections in mutant mice would require time-consuming intercrosses. Therefore, we reasoned that there was still a need for simple, rapid, and inexpensive methods to clear and image brain samples.

We first thought that performing whole-mount immunostaining prior to clearing could be a good strategy, as this would alleviate the use of fluorescent reporters. Immunostaining is compatible with clarity (Chung et al., 2013), CUBIC (Susaki et al., 2014), and PACT (Yang et al., 2014) but is performed after clearing and therefore lengthens these procedures. We show here that 3DISCO clearing can be performed after whole-mount immunostaining on embryo or postnatal brain and preserves the activity of fluorescent dyes for several months. We also show that Robo3, a receptor of the roundabout family (Sabatier et al., 2004), is a unique marker of medial habenula (mHb) axons, which extend through the fasciculus retroflexus (FR) to the interpeduncular nucleus (IPN; Beretta et al., 2012). The FR exists in all vertebrate embryos (Figdor and Stern, 1993) and primarily targets the IPN, an unpaired structure extending across the ventral midline at the midbrain/hindbrain boundary (Beretta et al., 2012). FR axons pathfinding in the thalamus is controlled by Sema3F/Neuropilin-2 repulsion (Chen et al., 2000; Sahay et al., 2003). In vertebrates, the behavior of FR axons at the ventral midline is rather unique, as they cross it multiple times (Ramon y Cajal, 1911; Bianco et al., 2008; Iwahori et al., 1993). Surprisingly, the role of guidance cues such as Slits and Netrin-1 in midline crossing of FR axons had not been studied.

Please cite this article in press as: Belle et al., A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System, Cell Reports (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037

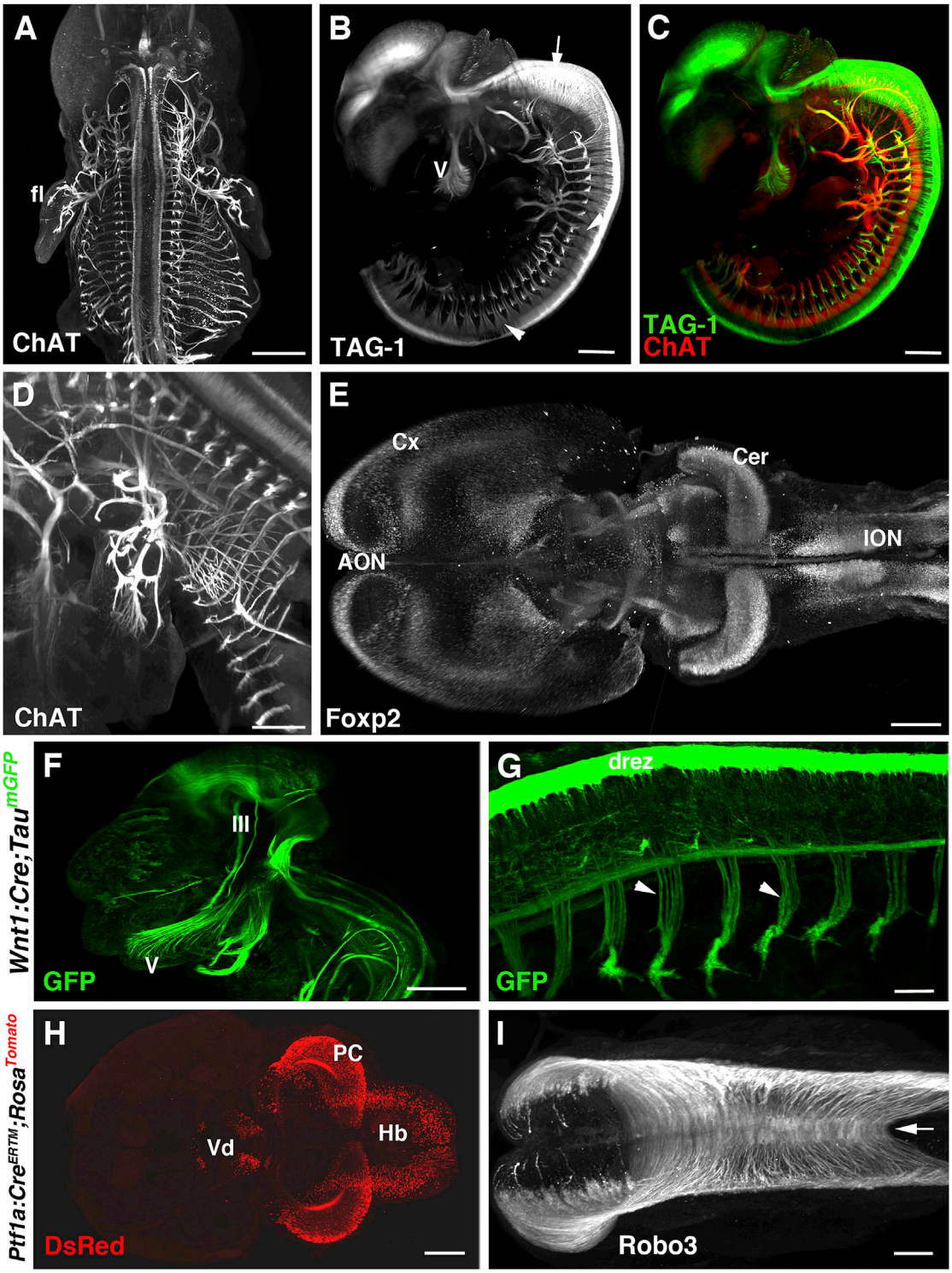


Figure 1. Immunolabeling and 3DISCO Clearing of E11–E13 Embryos

(A–D) E12 mouse embryos labeled with anti-ChAT (A, C, and D) and anti-TAG-1 (B and C) antibodies. (A) Ventral view of the spinal cord motor columns and the motor projections in the rib cage and forelimbs (fl). (B and C) Side view. TAG-1 (B) labels sensory projections in the periphery, such as the trigeminal nerve (V) and dorsal root ganglia (arrowheads), and commissural axons in the hindbrain and spinal cord (arrow). (C) Overlay of ChAT and TAG-1 immunostaining. (D) High magnification of motor innervation in the forelimb.

(E) Ventral view of the brain of an E13 embryo labeled with anti-Foxp2 antibodies. The entire expression pattern of FoxP2+ neurons can be observed in a single brain. Foxp2 is highly expressed in the inferior olivary nucleus (ION), Purkinje cells in the cerebellum (Cer), neocortex (Cx), and anterior olfactory nucleus (AON).

(legend continued on next page)

RESULTS

Immunolabeling of Mouse Embryos Is Compatible with 3DISCO Clearing

First, we tested the technique on embryonic day 12 (E12)–E14 mouse embryos immunostained with antibodies against choline acetyl transferase (ChAT) to label motor projections and transient axonal glycoprotein 1 (TAG-1/Contactin-2), which is expressed by many axons (Yamamoto et al., 1986), including sensory ganglia axons (Figures 1A–1D). The precise 3D pattern of motor and sensory projections could be visualized, including oculomotor nerves and limb innervation (Movies S1, S2, and S3). Postacquisition treatments using Imaris allowed us to obtain high-resolution images of regions of interest. The samples, or part of it, such as a limb (Figure 1D; Movie S4), could be optically sliced in all orientations, thereby allowing one to generate classic sagittal, horizontal, and coronal sections with a single embryo. Next, we used anti-FoxP2 (forkhead box P2) antibody, which recognizes a transcription factor expressed by neurons in multiple brain areas (Ferland et al., 2003; Fujita and Sugihara, 2012). The comprehensive distribution of FoxP2 immunoreactive nuclei was revealed (Figure 1E). Notably, automatic 3D counting of the number of FoxP2+ neurons could also be done (data not shown).

Transgenic mice expressing fluorescent proteins are increasingly used to study axonal circuits and gene expression patterns. To determine if the quenching of fluorescent proteins after 3DISCO could be overcome by antibody staining, we performed anti-GFP staining. *Tau-lox-Stop-lox-mGFP-IRES-nls-lacZ* mice (*Tau*^{mGFP}), which express a membrane-tethered GFP in axons following Cre-mediated recombination (Hippenmeyer et al., 2005), were crossed with *Wnt1:Cre* mice. In this line, Cre recombinase is targeted to some hindbrain and spinal cord commissural neurons and sensory ganglia (Danielian et al., 1997). In E11.5 *Wnt1:Cre;Tau*^{GFP} embryos, GFP-immunoreactive axons could be followed throughout the CNS and peripheral nervous system (Figures 1F and 1G; Figure S1A; Movies S5 and S6). Likewise, anti-dsRed immunostaining was performed on E14 *Ptf1a:Cre*^{ERTM}*;Rosa26*^{dTomato} embryos that had received tamoxifen at E12.5. In this line, Cre is activated upon tamoxifen injection in subsets of neurons in the CNS (Kopinke et al., 2012), and this induces the expression of a red fluorescent protein from the Tomato transgene inserted into the ubiquitous *Rosa* locus (Madisen et al., 2010). After anti-dsRed immunostaining and clearing, the distribution of Tomato-positive neurons, derived from Ptf1a+ progenitors, could be observed, including Purkinje cells in the cerebellum (Figure 1H). This showed that 3DISCO, in combination with immunostaining, can bypass the problem of native fluorescence instability. Last, we performed immunostaining against Robo3, a transmembrane receptor of the roundabout family, transiently expressed by commissural axons in the mouse hindbrain and spinal cord (Marillat et al., 2002; Sabatier et al., 2004). In the E11 spinal cord, the whole array of commissural axons crossing the floor plate was observed in the spinal cord and hindbrain (Figure 1I; Figure S1B; Movies S7 and S8).

Robo3 Is a Selective Marker of the Fasciculus Retroflexus

We next performed whole-mount anti-TAG1 immunostaining on E16 brain and could observe that the 3D framework of TAG-1+ axons such as the lateral olfactory tract, anterior commissure, and commissural axons in the hindbrain (Figure 2A). By contrast, at E16, Robo3 was still detected in the hindbrain, such as in late-migrating pontine neurons, but it was absent from the forebrain (Figure 2B; Movie S9). Surprisingly, only the FR was immunoreactive for Robo3 in the diencephalon (Figures 2B–2E). Robo3 was only expressed in the mHb, as previously described (Quina et al., 2009; Schmidt et al., 2014; data not shown). FR axons cross multiple times and zigzag at the ventral midline (Ramon y Cajal, 1911; Iwahori et al., 1993 ; Bianco et al., 2008). This feature was seen on 3D images and following optical slicing (Figure 2E; Movie S10). The presence of Robo3 in E16 FR axons, which reach the ventral midline around E13–E14 (Funato et al., 2000), was unexpected, as this receptor is usually downregulated in postcrossing axons (Marillat et al., 2002; Sabatier et al., 2004). Tissues shrink after clearing with 3DISCO (Ertürk and Bradke, 2013), but the FR length (Figure S1C) was similar between E16 brains (862.9 μm ± 10.5 SEM; n = 20 E16 brains; p = 0.93; one-sample t test). It was also equivalent between the right (867.1 μm ± 14.8 SEM) and left (858.7 μm ± 15.3 SEM; p = 0.34; paired t test) side. This demonstrates that the shrinkage is homothetic and that comparing relative dimensions between cases is possible. Although LSM is the most rapid and efficient method to image cleared samples (see also Tomer et al., 2014), confocal microcopy could be used (Figure S1D). Lastly, the same sample could be imaged several times without significant quenching of the fluorescence, which was only slightly diminished 6 months after clearing (Figure S1E). We next attempted to perform whole–mount Robo3 immunostaining and 3DISCO clearing on postnatal brain (postnatal day 0 [P0] and P5). This revealed that FR axons still expressed high levels of Robo3 and that no other tracts were labeled in the CNS (Figures 2F–2H). However, Robo3 was not expressed in the adult mHb (data not shown). The FR could also be stained with antibodies against the netrin-1 receptor deleted in colorectal cancer (DCC) and TAG-1 (Figures 2J and 2K; Figure S1F), as previously shown (Wolfer et al., 1994; Yamamoto et al., 1986; Funato et al., 2000; Schmidt et al., 2014). Therefore, we next studied FR structure in a collection of knockout mice for axon guidance molecules involved in midline crossing.

(F and G) Side views of an E11.5 *Wnt1:Cre;Tau*^{mGFP} embryo labeled with anti-GFP. The oculomotor nerve (III) and trigeminal axons (V) are seen in (F). (G) High magnification of the spinal cord showing axons from dorsal root ganglia neurons (arrowheads) and the dorsal root entry zone (drez).

(H) Dorsal view of the brain an E14 *Ptf1a:Cre*^{ERTM}*;Rosa*^{Tomato} embryo injected with tamoxifen at E12.5 and immunostained with anti-dsRed. The distribution of Tomato+ neurons originating from E12.5 Ptf1a+ progenitors is seen, including a subset of cerebellar Purkinje cells (PC), cells in the hindbrain (Hb), and ventral diencephalon (Vd).

(I) Dorsal view of the spinal cord of an E11 mouse embryo stained with anti-Robo3 antibodies. The commissural axons are seen crossing the floor plate (arrow). Scale bars represent 100 μm (I), 150 μm (G), 200 μm (D), 300 μm (E and H), 400 μm (A–C), and 600 μm (F).

