HAL
open science

Nouveau rôle de la Sémaphorine 6D et de son récepteur Plexine-A1 dans le ciblage des axones rétiniens

Delphine Prieur

To cite this version:

Delphine Prieur. Nouveau rôle de la Sémaphorine 6D et de son récepteur Plexine-A1 dans le ciblage des axones rétiniens. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS285 . tel-02370105

HAL Id: tel-02370105

https://theses.hal.science/tel-02370105v1

Submitted on 19 Nov 2019

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 158 / ED3C : Cerveau Cognition Comportement

Institut du Fer à Moulin / Equipe développement des réseaux neuronaux

Nouveau rôle de la Sémaphorine 6D et de son récepteur Plexine-A1 dans le ciblage des axones rétiniens

Par Delphine PRIEUR

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par le Dr. Alexandra REBSAM

Présentée et soutenue publiquement le 7 Décembre 2018

Devant un jury composé de :

Dr. Alain CHEDOTAL, Directeur de Recherche, Président du Jury

Dr. Fanny MANN, Directrice de Recherche, Rapportrice

Dr. Valérie CASTELLANI, Directrice de Recherche, Rapportrice

Dr. Fabrice ANGO, Directeur de Recherche, Examinateur

Dr. Patricia GASPAR, Directrice de Recherche, Examinatrice

Dr. Alexandra REBSAM, Chargée de recherche, Directrice de Thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

REMERCIEMENTS

Je remercie dans un premier temps les membres de mon jury qui ont accepté de prendre de leur temps, alors qu'ils sont très sollicités de toute part, pour évaluer mon travail : Alain Chedotal, Fanny Mann, Valerie Castellani et Fabrice Ango. C'est un honneur de pouvoir avoir votre retour sur mes résultats et je suis heureuse de pouvoir en discuter avec vous.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse qui m'ont apporté un regard extérieur sur mon projet et des discussions approfondies sur le sujet au début de chacune de ces années de thèse : Kim Nguyen-Ba-Charvet, Filippo Del Bene, Christine Métin et Fiona Francis.

Je remercie Jean-Antoine Girault, le directeur de l'Institut du Fer à Moulin, pour m'y avoir accueillie et avoir fait de cet institut un lieu de travail épanouissant. L'IFM a constitué pour moi un environnement particulièrement enrichissant que ce soit sur le plan scientifique grâce aux échanges avec de brillants chercheurs à travers les étages, ou sur le plan humain car c'est le lieu de nombreuses rencontres particulièrement importantes pour moi avec des personnes venues de tous pays.

Je remercie également Patricia Gaspar pour m'avoir intégrée dans son équipe si accueillante. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre œil aguerri sur toutes mes présentations, mes dossiers, entre autres sollicitations, pour vos conseils d'une telle précision et d'une telle efficacité que j'en suis admirative à chaque fois. Votre sens critique et vos remarques scientifiques, depuis mon M2 jusqu'en fin de thèse, m'ont aidé à me poser les bonnes questions, à m'améliorer sur de nombreux aspects. Merci d'avoir été officiellement ma directrice de thèse durant plus de 2 ans, de m'avoir permise de continuer ce projet après mon M2 et d'avoir gardé un œil sur moi à travers Alexandra.

Je remercie infiniment Alexandra Rebsam, mon encadrante, que dis-je ma directrice de thèse ! Oui enfin officiellement je peux le dire depuis peu de temps et j'en suis fière ! Car après tout, tu es celle qui a imaginé ce projet avant que j'arrive mais surtout celle qui m'a guidée, moi, petit axone rétinien tout le long de cette thèse ! Oui l'analogie est toute trouvée : Alex = La Sémaphorine idéale du doctorant 😊. Tu m'as formée à toutes les techniques en un temps record dès le début du M2, tu as su aiguiser ma réflexion scientifique, améliorer mon style d'écriture et mes communications orales. Mais surtout, tu as fait tout cela avec pédagogie, en prenant en compte ma personnalité et en me faisant confiance (#manager 2.0 !). J'ai particulièrement apprécié le fait que même lorsqu'on avait des deadlines très courtes, tu as toujours pris le temps de m'expliquer comment améliorer les choses sans les faire à ma place, ce qui m'a beaucoup appris. Tu m'as laissé m'épanouir avec juste ce qu'il fallait de suivi pour cadrer le tout dans la bonne direction. Mon avis et mes idées étaient toujours écoutés, que ça mène à des heures de discussion sur l'avenir du projet, où que ça mène à des schémas de fermeture éclair ou des posters en « cercle de vie » ! (Oui je me souviendrai longtemps de l'expression que tu as faite en découvrant ce nouveau poster ^^). Tu m'as fait implicitement ressentir que TON projet était devenu MA thèse et ça, ça a grandement participé à mon envie de venir au labo tous les jours 😊. Enfin, tu t'es sentie concernée par ma carrière dès le début et j'ai vraiment aimé pouvoir discuter de cela avec toi. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir fait assez confiance pour me laisser gérer en parallèle de ma thèse, le MBA et la coordination de BIOTechno. Voilà je m'arrête là car c'est déjà trop long. En résumé je suis bien contente que tu m'aies choisie parmi tes candidats au stage de M2 car je n'aurai pas rêvé mieux comme directrice de thèse !

Je remercie sincèrement Cédric Francius, qui fut mon référent durant une bonne partie de mon stage de M2 lorsqu'Alexandra était en congé maternité et qui a pris ce rôle très à cœur. Tu m'as appris beaucoup de chose dont la fameuse *électroporation in utero* et la biologie moléculaire pour le clonage sur une période vraiment très courte alors que ce n'était pas prévu au programme du M2. Merci de t'être autant impliqué pour moi 😊.