Please cite this article in press as: Belle et al., A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System, Cell Reports (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037

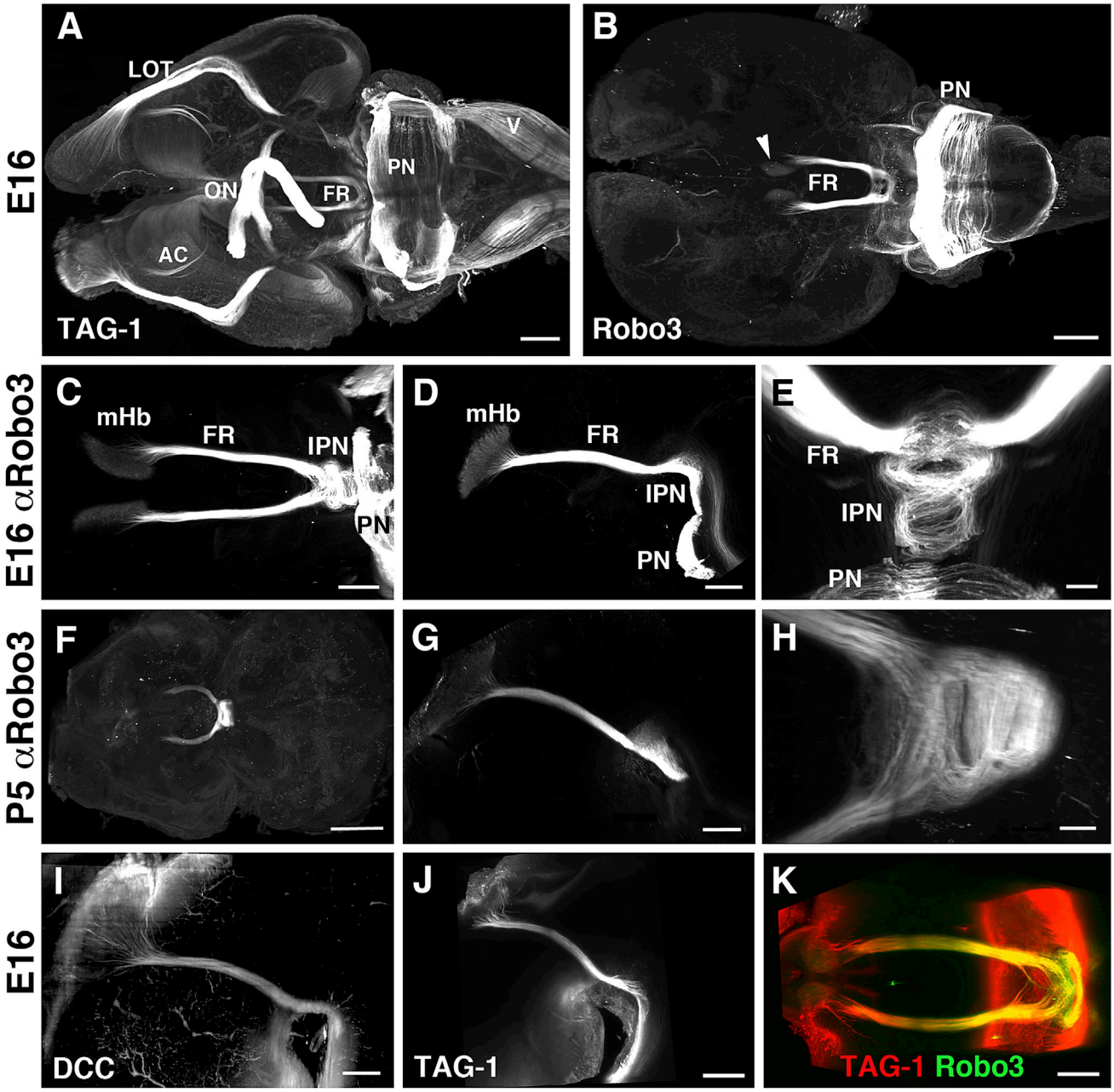


Figure 2. Robo3 Labeling and 3DISCO Clearing Is a Unique Tool to Study the Development of the Fasciculus Retroflexus

(A) Ventral view of an E16 brain stained with anti-TAG-1. TAG-1 is expressed in the lateral olfactory tract (LOT), anterior commissure (AC), optic nerve (ON), fasciculus retroflexus (FR), pontine neurons (PN), and trigeminal axons (V).

(B) Ventral view of an E16 brain stained with anti-Robo3. Migrating pontine neurons (PN) are seen in the hindbrain, and only the FR is labeled in the diencephalon. The arrowhead indicates the medial habenula.

(C–E) Robo3 immunostaining of the FR of an E16 embryo in ventral (C), lateral (D), and caudal (E) views. Axons from the medial habenula (mHb) project via the FR to the interpeduncular nucleus (IPN). Pontine neurons (PN) also express Robo3.

(F–H) Robo3 immunostaining on a P5 brain. The FR is the only tract labeled. Dorsal view (F), lateral view (G), and higher magnification of the IPN level (H) are shown.

(I–K) Lateral (I and J) and dorsal (K) views of the FR of E16 embryos labeled with antibodies against DCC (I), TAG-1 (J), or TAG-1 and Robo3 (K). Note in (K) that FR axons coexpress TAG-1 and Robo3.

Scale bars represent 50 μm (E), 100 μm (K), 150 μm (I), 200 μm (C, D, G, and J), 300 μm (A), and 500 μm (B, F, and H).

3D Analysis of the Development of the FR in Midline Guidance Mutants

Previous studies showed that Netrin-1 attracts FR axons and that the FR is disorganized in *Netrin-1* and *DCC* mutants (Funato et al., 2000; Schmidt et al., 2014). However, the phenotypic analysis of *Netrin-1/DCC* knockout embryos was done on cryostat sections that only provide an incomplete visualization of the guidance defects. Robo3 immunostaining and 3DISCO clearing revealed that the FR was severely perturbed in E16 *DCC* and *Netrin-1* knockout embryos (n = 8 and n = 6, respectively). Interestingly, this method allowed us to compare FR axonal defects between cases and score embryos as done in invertebrate species and zebrafish. In each case, the position and orientation of all the Robo3+ fascicles was determined.

In all *DCC* knockout embryos (n = 8/8), a large axonal bundle projected rostrally from the mHb instead of caudally and a second one grew along the normal pathway to the IPN level (Figures 3D–3I; Movie S11). These axons passed the IPN and extended along the midline. Floor plate crossing was severely reduced in all cases, although a few axons still crossed in six of eight cases (Figure 3F; Figures S2D and S2E). In five of the eight embryos, a small tract projected dorsally from the mHb and aberrant crossing of the dorsal midline at the level of the mHb was observed. Overall, the embryos could be grouped in two main categories (containing five and three embryos, respectively) based on their combination of axonal defects.

Next we studied *Netrin-1* knockout embryos (Figures 3J–3O). The spectrum of Robo3+ FR axon guidance defects was distinct from *DCC* knockouts. Compared to a single tract in wild-type (n = 5/5) and *Netrin-1*$^{+/-}$ (n = 7/7) embryos, the mHb projections were strongly defasciculated in *Netrin-1*$^{-/-}$ embryos (n = 6/6), but cases were heterogeneous. In five out of six *Netrin-1*$^{-/-}$ embryos, a fascicle failed to grow toward the midline and projected caudally from the mHb, and in two out of six cases, a small tract extended rostrally from the mHb (Figures 3J–3O; Movie S12). Like in *DCC* knockouts, dorsal midline crossing was observed (four out of six cases; Figures S2B and S2C). All other axons extended along the normal FR pathway, but one or two large fascicles left the main tract dorsally before the IPN. The remaining axons reached the IPN and formed a commissure (six out of six embryos) from which a few axons extend pass the IPN parallel to the ventral midline (two out of six). In a single embryo (Figures 3M–3O), a fascicle of axons extended ventrorostrally instead of caudally when approaching the IPN. These data show that although a pattern of FR axon guidance defects could established, their combination was almost unique to each embryo. This confirms that Netrin-1 and DCC play a major role in FR axon guidance but indicates that their role is not limited to floor plate crossing.

Habenula neurons and FR axons express Robo1 and Robo2 receptors and Slit ligands (Marillat et al., 2002; Schmidt et al., 2014), but the consequence of *Slit* or *Robo* loss of function on FR development had not been studied. Therefore, we applied our clearing procedure to the analysis of FR organization in *Slit* and *Robo* mutants. In *Robo*$^{-/-}$;*Robo*$^{-/-}$ double knockouts (n = 6), FR axons formed a single tract and reached the IPN (Figures 4A–4C; Movie S13), where they defasciculated into smaller bundles. Some axons crossed the midline, but many remained on the ipsilateral side without extending further caudally (n = 6/6). In only one embryo, a few axons crossed the dorsal midline at the level of the mHb (data not shown). Next, we used anti-Tag1 immunostaining to study the organization of FR projections in *Robo3* knockouts (n = 3). FR axons extended to the IPN level and crossed the floor plate (Figures 4D–4F; Movie S14), but they next turned back toward the midline and coalesced at the midline. Together, the FR wiring defects in *Robo* mutants were unexpected and distinct from what has been described for other commissural tracts (see Discussion). We next studied various combinations of *Slit* knockouts, including a conditional *Slit2*^{lox} allele. To delete Slit2 from the floor plate, *Slit2*^{lox} mice were crossed to the *Shh:Cre* line, in which Cre is highly expressed throughout the floor plate. In *Slit1*$^{-/-}$ knockouts (n = 1) and single and compound heterozygous controls (n = 3), Robo3+ FR axons projected as in wild-type embryos (Figures 4G–4I and data not shown). However, severe midline crossing defects were observed in *Shh:Cre;Slit1*$^{-/-}$;*Slit2*$^{lox/lox}$ and *Shh:Cre;Slit1*$^{-/-}$;*Slit2*$^{lox/lox}$;*Slit3*$^{-/-}$ embryos (n = 2 for each genotype). In both mutants, FR axons projected to the IPN, but their growth at the midline was perturbed. In *Shh:Cre;Slit1*$^{-/-}$;*Slit2*$^{lox/lox}$ embryos, FR axons defasciculated at the IPN level but then followed the floor plate in both directions (Figures 4J–4K; Movie S15) toward the diencephalon or hindbrain. In *Shh:Cre;Slit1*$^{-/-}$;*Slit2*$^{lox/lox}$;*Slit3*$^{-/-}$ embryos, each FR divided into two branches that crossed the midline and joined axons from the contralateral FR to form two commissures. In addition, a bundle of axons escaped the anterior commissure to grow along the ventral midline (Figure 4O; Movie S16). Together, these results show that 3DISCO clearing after whole-mount immunostaining reveals unexpected axonal defect in midline mutants.

DISCUSSION

Whole-Mount Immunostaining and 3DISCO Clearing: An Optimal Recipe for Studying Brain Connectivity?

Embryos from most invertebrate species, such as *Drosophila* or *C. elegans*, or some vertebrates, including zebrafish or *Xenopus*, are optically transparent. Therefore, one can visualize and reconstruct entirely axonal tracts and their arborization using specific transgenes or whole-mount immunostaining. This has facilitated the phenotypic characterization of axon guidance mutants and large-scale genetic screens (Baier et al., 1996; Kolodkin et al., 1993; Seeger et al., 1993; Zallen et al., 1998). By contrast, mammalian embryos and postnatal brains are opaque and current imaging techniques mostly restrict the 3D analysis of axonal connections to young embryos or brain samples at immature stages. Older brains need to be cut, which is time consuming and only provides fragmentary information on brain connectivity. Serial electron microscopy was used to reconstruct neuronal networks in small pieces of tissue (Helmstaedter et al., 2013), but the technique is still in its infancy and inaccessible to most laboratories. Using it for genetic screens or to assess interspecimen variability would also be extremely challenging.

A few forward genetic screens for axon guidance mutants have been performed in mice using N-ethyl-N- nitrosourea mutagenesis (Lewcock et al., 2007; Merte et al., 2010) but restricted to E11.5–E12.5 embryos. We show here that our imaging method is

Please cite this article in press as: Belle et al., A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System, Cell Reports (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037

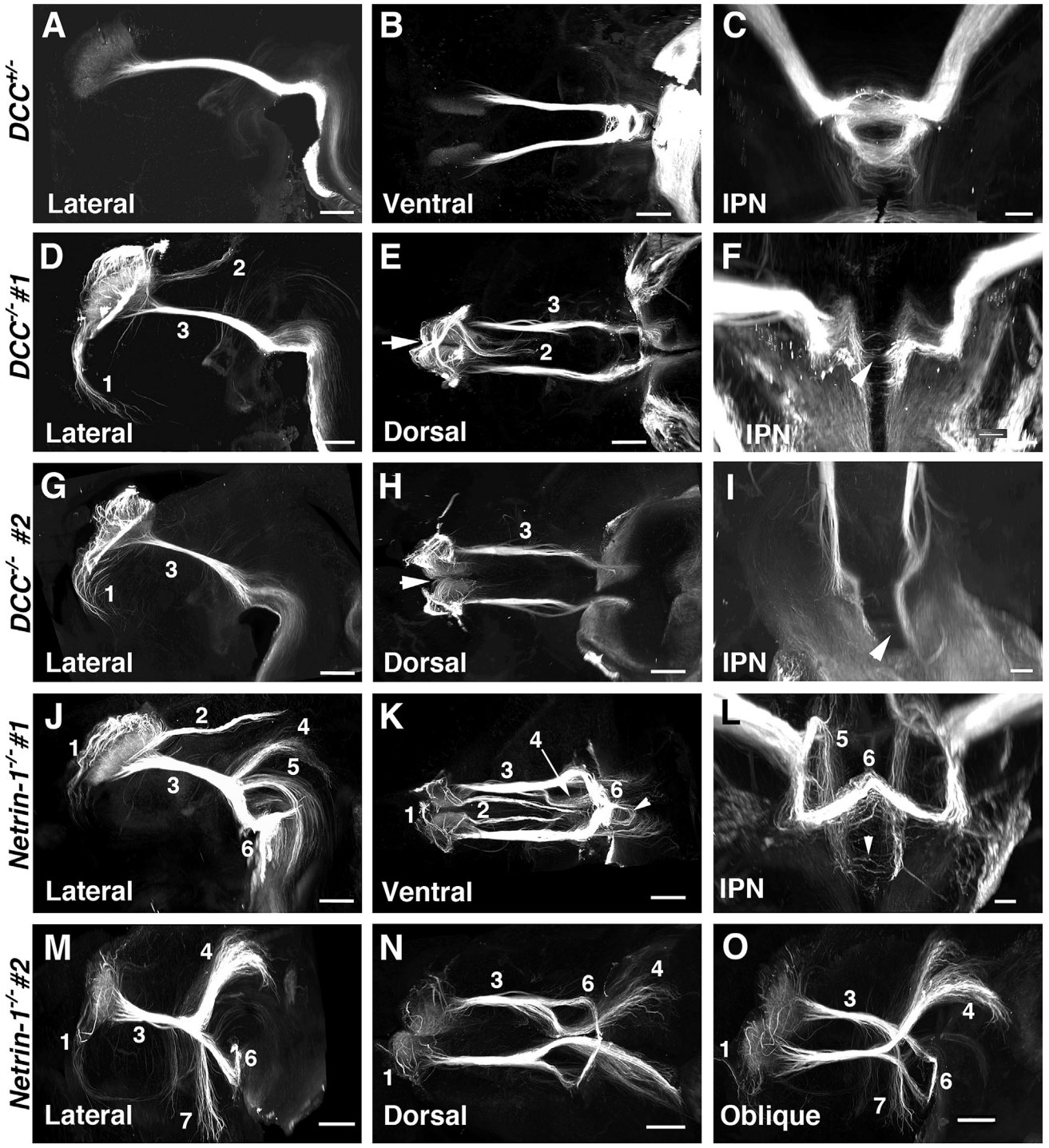


Figure 3. Diversity of FR Axon Guidance Defects in *Netrin-1* and *DCC* Knockouts

Robo3 immunostaining and 3DISCO clearing on E16 $DCC^{+/-}$ (A–C), $DCC^{-/-}$ (D–I), $Netrin\text{-}1^{-/-}$ (J–O) embryos imaged by LSM. Lateral, oblique, ventral, and dorsal views and caudal views at the IPN level (IPN) are shown.

(A–C) Normal FR in a $DCC^{+/-}$ embryo.

(D–F) Organization of FR axons in one $DCC^{-/-}$ mutant (#1). An abnormal tract develops rostrally (1) and another one caudally (2). Other FR axons (3) reach the IPN, but only a few cross the midline (arrowhead in F). Note that many axons cross the dorsal midline at the level of the habenula (arrowhead in E).

(G–I) FR defects in another $DCC^{-/-}$ embryo (#2). The rostral tract is also present (1). Other FR axons reach the IPN (3) but fail to cross the midline (arrowhead in I). Axons do not cross the dorsal midline (arrowhead in H).

(legend continued on next page)

fast, inexpensive, and scalable enough for processing a large number of embryos. Moreover, it is compatible with multiple labeling and therefore several types of axonal tracts can be stained in a single embryo. The procedure is technically simple and does not require any specific device (perfusion is not even needed). Another main advantage of this immunostaining/clearing procedure over existing ones is its low cost (about 10 Euros [€] per sample, including 3€ of antibodies and only 3.5€ of clearing solutions), which can be reduced if several embryos are processed simultaneously. Last, brains and embryos can be stored for weeks before staining and after clearing. As with every immunohistochemical procedure, the staining protocol will have to be optimized for each antibody and specific needs. Our work also confirms that LSM is a very powerful imaging technique for 3D analysis of brain connectivity.

Unique Features of Midline Guidance in the Habenular System

The habenular complex is an important relay between the limbic forebrain and caudal brain nuclei, in particular monoaminergic ones (Herkenham and Nauta, 1979; Hikosaka, 2010). The medial habenula project mostly to the IPN (Kuhar et al., 1975) and plays a role in nicotine intake (Fowler et al., 2011) and anxiety (Yamaguchi et al., 2013), among other emotional behaviors. The habenula has fascinated neuroatomists for being an asymmetric brain structure in most vertebrate species, excepting mammals. This lateralization (in size, neurotransmitter content, and connectivity) is most obvious in anamniotes, including fish (Amo et al., 2010). In zebrafish, the axons from both sides cross the midline multiple times in a different pattern depending on their lateral origin in the dorsal habenula (Bianco et al., 2008). This unusual, and seemingly unique, midline recrossing behavior was also described in mammals (Ramon y Cajal, 1911; Iwahori et al., 1993). This raised the question of the underlying axon guidance mechanisms, as in other commissural systems, midline recrossing is prevented (Chédotal, 2011). We show here that Slit/Robo signaling plays a major role in the control of midline recrossing. Although FR pathfinding to the midline is not affected in *Robo1/2, Robo3* knockouts or in mice lacking all Slit expression at the floor plate, their final arborization is severely perturbed. Midline recrossing is strongly reduced in *Robo1/2* double knockouts. This is somehow counterintuitive, as one would have expected axons to recross or coalesce at the midline, as described in other commissural systems (Farmer et al., 2008; Jaworski et al., 2010). Likewise, the FR phenotype of *Robo3* knockout is unexpected, as axons cross the midline and even fail to leave it. Moreover, Robo3 is still expressed by FR axons several days after they crossed the midline, unlike in other commissural systems (Marillat et al., 2004; Sabatier et al., 2004). The analysis of *Slit* triple knockouts also reveals that Slits control the defasciculation of FR axons at the midline and prevent them from growing caudally and rostrally, thereby confining them to the IPN level.

By contrast, the analysis of *Netrin-1* and *DCC* knockouts demonstrates that they are essential for guiding FR axons to the midline and promoting crossing. However, they also favor FR axon fasciculation and prevent axons from crossing the dorsal midline or from extending rostrally, as previously described (Schmidt et al., 2014). The distinct fascicles that form in these mutants might reflect the molecular diversity of the adult medial habenula (Yamaguchi et al., 2013). This heterogeneity of guidance defects is unlikely to rely on a differential expression of unc5 receptors in mHb neurons, as they only express *unc5a*, and homogeneously (van den Heuvel et al., 2013).

Interestingly, the spectrum of axon defects is specific for each mutant line, and a common signature of pathfinding errors can be established. However, a clear interindividual variability exists in each knockout line. For *Netrin-1* knockouts, this could be related to a hypomorphic allele (Serafini et al., 1996), but this should not be the case for the other mutants. This suggests that FR axon rewiring in these mutant is partially stochastic.

In conclusion, this method will facilitate the development of large-scale forward genetic screens and of 3D atlases of immunolabeled tissues. It will be a valuable tool to implement ongoing initiatives aimed at establishing the brain connectome (see, for instance, http://connectivity.brain-map.org/ and http://www.gensat.org/index.html).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mouse Strains and Genotyping

Netrin-1 (Serafini et al., 1996), *DCC* (Fazeli et al., 1997), *Robo3* (Sabatier et al., 2004), *Slit1/Slit2* (Plump et al., 2002), *Slit3* (Yuan et al., 2003), *Robo1* (Long et al., 2004), *Robo2* (Grieshammer et al., 2004) and *Slit2*^{lox} (Gibson et al., 2014) knockouts and *Shh:Cre* (Harfe et al., 2004), *Ptf1a:Cre*^{ERTM} (Kopinke et al., 2012), *Wnt1:Cre* (Danielian et al., 1997), *Tau*^{GFP} (Hippenmeyer et al., 2005), and *Rosa26:dTomato* (Madisen et al., 2010) lines were previously described and genotyped by PCR. Wild-type mice were from the C57BL6 background (Janvier France). Compound mutants were obtained by intercrossing the various lines. The day of the vaginal plug was counted as E0.5. Postnatal and adult mice were anesthetized with ketamine (100 mg/ml) and xylazine (10 mg/ml).

Embryos were collected at E12, E14, E16, and E18 and transferred to ice-cold PBS 1X (Invitrogen). From E16, the nervous system was dissected and a small hole was made in the telencephalon to facilitate the diffusion of the antibodies. At postnatal ages (P0 to P8), brains were dissected and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA; Merck) for 3 hr at room temperature (RT) or overnight at 4°C. Samples were kept at 4°C in PBS 1X until use.

All animal procedures were carried out in accordance to institutional guidelines (UPMC and INSERM).

(J–L) FR defects in a *Netrin-1*$^{-/-}$ mutant (#1). Some axons project rostrally over the medial habenula (1) without crossing the midline, a bundle grow caudally from the habenula (2), and other axons extend along the normal FR pathway (3). Two bundles leave the main tract to project dorsally before reaching the IPN (4 and 5), whereas other axons reach the IPN level. They form a large commissure (6), but a few axons extend more caudally parallel to the floor plate, and only a few cross it (arrowhead in K and L).

(M–O) Distinct FR guidance defects in another *Netrin-1*$^{-/-}$ mutant (#2). The dorsal defasciculation at habenula level is also seen (1), but most axons grow along the normal FR pathway (3). Upon reaching the floor plate, a large bundle is deflected dorsally (4) and a smaller ventral fascicle also forms in the ventral diencephalon (7). Other axons reach the IPN level and cross the midline to form a small commissure (6).

Scale bars represent 50 μm (C, F, and L), 100 μm (I), and 200 μm (A, B, D, E, G, H, J, K, and M–O).

Please cite this article in press as: Belle et al., A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System, Cell Reports (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037

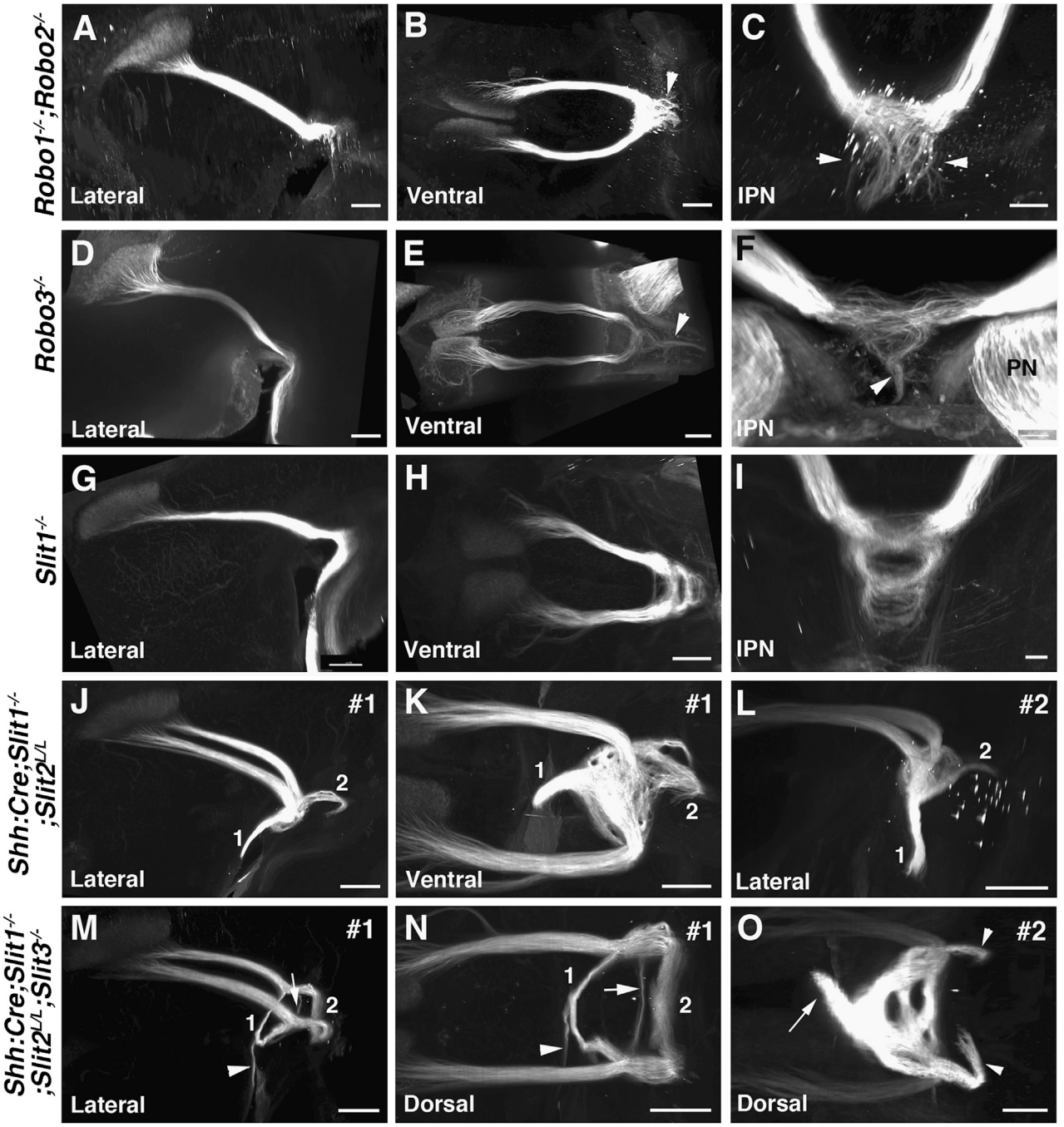


Figure 4. FR Axon Guidance Defects in *Slit* and *Robo* Knockouts

Robo3 (A-C, G-O) or TAG-1 (D–F) immunostaining and 3DISCO clearing in E16 *Slit* and *Robo* mutant embryos.

(A–C) In *Robo1*$^{-/-}$;*Robo2*$^{-/-}$ knockouts, the FR is similar to control until the IPN, where the axons defasciculate (arrowheads in C).

(D–F) In a *Robo3*$^{-/-}$ mutant, the FR reaches the IPN, where they cross the midline and extend caudally within the midline.

(G–I) in *Slit1*$^{-/-}$ embryos, the FR is similar to controls.

(J–L) Two *Shh:Cre;Slit1*$^{-/-}$;*Slit2*$^{lox/lox}$ embryos (#1 and #2). In both cases, FR axons reach the IPN and then form a dense meshwork at the floor plate level from which two axon bundles emerge and extend along the floor plate rostrally (1) and caudally (2).

(M–O) Two *Shh:Cre;Slit1*$^{-/-}$;*Slit2*$^{lox/lox}$;*Slit3*$^{-/-}$ embryos (#1 and #2). Again the FR is comparable to controls until axons reach the floor plate. In one case (#1 in M and N), FR axons from two large commissures: a rostral one (1) and a caudal one (2). A small tract leaves the rostral commissure to grow along the floor plate (arrowheads in M and N). In the second case (O), three commissures are observed, but they are more compact and the anterior medial bundle is larger (arrow). Moreover, two small fascicles extend caudally on both sides (arrowheads).

Scale bars represent 40 μm (F), 50 μm (C and I), 100 μm (O), 150 μm (K), and 200 μm (A, B, D, E, G, H, J, and L–N).

Whole-Mount Immunostaining

The procedure was similar for single and multiple labeling. Samples were first incubated at RT on a rotating shaker in a solution (PBSGT) of PBS 1X containing 0.2% gelatin (Prolabo), 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 0.01% thimerosal (Sigma-Aldrich) for 3 hr (E12), 24 hr (E14–E18 and P0), or 48 hr (P5 and P8). Samples were next transferred to PBSGT containing the primary antibodies (Table S1) and placed at 37°C, with rotation at 100 rpm, for 3 days (E12), 1 week (E14, E16, and E18), 10 days (P0), or 14 days (P5 and P8). This was followed by six washes of 30 min in PBSGT at RT. Next, samples were incubated in secondary antibodies (Table S2) diluted in PBSGT overnight (E12–E18) or for 2 days (P0–P8) at 37°C. After six washes of 30 min in PBSGT at RT, samples were stored at 4°C in PBS until clearing.

Tissue Clearing

We used the 3DISCO clearing procedure (Ertürk et al., 2012b) and slightly adapted it to our samples. All incubation steps were performed at RT in a fume hood, on a tube rotator (SB3, Stuart) at 14 rpm, using a 15 ml centrifuge tube (TPP, Dutscher) covered with aluminum foil to avoid contact with light. Samples were first dehydrated in a graded series (50%, 80%, and 100%) of tetrahydroflurane (THF; anhydrous, containing 250 ppm butylated hydroxytoluene inhibitor, Sigma-Aldrich) diluted in H_2O, during 1hr (E12-P0) or 90 min (P5) for each step. This was followed by a delipidation step of 20 min (E12 to P0) or 40 min (P5–P8) in dichloromethane (DCM; Sigma-Aldrich). Samples were transferred to 100% DCM until they have sunk. Finally, samples were cleared overnight in dibenzylether (DBE; Sigma-Aldrich). Samples should be stored in brown glass vial (Rotilabo, Roth) filled with DBE, in the dark and at RT. THF, DCM, and DBE are toxic (gloves must be worn at all steps) and flammable. Waste should be treated and eliminated accordingly. DBE must be stored in glass containers.

Imaging

Ultramicroscopy

3D imaging was primarily performed with an ultramicroscope (LaVision BioTec) using ImspectorPro software (LaVision BioTec). The light sheet was generated by a laser (wavelength 488 or 561 nm, Coherent Sapphire Laser, LaVision BioTec) and two cylindrical lenses. A binocular stereomicroscope (MXV10, Olympus) with a 2× objective (MVPLAPO, Olympus) was used at different magnifications (1.6×, 4×, 5×, and 6.3×). Samples were placed in an imaging reservoir made of 100% quartz (LaVision BioTec) filled with DBE and illuminated from the side by the laser light. Different dipping caps were used to image large samples with a high working distance or small samples with a low working distance. Images were acquired with a PCO Edge SCMOS CCD camera (2,560 × 2,160 pixel size, LaVision BioTec). The step size between each image was fixed at 1 μm.

The acquisition time with the ultramicroscope depends on the number of lasers (one side or two sides) used to generate and focus the light sheet. It took only 10 min to image (1,488 sections) the habenula and FR with a single light source. For the entire brain, the two light sources were used and the total acquisition time (1,856 sections) was ~1 hr. Each resulting imaris (.ims) file was ~15 Gb in size at a 1 μm z resolution (16-bit images).

Confocal Microscopy

For imaging with an upright confocal microscope (Olympus FV1000), samples were placed on a glass slide, in a homemade PDMS cuvette (DBE resistant) with a rim of 5 mm (Sylgard 184/Silicone elastomer, Dow Corning). The cuvette was filled with DBE and covered with a glass coverslip. Images were obtained with a 10× objective (Olympus UPlanSApo 10×/0.40 numerical aperture objective Royal Microscopical Society, infinity corrected 0.31 mm working distance). Each individual image (.oif file) was 1.08 Gb from confocal for 1 μm z resolution. The acquisition time was of about 4 hr for the FR and therefore much longer than with an ultramicroscope.

3D Imaging and Image Processing

Images, 3D volume, and movies were generated using Imaris x64 software (version 7.6.1, Bitplane). Stack images were first converted to imaris file (.ims) using ImarisFileConverter. File size was next reduced to 8 bits. 3D reconstruction of the sample was performed using "volume rendering" (Imaris). The sample could be optically sliced in any angle using the "orthoslicer" or "obliqueslicer" tools. Air bubbles and crystals that might form at the surface of the samples could be eliminated using the "surface" tool by creating a mask around the each volume. 3D pictures and movies were generated using the "snapshot" and "animation" tools. Finally, images were cropped and, if required, their brightness was adjusted evenly using Photoshop CS4 (Adobe). Movies legends were generated using iMovie 10.0.2.

Alternatively, movies and 3D analysis could be done with free software such as Vaa3D (http://www.vaa3d.org) or Fiji 3D project plugin (Schindelin et al., 2012). However, the quality of the 3D images was not as good as with Imaris (data not shown).

The distance separating the base of the habenula from the IPN was obtained using the "measurement" tool (Imaris), and statistical analysis was performed with Prism 6 (GraphPad).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes two figures, two tables, and 16 movies and can be found with this article online at http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (Programme équipe FRM; reference DEQ20120323700) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-MNP-030) to A.C. It was also performed in the frame of the LABEX LIFESENSES (reference ANR-10-LABX-65) supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-IDEX-0004-02. F.H. was the recipient of fellowships from the Wings for Life Foundation, the Institute for Research on Paraplegia (IRP), and the DFG. The ultramicroscope was purchased with a grant from the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC, Programme espoir en tête, Rotary). We also thank Dr. Domna Karagogeos for providing one of the anti-TAG-1 antibodies and Dr. Chris Wright for the *Ptf1a:Cre*^{ERTM} line.

Received: September 15, 2014
Revised: October 10, 2014
Accepted: October 14, 2014
Published: November 6, 2014

REFERENCES

Amo, R., Aizawa, H., Takahoko, M., Kobayashi, M., Takahashi, R., Aoki, T., and Okamoto, H. (2010). Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula. J. Neurosci. *30*, 1566–1574.

Baier, H., Klostermann, S., Trowe, T., Karlstrom, R.O., Nüsslein-Volhard, C., and Bonhoeffer, F. (1996). Genetic dissection of the retinotectal projection. Development *123*, 415–425.

Beretta, C.A., Dross, N., Guiterrez-Triana, J.A., Ryu, S., and Carl, M. (2012). Habenula circuit development: past, present, and future. Front Neurosci *6*, 51.

Bianco, I.H., Carl, M., Russell, C., Clarke, J.D., and Wilson, S.W. (2008). Brain asymmetry is encoded at the level of axon terminal morphology. Neural Dev. *3*, 9.

Chédotal, A. (2011). Further tales of the midline. Curr. Opin. Neurobiol. *21*, 68–75.

Chen, H., Bagri, A., Zupicich, J.A., Zou, Y., Stoeckli, E., Pleasure, S.J., Lowenstein, D.H., Skarnes, W.C., Chédotal, A., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. Neuron *25*, 43–56.

Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., et al. (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. Nature *497*, 332–337.

Danielian, P.S., Echelard, Y., Vassileva, G., and McMahon, A.P. (1997). A 5.5-kb enhancer is both necessary and sufficient for regulation of Wnt-1 transcription in vivo. Dev. Biol. *192*, 300–309.

Please cite this article in press as: Belle et al., A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System, Cell Reports (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.037

Dodt, H.U., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgänsberger, W., and Becker, K. (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. Nat. Methods *4*, 331–336.

Ertürk, A., and Bradke, F. (2013). High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO). Exp. Neurol. *242*, 57–64.

Ertürk, A., Mauch, C.P., Hellal, F., Förstner, F., Keck, T., Becker, K., Jährling, N., Steffens, H., Richter, M., Hübener, M., et al. (2012a). Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. Nat. Med. *18*, 166–171.

Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H.U. (2012b). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. Nat. Protoc. *7*, 1983–1995.

Farmer, W.T., Altick, A.L., Nural, H.F., Dugan, J.P., Kidd, T., Charron, F., and Mastick, G.S. (2008). Pioneer longitudinal axons navigate using floor plate and Slit/Robo signals. Development *135*, 3643–3653.

Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R.V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. Nature *386*, 796–804.

Ferland, R.J., Cherry, T.J., Preware, P.O., Morrisey, E.E., and Walsh, C.A. (2003). Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain. J. Comp. Neurol. *460*, 266–279.

Figdor, M.C., and Stern, C.D. (1993). Segmental organization of embryonic diencephalon. Nature *363*, 630–634.

Fowler, C.D., Lu, Q., Johnson, P.M., Marks, M.J., and Kenny, P.J. (2011). Habenular α5 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. Nature *471*, 597–601.

Fujita, H., and Sugihara, I. (2012). FoxP2 expression in the cerebellum and inferior olive: development of the transverse stripe-shaped expression pattern in the mouse cerebellar cortex. J. Comp. Neurol. *520*, 656–677.

Funato, H., Saito-Nakazato, Y., and Takahashi, H. (2000). Axonal growth from the habenular nucleus along the neuromere boundary region of the diencephalon is regulated by semaphorin 3F and netrin-1. Mol. Cell. Neurosci. *16*, 206–220.

Gibson, D.A., Tymanskyj, S., Yuan, R.C., Leung, H.C., Lefebvre, J.L., Sanes, J.R., Chédotal, A., and Ma, L. (2014). Dendrite self-avoidance requires cell-autonomous slit/robo signaling in cerebellar purkinje cells. Neuron *81*, 1040–1056.

Grieshammer, U., Le Ma, 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.

Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. Nat. Neurosci. *14*, 1481–1488.

Harfe, B.D., Scherz, P.J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A.P., and Tabin, C.J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. Cell *118*, 517–528.

Helmstaedter, M., Briggman, K.L., Turaga, S.C., Jain, V., Seung, H.S., and Denk, W. (2013). Connectomic reconstruction of the inner plexiform layer in the mouse retina. Nature *500*, 168–174.

Herkenham, M., and Nauta, W.J. (1979). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. J. Comp. Neurol. *187*, 19–47.

Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 503–513.

Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D.R., and Arber, S. (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. PLoS Biol. *3*, e159.

Iwahori, N., Nakamura, K., and Kameda, S. (1993). Terminal patterns of the fasciculus retroflexus in the interpeduncular nucleus of the mouse: a Golgi study. Anat. Embryol. (Berl.) *187*, 523–528.

Jaworski, A., Long, H., and Tessier-Lavigne, M. (2010). Collaborative and specialized functions of Robo1 and Robo2 in spinal commissural axon guidance. J. Neurosci. *30*, 9445–9453.

Ke, M.T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. Nat. Neurosci. *16*, 1154–1161.

Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., and Goodman, C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. Cell *75*, 1389–1399.

Kopinke, D., Brailsford, M., Pan, F.C., Magnuson, M.A., Wright, C.V., and Murtaugh, L.C. (2012). Ongoing Notch signaling maintains phenotypic fidelity in the adult exocrine pancreas. Dev. Biol. *362*, 57–64.

Kuhar, M.J., DeHaven, R.N., Yamamura, H.I., Rommel-Spacher, H., and Simon, J.R. (1975). Further evidence for cholinergic habenulo-interpeduncular neurons: pharmacologic and functional characteristics. Brain Res. *97*, 265–275.

Lewcock, J.W., Genoud, N., Lettieri, K., and Pfaff, S.L. (2007). The ubiquitin ligase Phr1 regulates axon outgrowth through modulation of microtubule dynamics. Neuron *56*, 604–620.

Long, H., Sabatier, C., Ma, L., 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.

Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. Nat. Neurosci. *13*, 133–140.

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.

Marillat, V., Sabatier, C., Failli, V., Matsunaga, E., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., and Chédotal, A. (2004). The slit receptor Rig-1/Robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. Neuron *43*, 69–79.

Merte, J., Wang, Q., Vander Kooi, C.W., Sarsfield, S., Leahy, D.J., Kolodkin, A.L., and Ginty, D.D. (2010). A forward genetic screen in mice identifies Sema3A(K108N), which binds to neuropilin-1 but cannot signal. J. Neurosci. *30*, 5767–5775.

Plump, A.S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C.J., Goodman, C.S., Mason, C.A., 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.

Quina, L.A., Wang, S., Ng, L., and Turner, E.E. (2009). Brn3a and Nurr1 mediate a gene regulatory pathway for habenula development. J. Neurosci. *29*, 14309–14322.

Ramon y Cajal, S. (1911). Histologie Système Nerveux de L'homme et des Vertébrés, *Vol 2* (Paris: Maloine).

Sabatier, C., Plump, A.S., Le Ma, 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.

Sahay, A., Molliver, M.E., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (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.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat. Methods *9*, 676–682.

Schmidt, E.R., Brignani, S., Adolfs, Y., Lemstra, S., Demmers, J., Vidaki, M., Donahoo, A.L., Lilleväli, K., Vasar, E., Richards, L.J., et al. (2014). Subdomain-mediated axon-axon signaling and chemoattraction cooperate to regulate afferent innervation of the lateral habenula. Neuron *83*, 372–387.

Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., and Goodman, C.S. (1993). Mutations affecting growth cone guidance in Drosophila: genes necessary for guidance toward or away from the midline. Neuron *10*, 409–426.

Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. Cell *87*, 1001–1014.

Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., et al. (2014). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. Cell *157*, 726–739.

Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B., and Deisseroth, K. (2014). Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. Nat. Protoc. *9*, 1682–1697.

van den Heuvel, D.M., Hellemons, A.J., and Pasterkamp, R.J. (2013). Spatio-temporal expression of repulsive guidance molecules (RGMs) and their receptor neogenin in the mouse brain. PLoS ONE *8*, e55828.

Wolfer, D.P., Henehan-Beatty, A., Stoeckli, E.T., Sonderegger, P., and Lipp, H.P. (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.

Yamaguchi, T., Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T., and Nakanishi, S. (2013). Distinct roles of segregated transmission of the septo-habenular pathway in anxiety and fear. Neuron *78*, 537–544.

Yamamoto, M., Boyer, A.M., Crandall, J.E., Edwards, M., and Tanaka, H. (1986). Distribution of stage-specific neurite-associated proteins in the developing murine nervous system recognized by a monoclonal antibody. J. Neurosci. *6*, 3576–3594.

Yang, B., Treweek, J.B., Kulkarni, R.P., Deverman, B.E., Chen, C.K., Lubeck, E., Shah, S., Cai, L., and Gradinaru, V. (2014). Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. Cell *158*, 945–958.

Yuan, W., Rao, Y., Babiuk, R.P., Greer, J.J., Wu, J.Y., and Ornitz, D.M. (2003). A genetic model for a central (septum transversum) congenital diaphragmatic hernia in mice lacking Slit3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 5217–5222.

Zallen, J.A., Yi, B.A., and Bargmann, C.I. (1998). The conserved immunoglobulin superfamily member SAX-3/Robo directs multiple aspects of axon guidance in C. elegans. Cell *92*, 217–227.

Cell Reports, Volume *9*

Supplemental Information

A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System

Morgane Belle, David Godefroy, Chloé Dominici, Céline Heitz-Marchaland, Pavol Zelina, Farida Hellal, Frank Bradke, and Alain Chédotal

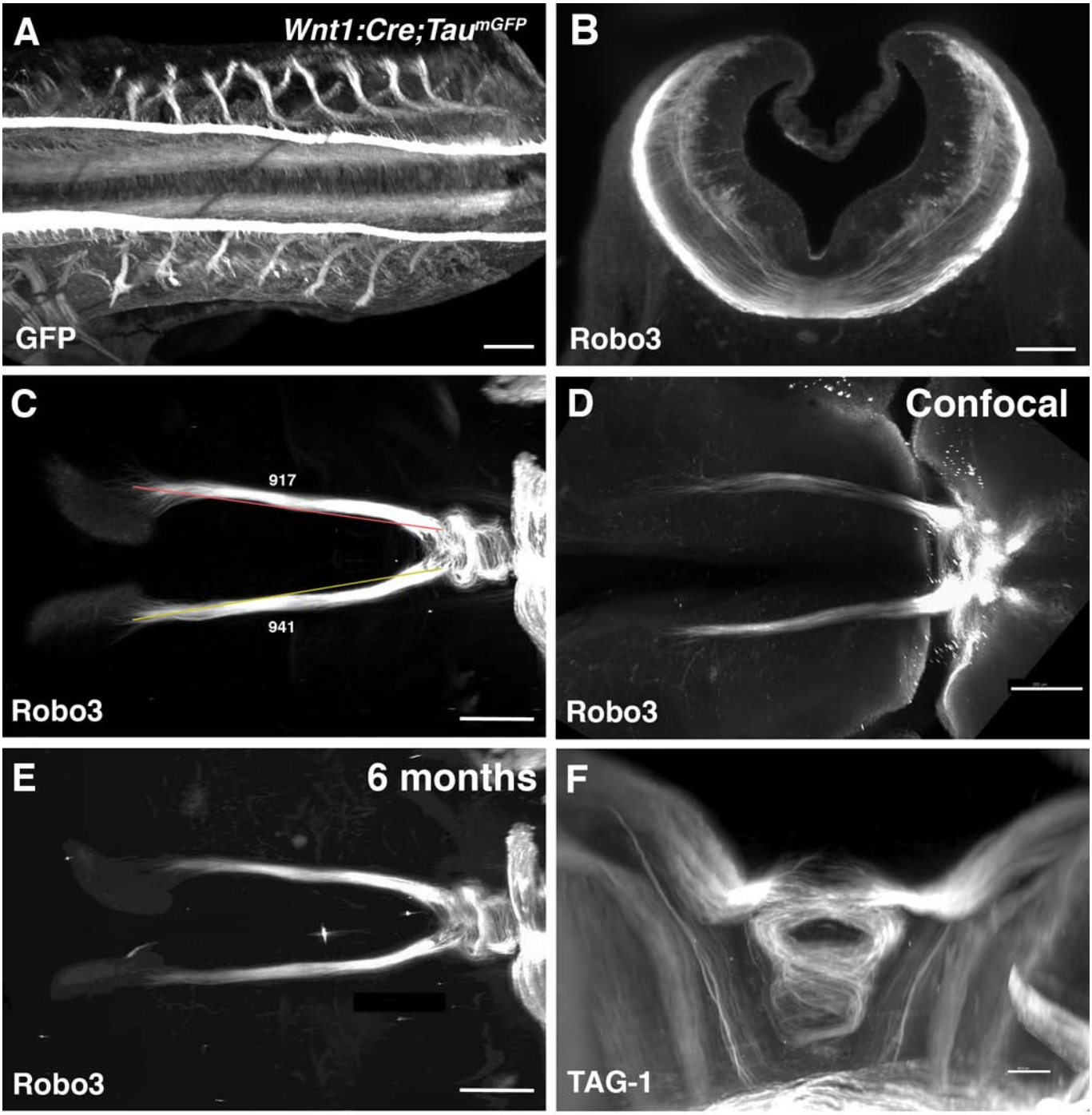

A
Wnt1:Cre;Tau^{mGFP}
GFP
B
Robo3
C
917
941
Robo3
D
Confocal
Robo3
E
6 months
Robo3
F
TAG-1

Figure S1

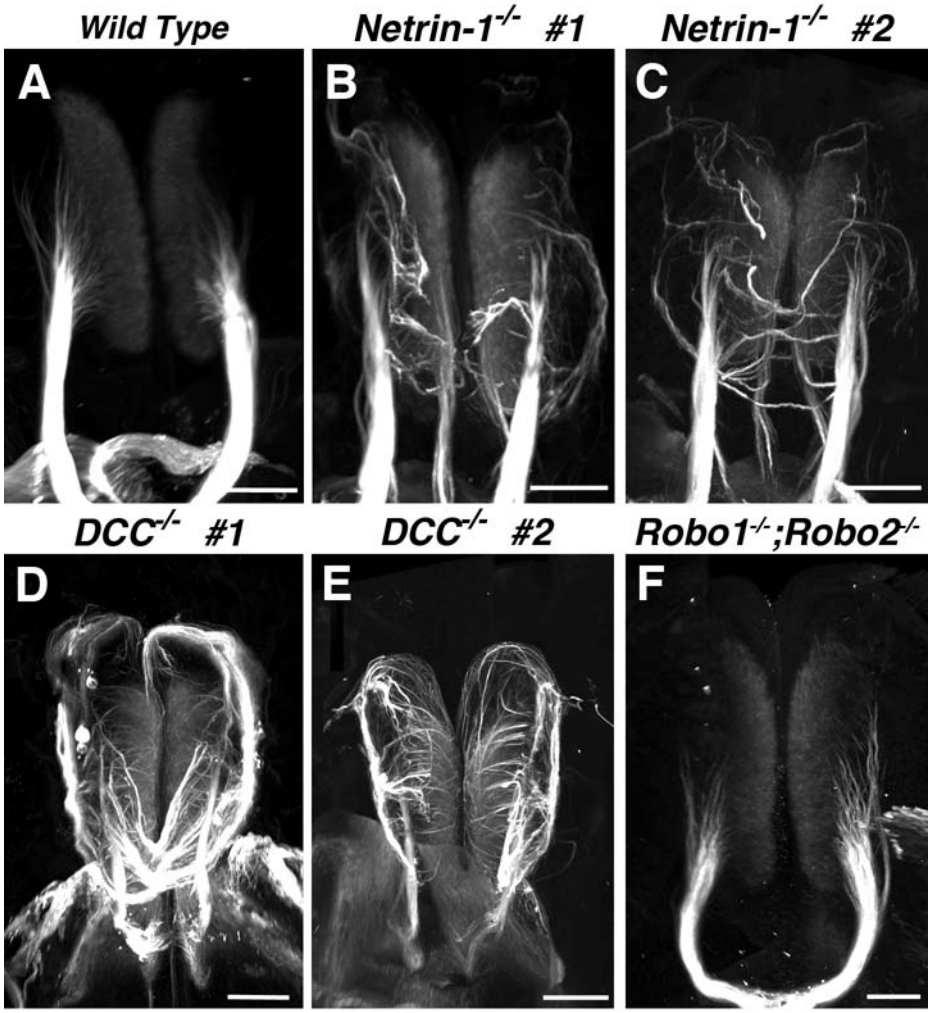


Figure S2

Supplementary Figure Legends

Figure S1 (related to Figure 1)

3DISCO clearing of immunolabeled embryos.

(A) Dorsal view of an E11.5 *Wnt1:Cre;Tau*^{mGFP} embryo labeled with anti-GFP. **(B)** Optical coronal section through the hindbrain of an E11 mouse embryo stained with anti-Robo3 antibodies (shown in Figure1I). **(C)** measurement of FR length in E16 embryos labeled withanti-Robo3. **(D)** confocal image of the FR of an E16 embryo labeled with anti-Robo3 and cleared with 3DISCO. **(E)** shows the same embryo than in C, but re-imaged after being stored 6 month. **(F)** IPN view of the FR projection in an E16 embryo labeled with anti-TAG-1 antibodies.

Scale bars represent 50µm (F), 100µm (A), 150µm (B) and 200µm (C, D, E)

Figure S2 (related to Figure 3)

Dorsal views of the medial habenula in knockout embryos.

E16 embryos immunolabeled with anti-Robo3 antibodies. It illustrates the abnormal and variability of dorsal midline crossing defects of habenular axons in *Netrin-1*$^{-/-}$ and *DCC*$^{-/-}$ knockouts.

Scale bars represent 150 µm (A), 200 µm (B, C, D, E, F).

Epitope	Species	Dilution	Source	Catalog Number
Barlh1	Rabbit polyclonal	1:300	Sigma	HPA004809
ß-Gal	Rabbit IgG	1:1000	Cappel	559762
ChAT	Goat polyclonal	1:200	Millipore	ab144P
DCC	Goat polyclonal	1:150	Santa Cruz	sc-6535
DsRed	Rabbit polyclonal	1:500	Clontech	632496
FoxP2	Rabbit polyclonal	1:1000	Abcam	ab16046
GFP	Chicken polyclonal	1:800	Abcam	ab13970
GFP	Rabbit IgG	1:800	Life Technologies	A11122
Robo1	Goat polyclonal	1:300	R&D System	AF1749
Robo2	Rabbit polyclonal	1 :300	Abcam	ab75014
Robo3	Goat polyclonal	1:300	R&D System	AF3076
Tag1	Rabbit	1 :10000	Domna Karagogeos	
Tag1	Goat polyclonal	1:1000	R&D System	AF4439

Supplementary table S1 (related to experimental procedures)

Epitope	Fluorophore	Origin	Dilution	Source	Catalog #
Goat	Alexa 488	Donkey	1:600	Life technologies	A11055
Goat	Alexa 488	Bovine	1:500	Jackson	805-545-180
Mouse	Cy3	Donkey	1:400	Jackson	715-165-151
Mouse	Alexa 488	Donkey	1:600	Life technologies	A21202
Rabbit	Alexa 488	Donkey	1:600	Life technologies	A21206
Rabbit	Cy3	Donkey	1:400	Jackson	711-165-152
Chicken	Cy3	Donkey	1:300	Jackson	703-165-155
Rabbit	Alexa 647	Donkey	1:400	Jackson	711-605-152

Supplementary table S2 (related to experimental procedures)

Supplementary Table 1 (related to experimental procedures)

List of the primary antibodies use for whole-mount staining

Supplementary Table 2 (related to experimental procedures)

List of the secondary antibodies use for whole-mount staining

Supplementary movies legends

Movie S1, related to Figure 1

3D movie of an E13 embryo labeled with anti-ChAT antibodies.

Movie S2, related to Figure 1

3D Movie of oculomotor nerves in an E13 embryo labeled with anti-ChAT antibodies.

Movie S3, related to Figure 1

3D movie of an E13 embryo double labeled with anti-ChAT and anti-TAG-1 antibodies.

Movie S4, related to Figure 1

3D movie of the forelimb motor innervation in an E13 embryo labeled with anti-ChAT antibodies.

Movie S5, related to Figure 1

3D movie of a spinal cord segment from an E11.5 *Wnt1:Cre;Tau*^{GFP} embryo labeled with anti-GFP.

Movie S6, related to Figure 1

Scan, using the orthoslicer tool, through the longitudinal axis of the spinal cord of an E11.5 *Wnt1:Cre;Tau*^{GFP} embryo labeled with anti-GFP.

Movie S7, related to Figure 1

3D movie of the E11 spinal cord and caudal hindbrain of a wild-type embryo after whole-mount Robo3 immunostaining showing the array of commissural axons crossing the floor plate.

Movie S8, related to Figure 1

Scan, using the orthoslicer tool, through the longitudinal axis of the spinal cord and hindbrain of an E11 wild-type embryo labeled with anti-Robo3 (see also movie 8)

Movie S9, related to Figure 2

3D movie of an E16 mouse brain labeled with anti-Robo3

Movie S10, related to Figure 2

3D movie of the fasciculus retroflexus (FR) projection from the medial habenula (mHb) to the interpeduncular nucleus (IPN), followed by a scan through the IPN region. E16 mouse brain labeled with anti-Robo3

Movie S11, related to Figure 3

3D movie showing FR guidance defects in a *DCC*$^{-/-}$ E16 embryo

Movie S12, related to Figure 3

3D movie showing FR guidance defects in a *Netrin-1*$^{-/-}$ E16 embryo

Movie S13, related to Figure 4

3D movie showing FR guidance defects in a *Robo1*$^{-/-}$*;Robo2*$^{-/-}$ E16 embryo

Movie S14 , related to Figure 4

3D movie showing FR guidance defects in a *Robo3*$^{-/-}$ E16 embryo

Movie S15, related to Figure 4

3D movie showing FR guidance defects in a *Shh :Cre ;Slit1*$^{-/-}$ *;Slit2*$^{lox/lox}$ E16 embryo

Movie S16, related to Figure 4

3D movie showing FR guidance defects in a *Shh :Cre ;Slit1*$^{-/-}$ *;Slit2*$^{lox/lox}$ *;Slit3*$^{-/-}$ E16 embryo.

Bibliographie

Ackerman, S.L., Kozak, L.P., Przyborski, S.A., Rund, L.A., Boyer, B.B., and Knowles, B.B. (1997). The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. Nature *386*, 838–842.

Ahmed, G., Shinmyo, Y., Ohta, K., Islam, S.M., Hossain, M., Naser, I. Bin, Riyadh, M.A., Su, Y., Zhang, S., Tessier-Lavigne, M., et al. (2011). Draxin Inhibits Axonal Outgrowth through the Netrin Receptor DCC. J. Neurosci. *31*, 14018–14023.

Akazawa, C., Ishibashi, M., Shimizu, C., Nakanishi, S., and 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.

Alaynick, W.A., Jessell, T.M., and Pfaff, S.L. (2011). SnapShot: Spinal Cord Development. Cell *146*, 178–178.e1.

Altman, J., and Bayer, S.A. (1984). The development of the rat spinal cord. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. *85*, 1–164.

Altman, J., and Bayer, S.A. (1987). Development of the precerebellar nuclei in the rat: I. The precerebellar neuroepithelium of the rhombencephalon. J. Comp. Neurol. *257*, 477–489.

Andrews, W.D., Plachez, C., Liapi, A., Camurri, L., Zhang, J., Mori, S., Murakami, F., Parnavelas, J.G., Sundaresan, V., and Richards, L.J. (2006). Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. Development *133*, 2243–2252.

Aoyagi, Y., Kawakami, R., Osanai, H., Hibi, T., Nemoto, T., Sporns, O., Tononi, G., Kötter, R., DeFelipe, J., Kawakami, R., et al. (2015). A Rapid Optical Clearing Protocol Using 2,2′-Thiodiethanol for Microscopic Observation of Fixed Mouse Brain. PLoS One *10*, e0116280.

Arbeille, E., Reynaud, F., Sanyas, I., Bozon, M., Kindbeiter, K., Causeret, F., Pierani, A., Falk, J., Moret, F., and Castellani, V. (2015). Cerebrospinal fluid-derived Semaphorin3B orients neuroepithelial cell divisions in the apicobasal axis. Nat. Commun. *6*, 6366.

Azizi, S. a, and Woodward, D.J. (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.

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.

Bai, G., Chivatakarn, O., Bonanomi, D., Lettieri, K., Franco, L., Xia, C., Stein, E., Ma, L., Lewcock, J.W., and Pfaff, S.L. (2011). Presenilin-dependent receptor processing is required for axon guidance. Cell *144*, 106–118.

Balmer, J.E., and Blomhoff, R. (2002). Gene expression regulation by retinoic acid. J. Lipid Res. *43*, 1773–1808.

Barber, M., Di Meglio, T., Andrews, W.D., Hernández-Miranda, L.R., Murakami, F., Chédotal, A., and Parnavelas, J.G. (2009). The role of Robo3 in the development of cortical interneurons. Cereb. Cortex *19 Suppl 1*, i22–i31.

Barry, D., and McDermott, K. (2005). Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. Glia *50*, 187–197.

Barry, D.S., Pakan, J.M.P., O'Keeffe, G.W., and Mcdermott, K.W. (2013). The spatial and temporal arrangement of the radial glial scaffold suggests a role in axon tract formation in the developing spinal cord. J. Anat. *222*, 203–213.

Becker, K., Jährling, N., Saghafi, S., Weiler, R., and Dodt, H.-U. (2012). Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. PLoS One *7*, e33916.

Bedell, V.M., Yeo, S.-Y., Park, K.W., Chung, J., Seth, P., Shivalingappa, V., Zhao, J., Obara, T., Sukhatme, V.P., Drummond, I. a, et al. (2005). Roundabout4 Is Essential for Angiogenesis in Vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 6373–6378.

Belle, M., Godefroy, D., Dominici, C., Heitz-Marchaland, C., Zelina, P., Hellal, F., Bradke, F., and Chédotal, A. (2014). A Simple Method for 3D Analysis of Immunolabeled Axonal Tracts in a Transparent Nervous System. Cell Rep. *9*, 1191–1201.

Bennett, K.L., Bradshaw, J., Youngman, T., Rodgers, J., Greenfield, B., Aruffo, A., and Linsley, P.S. (1997). Deleted in colorectal carcinoma (DCC) binds heparin via its fifth fibronectin type III domain. J. Biol. Chem. *272*, 26940–26946.

Bermingham, N.A., Hassan, B.A., Wang, V.Y., Fernandez, M., Banfi, S., Bellen,

H.J., Fritzsch, B., and Zoghbi, H.Y. (2001). Proprioceptor pathway development is dependent on Math1. Neuron *30*, 411–422.

Bielle, F., Marcos-Mondejar, P., Keita, M., Mailhes, C., Verney, C., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., López-Bendito, G., and Garel, S. (2011). Slit2 Activity in the Migration of Guidepost Neurons Shapes Thalamic Projections during Development and Evolution. Neuron *69*, 1085–1098.

Bin, J.M.M., Han, D., Lai Wing Sun, K., Croteau, L.-P., Dumontier, E., Cloutier, J.-F., Kania, A., Kennedy, T.E.E., Lai Wing Sun, K., Croteau, L.-P., et al. (2015). Complete Loss of Netrin-1 Results in Embryonic Lethality and Severe Axon Guidance Defects without Increased Neural Cell Death. Cell Rep. *12*, 1099–1106.

Bloch-Gallego, E., Ezan, F., Tessier-Lavigne, M., and Sotelo, C. (1999). Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. J. Neurosci. *19*, 4407–4420.

Borrell, V., and Marín, O. (2006). Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. Nat. Neurosci. *9*, 1284–1293.

Bosley, T.M., Salih, M.A.M., Jen, J.C., Lin, D.D.M., Oystreck, D., Abu-Amero, K.K., MacDonald, D.B., Zayed, Z. Al, Dhalaan, H. Al, Kansu, T., et al. (2005). Neurologic features of horizontal gaze palsy and progressive scoliosis with mutations in ROBO3. Neurology *64*, 1196–1203.

Bourrat, F., and Sotelo, C. (1991). Relationships between neuronal birthdates and cytoarchitecture in the rat inferior olivary complex. J. Comp. Neurol. *313*, 509–521.

Brankatschk, M., and Dickson, B.J. (2006). Netrins guide Drosophila commissural axons at short range. Nat. Neurosci. *9*, 188–194.

De Breuck, S., Lardon, J., Rooman, I., and Bouwens, L. (2003). Netrin-1 expression in fetal and regenerating rat pancreas and its effect on the migration of human pancreatic duct and porcine islet precursor cells. Diabetologia *46*, 926–933.

Brodal, P., and Bjaalie, J. (1992). Organization of the pontine nuclei. Neurosci Res.

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.

Buisseret-Delmas, C., and Angaut, P. (1993). The cerebellar olivo-corticonuclear

connections in the rat. Prog. Neurobiol. *40*, 63–87.

De Camilli, P., Miller, P.E., Levitt, P., Walter, U., and Greengard, P. (1984). Anatomy of cerebellar Purkinje cells in the rat determined by a specific immunohistochemical marker. Neuroscience *11*, 761–IN2.

Causeret, F., Danne, F., Ezan, F., Sotelo, C., and Bloch-Gallego, E. (2002). Slit antagonizes netrin-1 attractive effects during the migration of inferior olivary neurons. Dev. Biol. *246*, 429–440.

Cerminara, N.L., Lang, E.J., Sillitoe, R. V, and Apps, R. (2015). Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. Nat. Publ. Gr. *16*.

Charoy, C., Nawabi, H., Reynaud, F., Derrington, E., Bozon, M., Wright, K., Falk, J., Helmbacher, F., Kindbeiter, K., and Castellani, V. (2012). gdnf Activates Midline Repulsion by Semaphorin3B via NCAM during Commissural Axon Guidance. Neuron *75*, 1051–1066.

Charron, F., Stein, E., Jeong, J., McMahon, A.P., and Tessier-Lavigne, M. (2003). The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. Cell *113*, 11–23.

Chen, J.H., Wen, L., Dupuis, S., Wu, J.Y., and 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.

Chen, Z., Gore, B.B., Long, H., Ma, L., and Tessier-Lavigne, M. (2008). Alternative splicing of the Robo3 axon guidance receptor governs the midline switch from attraction to repulsion. Neuron *58*, 325–332.

Chung, K., Wallace, J., Kim, S.-Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K. a., Mattis, J., Denisin, A.K., et al. (2013a). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. Nature.

Chung, K., Wallace, J., Kim, S.-Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., et al. (2013b). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. Nature.

Cirulli, V., and Yebra, M. (2007). Netrins: beyond the brain. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 296–306.

Clark, K., Hammond, E., and Rabbitts, P. (2002). Temporal and spatial expression

of two isoforms of the Dutt1/Robo1 gene in mouse development. FEBS Lett. *523*, 12–16.

Colamarino, S.A., and Tessier-Lavigne, M. (1995). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. Cell *81*, 621–629.

Coleman, H. a, Labrador, J.-P., Chance, R.K., and Bashaw, G.J. (2010). The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. Development *137*, 2417–2426.

Corset, V., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Forcet, C., Moyse, E., Chédotal, A., and Mehlen, P. (2000). Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. Nature *407*, 747–750.

Costantini, I., Ghobril, J.-P., Di Giovanna, A.P., Mascaro, A.L.A., Silvestri, L., Müllenbroich, M.C., Onofri, L., Conti, V., Vanzi, F., Sacconi, L., et al. (2015). A versatile clearing agent for multi-modal brain imaging. Sci. Rep. *5*, 9808.

Dalkic, E., Kuscu, C., Sucularli, C., Aydin, I.T., Akcali, K.C., and Konu, O. (2006). Alternatively spliced Robo2 isoforms in zebrafish and rat. Dev. Genes Evol. *216*, 555–563.

Dalvin, S., Anselmo, M.A., Prodhan, P., Komatsuzaki, K., Schnitzer, J.J., and Kinane, T.B. (2003). Expression of Netrin-1 and its two receptors DCC and UNC5H2 in the developing mouse lung.

Dasen, J.S., and Jessell, T.M. (2009). Chapter Six Hox Networks and the Origins of Motor Neuron Diversity. Curr. Top. Dev. Biol. *88*, 169–200.

Davson, H. (1976). The blood-brain barrier. J. Physiol. *255*, 1–28.

Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., and Sretavan, D.W. (1997). Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. Neuron *19*, 575–589.

Delloye-Bourgeois, C., Jacquier, A., Charoy, C., Reynaud, F., Nawabi, H., Thoinet, K., Kindbeiter, K., Yoshida, Y., Zagar, Y., Kong, Y., et al. (2014). PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments. Nat. Neurosci. *18*, 36–45.

Dessaud, E., McMahon, A.P., and Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. Development *135*, 2489–2503.

Dodt, H., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgänsberger, W., Becker, K., et al. (2007). Ultramicroscopy : three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. Nat. Methods *4*, 331–336.

Durston, A.J., Timmermans, J.P.M., Hage, W.J., Hendriks, H.F.J., de Vries, N.J., Heideveld, M., and Nieuwkoop, P.D. (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. Nature *340*, 140–144.

Dymecki, S.M., and Tomasiewicz, H. (1998). Using Flp-Recombinase to Characterize Expansion ofWnt1-Expressing Neural Progenitors in the Mouse. Dev. Biol. *201*, 57–65.

Engelkamp, D. (2002). Cloning of three mouse Unc5 genes and their expression patterns at mid-gestation. Mech. Dev. *118*, 191–197.

Erickson, A.C., and Couchman, J.R. (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. J. Histochem. Cytochem. *48*, 1291–1306.

Erskine, L., Williams, S.E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R.A., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Mason, C.A. (2000). Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robos and slits. J. Neurosci. *20*, 4975–4982.

Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J.M., Alakakone, B., Shewan, D., and Ruhrberg, C. (2011). VEGF Signaling through Neuropilin 1 Guides Commissural Axon Crossing at the Optic Chiasm. Neuron *70*, 951–965.

Ertürk, A., Mauch, C.P., Hellal, F., Förstner, F., Keck, T., Becker, K., Jährling, N., Steffens, H., Richter, M., Hübener, M., et al. (2011). Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. Nat. Med. *18*, 166–171.

Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H.-U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. Nat. Protoc. *7*, 1983–1995.

Essick, C.R. (1912). The development of the nuclei pontis and the nucleus arcuatus in man. Am J Anat *13*, 25–54.

Fabre, P.J., Shimogori, T., and Charron, F. (2010). Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. J. Neurosci. *30*, 266–275.

Famulski, J.K., Solecki, D.J., Nelson, W.J., Etienne-Manneville, S., Johnston, D.S., Sanson, B., Laprise, P., Tepass, U., Siller, K.H., Doe, C.Q., et al. (2013). New spin on an old transition: epithelial parallels in neuronal adhesion control. Trends Neurosci. *36*, 163–173.

Farago, A.F., Awatramani, R.B., Dymecki, S.M., Altman, J., Bayer, S.A., Altman, J., Bayer, S.A., Awatramani, R., Soriano, P., Rodriguez, C., et al. (1980). Assembly of the Brainstem Cochlear Nuclear Complex Is Revealed by Intersectional and Subtractive Genetic Fate Maps. Neuron *50*, 205–218.

Farmer, W.T., Altick, A.L., Nural, H.F., Dugan, J.P., Kidd, T., Charron, F., and Mastick, G.S. (2008). Pioneer longitudinal axons navigate using floor plate and Slit/Robo signals. Development *135*, 3643–3653.

Fazeli, A., Dickinson, S.L.L., Hermiston, M.L., Tighe, R. V, Steen, R.G., Small, C.G.G., Stoeckli, E.T.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. Nature *386*, 796–804.

Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., and Kinzler, K.W. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science *247*, 49–56.

Fedtsova, N.G., and Turner, E.E. (1995). Brn-3.0 expression identifies early post-mitotic CNS neurons and sensory neural precursors. Mech. Dev. *53*, 291–304.

Feoktistov, I., and Biaggioni, I. (1997). Adenosine A2B receptors. Pharmacol. Rev. *49*, 381–402.

Fetcho, J.R. (1987). A review of the organization and evolution of motoneurons innervating the axial musculature of vertebrates. Brain Res. *434*, 243–280.

Finger, J.H., Bronson, R.T., Harris, B., Johnson, K., Przyborski, S.A., and Ackerman, S.L. (2002). The netrin 1 receptors Unc5h3 and Dcc are necessary at multiple choice points for the guidance of corticospinal tract axons. J. Neurosci. *22*, 10346–10356.

Fouquet, C., Di Meglio, T., Ma, L., Kawasaki, T., Long, H., Hirata, T., Tessier-Lavigne, M., Chédotal, A., and Nguyen-Ba-Charvet, K.T. (2007). Robo1 and robo2 control the development of the lateral olfactory tract. J. Neurosci. *27*, 3037–3045.

Fraher, J.P., Dockery, P., O'Donoghue, O., Riedewald, B., and O'Leary, D. (2007). Initial motor axon outgrowth from the developing central nervous system. J. Anat. *211*, 600–611.

Friocourt, F., Lafont, A.-G., Clémence, K., Pain, B., Manceau, M., Dufour, S., and Chédotal, A. (2016). Recurrent DCC gene losses during bird evolution. Soumis.

Fujisawa, K., Wrana, J.L., and Culotti, J.G. (2007). The slit receptor EVA-1 coactivates a SAX-3/Robo mediated guidance signal in C. elegans. Science *317*, 1934–1938.

Furne, C., Rama, N., Corset, V., Chédotal, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 14465–14470.

Garrett, A.M., Jucius, T.J., Sigaud, L.P.R., Tang, F.-L., Xiong, W.-C., Ackerman, S.L., and Burgess, R.W. (2016). Analysis of Expression Pattern and Genetic Deletion of Netrin5 in the Developing Mouse. Front. Mol. Neurosci. *9*, 1–14.

Geisen, M.J., Di Meglio, T., Pasqualetti, M., Ducret, S., Brunet, J.-F., Chédotal, A., Rijli, F.M., and Meglio, T. Di (2008). Hox paralog group 2 genes control the migration of mouse pontine neurons through slit-robo signaling. Plos Biol *6*, e142.

Gilthorpe, J.D., Papantoniou, E.-K., Chédotal, A., Lumsden, A., and Wingate, R.J.T. (2002). The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. Development *129*, 4719–4728.

Golding, J.P., and Cohen, J. (1997). Border Controls at the Mammalian Spinal Cord: Late-Surviving Neural Crest Boundary Cap Cells at Dorsal Root Entry Sites May Regulate Sensory Afferent Ingrowth and Entry Zone Morphogenesis. Mol. Cell. Neurosci. *9*, 381–396.

Goulding, M. (2009). Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. Nat. Rev. Neurosci. *10*, 507–518.

Guthrie, S. (2007). Patterning and axon guidance of cranial motor neurons. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 859–871.

Gutman, C.R., Ajmera, M.K., and Hollyday, M. (1993). Organization of motor pools supplying axial muscles in the chicken. Brain Res. *609*, 129–136.

Halfter, W., Dong, S., Yip, Y.-P., Willem, M., and Mayer, U. (2002). A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis. J. Neurosci. *22*, 6029–6040.

Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. Nat. Neurosci. *14*, 1481–1488.

Hammond, R., Vivancos, V., Naeem, A., Chilton, J., Mambetisaeva, E.T., Andrews, W.D., Sundaresan, V., Guthrie, S., and Mambitisaeva, E. (2005). Slit-mediated repulsion is a key regulator of motor axon pathfinding in the hindbrain. Development *132*, 4483–4495.

Hampel, S., Chung, P., McKellar, C.E., Hall, D., Looger, L.L., and Simpson, J.H. (2011). Drosophila Brainbow: a recombinase-based fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns. Nat. Methods *8*, 253–259.

Harkmark, W. (1954). Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons. A morphological and experimental investigation of the chick embryo. J. Comp. Neurol. *100*, 115–209.

Harris, R., Sabatelli, L.M., and Seeger, M.A. (1996). Guidance cues at the Drosophila CNS midline: identification and characterization of two Drosophila Netrin/UNC-6 homologs. Neuron *17*, 217–228.

Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., and Hall, D.H. (1990). The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in C. elegans. Neuron *4*, 61–85.

His, W. (1890). NoDie entwickelung des menschlichen rautenhirns vom ende des ersten bis zum beginn des dritten monats. I. Verlängertes Mark. Bh Kön Sächs Ges D Wiss Mat Phys Kl *29*, 1–74.

Höpker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., and Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. Nature *401*, 69–73.

Hou, B., Zhang, D., Zhao, S., Wei, M., Yang, Z., Wang, S., Wang, J., Zhang, X.,

Liu, B., Fan, L., et al. (2015). Scalable and DiI-compatible optical clearance of the mammalian brain. Front. Neuroanat. *9*, 19.

Howitt, J.A., Clout, N.J., and Hohenester, E. (2004). Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit. EMBO J. *23*, 4406–4412.

Hua, L., Zhou, R., Thirumalai, D., and Berne, B.J. (2008). Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 16928–16933.

Huang, X., Ketova, T., Fleming, J.T., Wang, H., Dey, S.K., Litingtung, Y., and Chiang, C. (2009). Sonic hedgehog signaling regulates a novel epithelial progenitor domain of the hindbrain choroid plexus. Development *136*, 2535–2543.

Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., and Hedgecock, E.M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in C. elegans. Neuron *9*, 873–881.

James, G., Foster, S.R., Key, B., and Beverdam, A. (2013). The Expression Pattern of EVA1C, a Novel Slit Receptor, Is Consistent with an Axon Guidance Role in the Mouse Nervous System. PLoS One *8*, e74115.

Jaworski, A., and Tessier-Lavigne, M. (2012). Autocrine/juxtaparacrine regulation of axon fasciculation by Slit-Robo signaling. Nat. Neurosci. *15*, 367–369.

Jaworski, A., Long, H., and Tessier-Lavigne, M. (2010). Collaborative and Specialized Functions of Robo1 and Robo2 in Spinal Commissural Axon Guidance. J. Neurosci. *30*, 9445–9453.

Jen, J.C., Chan, W.-M.M., Bosley, T.M., Wan, J., Carr, J.R., Rub, U., Shattuck, D., Salamon, G., Kudo, L.C., Ou, J., et al. (2004). Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. Science *304*, 1509–1513.

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

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

Jones, C. a, London, N.R., Chen, H., Park, K.W., Sauvaget, D., Stockton, R. a, Wythe, J.D., Suh, W., Larrieu-Lahargue, F., Mukouyama, Y.-S., et al. (2008).

Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. Nat. Med. *14*, 448–453.

Kang, J.-S., Yi, M.-J., Zhang, W., Feinleib, J.L., Cole, F., and Krauss, R.S. (2004). Netrins and neogenin promote myotube formation. J. Cell Biol. *167*, 493–504.

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

Ke, M.-T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013a). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. Nat. Neurosci. *16*, 1154–1161.

Ke, M.-T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013b). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. Nat. Neurosci. *16*, 1154–1161.

Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. Cell *87*, 175–185.

Kennedy, T.E., Serafini, T., de la Torre, J., and Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. Cell *78*, 425–435.

Kennedy, T.E., Wang, H., Marshall, W., and Tessier-Lavigne, M. (2006). Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord. J. Neurosci. *26*, 8866–8874.

Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and 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.

Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in Drosophila. Cell *96*, 785–794.

Kim, M., Farmer, W.T., Bjorke, B., McMahon, S. a, Fabre, P.J., Charron, F., and Mastick, G.S. (2014). Pioneer midbrain longitudinal axons navigate using a balance of Netrin attraction and Slit repulsion. Neural Dev. *9*, 17.

Kim, M., Fontelonga, T., Roesener, A.P., Lee, H., Gurung, S., Mendonca, P.R.F.,

and Mastick, G.S. (2015). Motor neuron cell bodies are actively positioned by Slit/Robo repulsion and Netrin/DCC attraction. Dev. Biol. *399*, 68–79.

Koch, A.W., Mathivet, T., Larrivée, B., Tong, R.K., Kowalski, J., Pibouin-Fragner, L., Bouvrée, K., Stawicki, S., Nicholes, K., Rathore, N., et al. (2011). Robo4 Maintains Vessel Integrity and Inhibits Angiogenesis by Interacting with UNC5B. Dev. Cell *20*, 33–46.

Koch, M., Murrell, J.R., Hunter, D.D., Olson, P.F., Jin, W., Keene, D.R., Brunken, W.J., and Burgeson, R.E. (2000). A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization. J. Cell Biol. *151*, 221–234.

Kolodziej, P.A., Timpe, L.C., Mitchell, K.J., Fried, S.R., Goodman, C.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. Cell *87*, 197–204.

Kuwajima, T., Sitko, A. a, Bhansali, P., Jurgens, C., Guido, W., and Mason, C. (2013). ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. Development *140*, 1364–1368.

Lai, C.S.L. (2003). FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. Brain *126*, 2455–2462.

Landmesser, L., and Pilar, G. (1978). Interactions between neurons and their targets during in vivo synaptogenesis. Fed. Proc. *37*, 2016–2022.

Landmesser L (1978). The development of motor projection patterns in the chick hind limb. J Physiol.

Landsberg, R.L., Awatramani, R.B., Hunter, N.L., Farago, A.F., DiPietrantonio, H.J., Rodriguez, C.I., and Dymecki, S.M. (2005). Hindbrain Rhombic Lip Is Comprised of Discrete Progenitor Cell Populations Allocated by Pax6. Neuron *48*, 933–947.

Latil, A., Chêne, L., Cochant-Priollet, B., Mangin, P., Fournier, G., Berthon, P., and Cussenot, O. (2003). Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. Int. J. Cancer *103*, 306–315.

Laumonnerie, C., Da Silva, R. V., Kania, A., and Wilson, S.I. (2014). Netrin 1 and Dcc signalling are required for confinement of central axons within the central

nervous system. Development *141*, 594–603.

Leighton, P.A., Mitchell, K.J., Goodrich, L. V, Lu, X., Pinson, K., Scherz, P., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. Nature *410*, 174–179.

Leonardo, E.D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S.L., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Vertebrate homologues of C.elegans UNC-5 are candidate netrin receptors. Nature *386*, 833–838.

Lewis, K.E. (2006). How do genes regulate simple behaviours? Understanding how different neurons in the vertebrate spinal cord are genetically specified. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *361*, 45–66.

Li, H.S., Chen, J.H., Wu, W., Fagaly, T., Zhou, L., Yuan, W., Dupuis, S., Jiang, Z.H., Nash, W., Gick, C., et al. (1999). Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. Cell *96*, 807–818.

Li, S., Qiu, F., Xu, A., Price, S.M., and 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.

Liem, K.F., Tremml, G., and Jessell, T.M. (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. Cell *91*, 127–138.

Liem, K.F., Jessell, T.M., Briscoe, J., Acampora, D., Gulisano, M., Simone, A., Amthor, H., Connolly, D., Patel., K., Brand-Saberi, B., et al. (2000). Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. Development *127*, 4855–4866.

Liu, G., Li, W., Wang, L., Kar, A., Guan, K.-L., Rao, Y., and Wu, J.Y. (2009). DSCAM functions as a netrin receptor in commissural axon pathfinding. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 2951–2956.

Liu, Y., Stein, E., Oliver, T., Li, Y., Brunken, W.J., Koch, M., Tessier-Lavigne, M., and Hogan, B.L.. (2004). Novel Role for Netrins in Regulating Epithelial Behavior during Lung Branching Morphogenesis.

Liu, Z., Li, H., Hu, X., Yu, L., Liu, H., Han, R., Colella, R., Mower, G.D., Chen, Y., and Qiu, M. (2008). Control of precerebellar neuron development by Olig3 bHLH

transcription factor. J. Neurosci. *28*, 10124–10133.

Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and 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.S., 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.

López-Bendito, G., Flames, N., Ma, L., Fouquet, C., Di Meglio, T., Chédotal, A., Tessier-Lavigne, M., and Marin, O. (2007). Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain. J. Neurosci. *27*, 3395–3407.

Lumsden, A., and Keynes, R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. Nature *337*, 424–428.

Ly, A., Nikolaev, A., Suresh, G., Zheng, Y., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (2008). DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1. Cell *133*, 1241–1254.

Machold, R., and Fishell, G. (2005). Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. Neuron *48*, 17–24.

Marcelle, C., Stark, M.R., Bronner-Fraser, M., Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., Birchmeier, C., Bronner-Fraser, M., Christ, B., et al. (1997). Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. Development *124*, 3955–3963.

Marcos, S., Backer, S., Causeret, F., Tessier-Lavigne, M., and Bloch-Gallego, E. (2009). Differential roles of Netrin-1 and its receptor DCC in inferior olivary neuron migration. Mol. Cell. Neurosci. *41*, 429–439.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature *469*, 343–349.

Marillat, V., Chédotal, A., Cases, O., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., and Sotelo, C. (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., and Chédotal, A. (2004). The slit receptor Rig-1/Robo3 controls midline

crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. Neuron *43*, 69–79.

Martínez, S., Puelles, E., and Echevarria, D. (2012). Molecular Regionalization of the Developing Neural Tube. In The Mouse Nervous System, C. Watson, G. Paxinos, and L. Puelles, eds. (Academic Press), pp. 2–18.

Mastick, G.S., Farmer, W.T., Altick, A.L., Nural, H.F., Dugan, J.P., Kidd, T., and Charron, F. (2010). Longitudinal axons are guided by Slit/Robo signals from the floor plate. Cell Adh. Migr. *4*, 337–341.

Masuda, T., Watanabe, K., Sakuma, C., Ikenaka, K., Ono, K., and Yaginuma, H. (2008). Netrin-1 acts as a repulsive guidance cue for sensory axonal projections toward the spinal cord. J. Neurosci. *28*, 10380–10385.

Matise, M., Lustig, M., Sakurai, T., Grumet, M., and Joyner, A. (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., and Yamaguchi, Y. (2007). Netrin-1/DCC signaling in commissural axon guidance requires cell-autonomous expression of heparan sulfate. J. Neurosci. *27*, 4342–4350.

Mazelin, L., Bernet, A., Bonod-Bidaud, C., Pays, L., Arnaud, S., Gespach, C., Bredesen, D.E., Scoazec, J.-Y., and Mehlen, P. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. Nature *431*, 80–84.

Meglinski, I.., Bashkatov, A.., Genina, E.., Churmakov, D.., and Tuchin, V. (2003). The enhancement of confocal images of tissues at bulk optical immersion. Laser Phys. *13*, 65–69.

Di Meglio, T., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., Meglio, T. Di, and Chédotal, A. (2008). Molecular mechanisms controlling midline crossing by precerebellar neurons. J. Neurosci. *28*, 6285–6294.

Di Meglio, T., Vitobello, A., Yonehara, K., Hrycaj, S.M., Roska, B., Kratochwil, C.F., Vilain, N., Loche, A., Peters, A.H.F.M., Eichmann, A., et al. (2013). Ezh2 Orchestrates Topographic Migration and Connectivity of Mouse Precerebellar Neurons. Science *339*, 204–207.

Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S.J., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Bredesen, D.E. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. Nature *395*, 801–804.

Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., and Chédotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? Nat. Rev. Cancer *11*, 188–197.

Michalski, N., Babai, N., Renier, N., Perkel, D.J.J., Chédotal, A., and Schneggenburger, R. (2013). Robo3-Driven Axon Midline Crossing Conditions Functional Maturation of a Large Commissural Synapse. Neuron *78*, 855–868.

Middleton, F.A., and Strick, P.L. (1994). Anatomical evidence for cerebellar and basal ganglia involvement in higher cognitive function. Science *266*, 458–461.

Ming, G.L., Song, H., Berninger, B., Holt, C.E., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M.M. (1997). cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. Neuron *19*, 1225–1235.

Misson, J.P., Edwards, M.A., Yamamoto, M., and Caviness, V.S. (1988). Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. Dev. Brain Res. *44*, 95–108.

Mitchell, K.J., Doyle, J.L., Serafini, T., Kennedy, T.E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Dickson, B.J. (1996). Genetic analysis of Netrin genes in Drosophila: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. Neuron *17*, 203–215.

Moore, S.W., Biais, N., and Sheetz, M.P. (2009). Traction on immobilized netrin-1 is sufficient to reorient axons. Science *325*.

Morlot, C., Hemrika, W., Romijn, R. a, Gros, P., Cusack, S., and McCarthy, A. a (2007). Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the first two Ig domains from human roundabout 1 (Robo1). Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. *63*, 689–691.

Murray, A., Naeem, A., Barnes, S.H., Drescher, U., and Guthrie, S. (2010). Slit and Netrin-1 guide cranial motor axon pathfinding via Rho-kinase, myosin light chain kinase and myosin II. Neural Dev. *5*, 16.

Nakashiba, T., Ikeda, T., Nishimura, S., Tashiro, K., Honjo, T., Culotti, J.G., and Itohara, S. (2000). Netrin-G1: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. J. Neurosci. *20*, 6540–6550.

Nakashiba, T., Nishimura, S., Ikeda, T., and Itohara, S. (2002). Complementary expression and neurite outgrowth activity of netrin-G subfamily members. Mech. Dev. *111*, 47–60.

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

Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Marillat, V., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., and Chédotal, A. (2001a). Sensory axon response to substrate-bound Slit2 is modulated by laminin and cyclic GMP. Mol. Cell. Neurosci. *17*, 1048–1058.

Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Ma, L., Wang, K.H., Marillat, V., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., and Chédotal, A. (2001b). Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. J. Neurosci. *21*, 4281–4289.

Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Plump, A.S., Tessier-Lavigne, M., and Chedotal, A. (2002). Slit1 and slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. J. Neurosci. *22*, 5473–5480.

Niclou, S.P., Jia, L., and Raper, J. a (2000). Slit2 is a repellent for retinal ganglion cell axons. J. Neurosci. *20*, 4962–4974.

Niederländer, C., and Lumsden, A. (1996). Late emigrating neural crest cells migrate specifically to the exit points of cranial branchiomotor nerves. Development *122*, 2367–2374.

Niederreither, K., McCaffery, P., Dräger, U.C., Chambon, P., and Dollé, P. (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. Mech. Dev. *62*, 67–78.

Nielsen, C.M., and Dymecki, S.M. (2010). Sonic hedgehog is required for vascular outgrowth in the hindbrain choroid plexus. Dev. Biol. *340*, 430–437.

Okada, A., Charron, F., Morin, S., Shin, D.S., Wong, K., Fabre, P.J., Tessier-Lavigne, M., and Mcconnell, S.K. (2006). Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. Nature *444*, 369–373.

Okada, T., Keino-Masu, K., and 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.

Palmesino, E., Haddick, P.C.G., Tessier-Lavigne, M., and Kania, A. (2012). Genetic Analysis of DSCAM's Role as a Netrin-1 Receptor in Vertebrates. J. Neurosci. *32*, 411–416.

Pan, Y.A., Livet, J., Sanes, J.R., Lichtman, J.W., and Schier, A.F. (2011). Multicolor Brainbow imaging in zebrafish. Cold Spring Harb. Protoc. *2011*, pdb.prot5546.

Peters, W. (1961). Methoden zur Herstellung von Aufhellungspräparaten. Zool. Anz. *167*, 233–240.

Phan, K.D., Croteau, L.-P., Kam, J.W.K., Kania, A., Cloutier, J.-F., and Butler, S.J. (2011). Neogenin may functionally substitute for Dcc in chicken. PLoS One *6*, e22072.

Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Jessell, T., and Dodd, J. (1990). Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant. Development *110*, 19–30.

Prasad, A., and Hollyday, M. (1991). Development and migration of avian sympathetic preganglionic neurons. J. Comp. Neurol. *307*, 237–258.

Püschel, A.W. (1999). Divergent properties of mouse netrins. Mech. Dev. *83*, 65–75.

Van Raay, T.J., Foskett, S.M., Connors, T.D., Klinger, K.W., Landes, G.M., and Burn, T.C. (1997). TheNTN2LGene Encoding a Novel Human Netrin Maps to the Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Region on Chromosome 16p13.3.

Rajagopalan, S., Deitinghoff, L., Davis, D., Conrad, S., Skutella, T., Chédotal, A., Mueller, B.K., and Strittmatter, S.M. (2004). Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. Nat. Cell Biol. *6*, 756–762.

Rajasekharan, S., and Kennedy, T. (2009). The netrin protein family. Genome Biol 1–8.

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. J. Comp. Neurol. *145*, 61–83.

Rama, N., Dubrac, A., Mathivet, T., Ní Chárthaigh, R.-A., Genet, G., Cristofaro, B., Pibouin-Fragner, L., Ma, L., Eichmann, A., and Chédotal, A. (2015). Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization. Nat. Med.

Ramon y Cajal, S. (1892). La rétine des vertébrés. Cellule *1*, 121–247.

Ramón y Cajal, S. (1909). Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés.

Renier, N., Schonewille, M., Giraudet, F., Badura, A., Tessier-Lavigne, M., Avan, P., De Zeeuw, C.I., and Chédotal, A. (2010). Genetic Dissection of the Function of Hindbrain Axonal Commissures. PLoS Biol. *8*, e1000325.

Renier, N., Adams, E.L., Kirst, C., Wu, Z., Azevedo, R., Kohl, J., Autry, A.E., Kadiri, L., Umadevi Venkataraju, K., Zhou, Y., et al. (2016). Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. Cell *165*, 1789–1802.

Richardson, D.S., and Lichtman, J.W. (2015). Clarifying Tissue Clearing. Cell *162*, 246–257.

Ringstedt, T., Braisted, J.E., Brose, K., Kidd, T., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and O'Leary, D.D. (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.

Rodriguez, C.I., and Dymecki, S.M. (2000). Origin of the precerebellar system. Neuron *27*, 475–486.

Rossiter, J., and Fraher, J. (1990). Intermingling of central and peripheral nervous tissues in rat dorsolateral vagal rootlet transitional zones. J Neurocytol.

Ruiz de Almodovar, C., Coulon, C., Salin, P.A., Knevels, E., Chounlamountri, N., Poesen, K., Hermans, K., Lambrechts, D., Van Geyte, K., Dhondt, J., et al. (2010). Matrix-Binding Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Isoforms Guide Granule Cell Migration in the Cerebellum via VEGF Receptor Flk1. J. Neurosci. *30*, 15052–15066.

Ruiz de Almodovar, C., Fabre, P.J., Knevels, E., Coulon, C., Segura, I., Haddick, P.C.G., Aerts, L., Delattin, N., Strasser, G., Oh, W.-J., et al. (2011). VEGF Mediates Commissural Axon Chemoattraction through Its Receptor Flk1. Neuron *70*, 966–978.

Runker, A.E., Little, G.E., Suto, F., Fujisawa, H., Mitchell, K.J., and Rünker, A.E. (2008). Semaphorin-6A controls guidance of corticospinal tract axons at multiple choice points. Neural Dev. *3*, 34.

Sabatier, C., Plump, A.S., Le Ma, Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., Lee, E.Y.-H.P., 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.

Saller, M.M., Huettl, R.-E., Hanuschick, P., Amend, A.-L., Alberton, P., Aszodi, A., and Huber, A.B. (2016). The role of Sema3-Npn-1 signaling during diaphragm innervation and muscle development. J. Cell Sci. *in press*.

Salminen, M., Meyer, B.I., Bober, E., and Gruss, P. (2000). Netrin 1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear. Development *127*, 13–22.

Schmidt, E.R.E., Brignani, S., Adolfs, Y., Lemstra, S., Demmers, J., Vidaki, M., Donahoo, A.-L.S., Lilleväli, K., Vasar, E., Richards, L.J., et al. (2014). Subdomain-Mediated Axon-Axon Signaling and Chemoattraction Cooperate to Regulate Afferent Innervation of the Lateral Habenula. Neuron *83*, 372–387.

Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., and Goodman, C.S. (1993). Mutations affecting growth cone guidance in Drosophila: genes necessary for guidance toward or away from the midline. Neuron *10*, 409–426.

Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6. Cell *78*, 409–424.

Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. Cell *87*, 1001–1014.

Serapide, M.F., Zappalà, A., Parenti, R., Pantò, M.R., and Cicirata, F. (2002). Laterality of the pontocerebellar projections in the rat. Eur. J. Neurosci. *15*, 1551–1556.

Shekarabi, M., Moore, S.W., Tritsch, N.X., Morris, S.J., Bouchard, J.-F., and Kennedy, T.E. (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.

Shipp, E.L., and Hsieh-Wilson, L.C. (2007). Profiling the sulfation specificities of

glycosaminoglycan interactions with growth factors and chemotactic proteins using microarrays. Chem. Biol. *14*, 195–208.

Shirasaki, R., Katsumata, R., and Murakami, F. (1998). Change in chemoattractant responsiveness of developing axons at an intermediate target. Science *279*, 105–107.

Siedentopf, H., and Zsigmondy, R. (1903). Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. Ann. Phys.

Sievers, J., Pehlemann, F.W., Gude, S., and Berry, M. (1994). A time course study of the alterations in the development of the hamster cerebellar cortex after destruction of the overlying meningeal cells with 6-hydroxydopamine on the day of birth. J. Neurocytol. *23*, 117–134.

Silver, J., and Rutishauser, U. (1984). Guidance of optic axons in vivo by a preformed adhesive pathway on neuroepithelial endfeet. Dev. Biol. *106*, 485–499.

Silver, J., Lorenz, S.E., Wahlsten, D., and 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.

Skarnes, W.C., Moss, J.E., Hurtley, S.M., and Beddington, R.S. (1995). Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 6592–6596.

Sloan, T.F.W., Qasaimeh, M.A., Juncker, D., Yam, P.T., and Charron, F. (2015). Integration of Shallow Gradients of Shh and Netrin-1 Guides Commissural Axons. PLOS Biol. *13*, e1002119.

Sotelo, C. (2004). Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. Prog. Neurobiol. *72*, 295–339.

Sotelo, C., and Chédotal, A. (2013). Hindbrain tangential migration. In Comprehensive Developmental Neuroscience: Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections, J.L.R. Rubenstein, and P. Rakic, eds. (Elsevier Inc.), pp. 345–362.

Sotelo, C., Hillman, D.E., Zamora, A.J., and Llin??s, R. (1975). Climbing fiber deafferentation: its action on Purkinje cell dendritic spines. Brain Res. *98*, 574–581.

Spalteholz, W. (1914). Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang.

Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G.C., and Hinck, L. (2003). Netrin-1 / Neogenin Interaction Stabilizes Multipotent Progenitor Cap Cells during Mammary Gland Morphogenesis. Dev. Cell *4*, 371–382.

Staudt, T., Lang, M., Medda, R., Engelhardt, J., and Hell, S. (2007). 2,2'-thiodiethanol: a new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy. Microsc Res Tech.

Stein, E., and 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.

Stein, E., Zou, Y., Poo, M., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. Science *291*, 1976–1982.

Steinke, H., and Wolff, W. (2001). A modified Spalteholz technique with preservation of the histology. Ann. Anat. - Anat. Anzeiger *183*, 91–95.

Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. Front. Cell. Neurosci. *8*, 293.

Storm, R., Cholewa-Waclaw, J., Reuter, K., Bröhl, D., Sieber, M., Treier, M., Müller, T., and Birchmeier, C. (2009). The bHLH transcription factor Olig3 marks the dorsal neuroepithelium of the hindbrain and is essential for the development of brainstem nuclei. Development *136*, 295–305.

Susaki, E. a, Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., et al. (2014a). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. Cell *157*, 726–739.

Susaki, E. a, Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., et al. (2014b). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. Cell *157*, 726–739.

Svensson, K.J., Long, J.Z., Jedrychowski, M.P., Kajimura, S., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., Svensson, K.J., Long, J.Z., Jedrychowski, M.P., Cohen, P., et

al. (2016). A Secreted Slit2 Fragment Regulates Adipose Tissue Thermogenesis and Metabolic Function Article A Secreted Slit2 Fragment Regulates Adipose Tissue Thermogenesis and Metabolic Function. Cell Metab. *23*, 1–13.

Tainaka, K., Kubota, S.I., Suyama, T.Q., Susaki, E.A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., and Ueda, H.R. (2014). Whole-Body Imaging with Single-Cell Resolution by Tissue Decolorization. Cell *159*, 911–924.

Tamada, A., Shirasaki, R., and Murakami, F. (1995). Floor plate chemoattracts crossed axons and chemorepels uncrossed axons in the vertebrate brain. Neuron *14*, 1083–1093.

Tan, K., and Douarin, N.L.N.M. Le (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.

Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. Science *274*, 1123–1133.

Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A.G., Dodd, J., and Jessell, T.M. (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. Nature *336*, 775–778.

Thaller, C., and Eichele, G. (1987). Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. Nature *327*, 625–628.

Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L., and Lee, J. (1982). Local application of retinoic acid to the limb bond mimics the action of the polarizing region. Nature *296*, 564–566.

Timpl, R., and Brown, J.C. (1996). Supramolecular assembly of basement membranes. BioEssays *18*, 123–132.

Tosney, K.W., and Landmesser, L.T. (1985). Development of the major pathways for neurite outgrowth in the chick hindlimb. Dev. Biol. *109*, 193–214.

Tsai, P.S., Kaufhold, J.P., Blinder, P., Friedman, B., Drew, P.J., Karten, H.J., Lyden, P.D., and Kleinfeld, D. (2009). Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels. J. Neurosci. *29*, 14553–14570.

Unni, D.K., Piper, M., Moldrich, R.X., Gobius, I., Liu, S., Fothergill, T., Donahoo, A.-L.S., Baisden, J.M., Cooper, H.M., and Richards, L.J. (2012). Multiple Slits

regulate the development of midline glial populations and the corpus callosum. Dev. Biol. *365*, 36–49.

Vallstedt, A., and Kullander, K. (2013). Dorsally derived spinal interneurons in locomotor circuits. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1279*, 32–42.

Vanderhorst, V.G., and Holstege, G. (1997). Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. J Comp Neurol *382*, 46–76.

Varela-Echavarría, A., Tucker, A., Püschel, A.W., and Guthrie, S. (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. Neuron *18*, 193–207.

Vermeren, M., Maro, G.S., Bron, R., McGonnell, I.M., Charnay, P., Topilko, P., and Cohen, J. (2003). Integrity of Developing Spinal Motor Columns Is Regulated by Neural Crest Derivatives at Motor Exit Points. Neuron *37*, 403–415.

Vilz, T.O., Moepps, B., Engele, J., Molly, S., Littman, D.R., and Schilling, K. (2005). The SDF-1/CXCR4 pathway and the development of the cerebellar system. Eur. J. Neurosci. *22*, 1831–1839.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. N. Engl. J. Med. *319*, 525–532.

Wang, G., Li, Y., Wang, X., Han, Z., Chuai, M., Wang, L., Ho Lee, K.K., Geng, J., and Yang, X. (2013). Slit/Robo1 signaling regulates neural tube development by balancing neuroepithelial cell proliferation and differentiation. Exp. Cell Res. *319*, 1083–1093.

Wang, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N. a, and Tessier-Lavigne, M. (1999a). Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. J. Neurosci. *19*, 4938–4947.

Wang, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Tessier-Lavigne, M. (1999b). Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. J. Neurosci. *19*, 4938–4947.

Wang, K.H., Brose, K., Arnott, D., Kidd, T., Goodman, C.S., Henzel, W., and

Tessier-Lavigne, M. (1999c). Biochemical purification of a mammalian Slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. Cell *96*, 771–784.

Wang, V.Y., Rose, M.F., and Zoghbi, H.Y. (2005). Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. Neuron *48*, 31–43.

Wassef, M., Cholley, B., Heizmann, C.W., and Sotelo, C. (1992). Development of the olivocerebellar projection in the rat: II. Matching of the developmental compartmentations of the cerebellum and inferior olive through the projection map. J. Comp. Neurol. *323*, 537–550.

Watanabe, K., Tamamaki, N., Furuta, T., Ackerman, S.L., Ikenaka, K., and Ono, K. (2006). Dorsally derived netrin 1 provides an inhibitory cue and elaborates the "waiting period" for primary sensory axons in the developing spinal cord. Development *133*, 1379–1387.

Wentworth, L.E. (1984). The development of the cervical spinal cord of the mouse embryo. II. A Golgi analysis of sensory, commissural, and association cell differentiation. J. Comp. Neurol. *222*, 96–115.

Wiklund, L., Rossi, F., Strata, P., and van der Want, J.J. (1990). The rat olivocerebellar system visualized in detail with anterograde PHA-L tracing technique, and sprouting of climbing fibers demonstrated after subtotal olivary lesions. Eur. J. Morphol. *28*, 256–267.

Wilkinson, D.G., Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R., and Charnay, P. (1989). Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. Nature *337*, 461–464.

Williams, M.E., Lu, X., McKenna, W.L., Washington, R., Boyette, A., Strickland, P., Dillon, A., Kaprielian, Z., Tessier-Lavigne, M., and Hinck, L. (2006). UNC5A promotes neuronal apoptosis during spinal cord development independent of netrin-1. Nat. Neurosci. *9*, 996–998.

Wilson, N.H., and Key, B. (2006). Neogenin interacts with RGMa and netrin-1 to guide axons within the embryonic vertebrate forebrain. Dev. Biol. *296*, 485–498.

Wingate, R.J., and Hatten, M.E. (1999). The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. Development *126*, 4395–4404.

Wright, K.M., Lyon, K.A., Leung, H., Leahy, D.J., Ma, L., and Ginty, D.D. (2012).

Dystroglycan Organizes Axon Guidance Cue Localization and Axonal Pathfinding. Neuron *76*, 931–944.

Xu, K., Wu, Z., Renier, N., and Antipenko, A. (2014). Structures of netrin-1 bound to two receptors provide insight into its axon guidance mechanism. Science.

Yam, P.T., Langlois, S.D., Morin, S., and Charron, F. (2009). Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. Neuron *62*, 349–362.

Yamada, M., Terao, M., Terashima, T., Fujiyama, T., Kawaguchi, Y., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2007a). Origin of climbing fiber neurons and their developmental dependence on Ptf1a. J. Neurosci. *27*, 10924–10934.

Yamada, M., Terao, M., Terashima, T., Fujiyama, T., Kawaguchi, Y., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2007b). Origin of climbing fiber neurons and their developmental dependence on Ptf1a. J. Neurosci. *27*, 10924–10934.

Yamagishi, S., Yamada, K., Sawada, M., Nakano, S., Mori, N., Sawamoto, K., and Sato, K. (2015). Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain. Front. Cell. Neurosci. *9*, 1–9.

Yamakawa, K., Huot, Y.K., Haendelt, M. a, Hubert, R., Chen, X.N., Lyons, G.E., and Korenberg, J.R. (1998). DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. Hum. Mol. Genet. *7*, 227–237.

Yamamoto, M. (2003). A critical period for retinoic acid teratogenesis and loss of neurophilic migration of pontine nuclei neurons. Mech. Dev. *120*, 701–709.

Yamamoto, M., Fujinuma, M., Hirano, S., Hayakawa, Y., Clagett-Dame, M., Zhang, J., and McCaffery, P. (2005). Retinoic acid influences the development of the inferior olivary nucleus in the rodent. Dev. Biol. *280*, 421–433.

Yebra, M., Montgomery, A.M.P., Diaferia, G.R., Kaido, T., Silletti, S., Perez, B., Just, M.L., Hildbrand, S., Hurford, R., Florkiewicz, E., et al. (2003). Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. Dev. Cell *5*, 695–707.

Yee, K.T., Simon, H.H., Tessier-Lavigne, M., and O'Leary, D.M. (1999). Extension of long leading processes and neuronal migration in the mammalian brain directed by the chemoattractant netrin-1. Neuron *24*, 607–622.

Yin, Y., Sanes, J.R., and Miner, J.H. (2000). Identification and expression of mouse netrin-4.

Yin, Y., Miner, J.H., and Sanes, J.R. (2002). Laminets: Laminin- and Netrin-Related Genes Expressed in Distinct Neuronal Subsets. Mol. Cell. Neurosci. *19*, 344–358.

Yuan, S.S., Cox, L. a, Dasika, G.K., and Lee, E.Y.-H.P. (1999). Cloning and functional studies of a novel gene aberrantly expressed in RB-deficient embryos. Dev. Biol. *207*, 62–75.

Yung, a. R., Nishitani, a. M., and Goodrich, L. V. (2015). Phenotypic analysis of mice completely lacking Netrin-1. Development *142*, 3686–3691.

Zelina, P., Blockus, H., Zagar, Y., Péres, A., Friocourt, F., Wu, Z., Rama, N., Fouquet, C., Hohenester, E., Tessier-Lavigne, M., et al. (2014). Signaling Switch of the Axon Guidance Receptor Robo3 during Vertebrate Evolution. Neuron *84*, 1–15.

Zhan, X., and Ryugo, D.K. (2007). Projections of the lateral reticular nucleus to the cochlear nucleus in rats. J. Comp. Neurol. *504*, 583–598.

Zhang, J., Smith, D., Yamamoto, M., Ma, L., and McCaffery, P. (2003). The meninges is a source of retinoic acid for the late-developing hindbrain. J. Neurosci. *23*, 7610–7620.

Zhu, Y., Matsumoto, T., Mikami, S., Nagasawa, T., and Murakami, F. (2009). SDF1/CXCR4 signalling regulates two distinct processes of precerebellar neuronal migration and its depletion leads to abnormal pontine nuclei formation. Development *136*, 1919–1928.

Zhu, Y., Matsumoto, T., Nagasawa, T., Mackay, F., and Murakami, F. (2015). Chemokine Signaling Controls Integrity of Radial Glial Scaffold in Developing Spinal Cord and Consequential Proper Position of Boundary Cap Cells. J. Neurosci. *35*, 9211–9224.

Zinyk, D.L., Mercer, E.H., Harris, E., Anderson, D.J., and Joyner, A.L. (1998). Fate mapping of the mouse midbrain–hindbrain constriction using a site-specific recombination system. Curr. Biol. *8*, 665–672.