Je tiens également à remercier Claire Legay, qui fut pour moi une responsable de stage de M1 de choix et qui m'a depuis suivie de loin. Merci de vous être autant souciée de mon avenir après mon passage dans votre équipe, d'avoir pris le temps de me conseiller pour le choix de ma thèse et de me recommander pour ma candidature au MBA, entre autres.

Je remercie l'ensemble de l'équipe « développement des réseaux neuronaux ». Un grand merci à Aude Muzerelle pour sa gentillesse, sa disponibilité et son organisation exemplaire de tout ce qui est commun dans notre équipe ! Tu es aussi pour moi la figure emblématique de la créativité, je garde précieusement tes boucles d'oreilles faites main et je n'oublierai pas les ateliers artistiques pour la décoration originale du 2ème étage pour les fêtes de fin d'année ! Merci aussi pour toute l'aide que tu m'as apporté pour toutes les petites galères de manipes auxquelles j'ai été confrontée. Merci à Mariano, Jimmy et Teng pour avoir répondu à mes questions techniques mais pas seulement et le fait d'avoir toujours été souriants et accueillants lorsque je poussais la porte de votre bureau. Merci à Christine Laclef et Sophie Scotto pour leurs petites attentions et leur bienveillance dès que j'ai eu l'occasion de discuter avec vous au milieu de votre course sans fin entre labo et cours à l'université. Merci à Maria et Anne pour ce début de thèse à vos côtés dans le meilleur bureau de l'IFM ^^, j'ai apprécié vos conseils de jeunes chercheuses prometteuses et je suis vraiment heureuse pour ta titularisation amplement méritée d'Anne ! Merci à Christine Métin de m'avoir gardée dans le bureau des « Métin », il faut dire que votre petite équipe est particulièrement attachante ^^. Une fois que j'ai commencé à connaitre Claire puis Valentina, j'aurai été bien triste de les quitter. Merci également à Justine Masson qui est arrivée dans l'équipe en ma fin de thèse et qui fut une voisine de bureau très agréable. Merci pour tes conseils et ton humour lors de tous mes petites périodes de stress. Enfin merci à Robin et Kim Nguyen-Ba-Charvet de l'institut de la Vision avec qui j'ai apprécié discuter de nos projets respectifs lors de nos mini-team meetings.

Que dire de Valentina, Claire et Giorgia si ce n'est que nous formions à l'IFM un sacré quatuor 😊. Un immense merci à toutes les trois pour m'avoir accompagnée, écoutée, soutenue durant plus de 3 ans. Vous êtes aujourd'hui bien plus que des collègues et l'IFM n'est que le début de notre amitié ! J'ai adoré partager ces années au quotidien avec vous, faire nos virées de la pause déjeuner dont celle au fameux Picard (Merci picard d'ailleurs, le commerce de référence des IFMistes 😊). Claire je t'ai rencontrée dès le début de mon stage de M2 mais j'ai particulièrement aimé te découvrir en début de thèse, partager ton amour des sciences combinées à l'art, suivre tes protocoles que ce soit pour la réalisation de chambres de PDMS pour microscope ou pour une cuisson de moelleux au chocolat. Merci d'avoir été l'une des personnes qui a fait vivre l'IFM durant ma thèse en organisatrice experte des évènements si sympathiques de l'institut ^^ Giorgia tu m'as fait relativiser bon nombre de petits soucis durant ces 3 ans avec ton humour décapant et ton caractère si passionné que j'adore, je connais toutes tes expressions de visage par cœur et je ne connais pas une seule personne comme toi ! Valentina tu es arrivée plus tard tel un petit soleil dans le bureau avec ton grand sourire si contagieux et plus je te côtoie et plus j'ai envie de le revoir chaque jour en arrivant au labo, que dire de plus que merci d'avoir été toujours là pour moi ! Si j'ai autant apprécié ces 3 années c'est en grande partie grâce à vous et vos petites attentions, je m'estime réellement chanceuse de vous avoir rencontrées 😊.

Je remercie tout autant Mélanie, qui devint elle aussi une réelle amie sur qui j'ai pu compter que ce soit personnellement comme professionnellement. J'admire ta persévérance, ton optimisme et ton énergie débordante ! Quelle chance pour moi qu'un jour tu te sois laissée convaincre de partir au ski, initiateur de cette belle amitié ! Tu m'as toujours soutenue que ce soit pour partager mes joies comme mes remises en question. Merci énormément pour tout cela, tu as été presque un coach personnel de dernière ligne droite pour cette thèse 😉.

Un grand merci également à Imane, pour son aide considérable en biologie moléculaire. Merci de m'avoir chapotée pour mes transfections et autres étapes nécessaires pour la construction de mes plasmides. Merci d'avoir répondu à toutes mes questions, d'avoir réfléchi avec moi à mes problèmes techniques. Tu as été particulièrement pédagogue et d'une efficacité remarquable. A côté de cela, tu es pour moi l'une des rencontres inattendues à l'IFM qui ont embelli mon passage dans cet institut. Je suis vraiment heureuse que tu aies un jour accepté cette proposition de séjour à la montagne. J'ai adoré toutes nos discussions plus personnelles depuis et tes conseils emplis de sagesse. J'en profite également pour remercier Luc Maroteaux et toute son équipe (Fanny, Catherine, Ivana, Anne et les toutes nouvelles Giulia et Amina) pour les nombreux prêts de réactifs et pour l'atmosphère très joviale qui règne au 2ème étage, qu'on apprécie toujours autant partager avec vous.

Merci à Audrey et Virginie avec qui j'ai partagé avec plaisir Alexandra. Vous êtes toutes les deux parmi les personnes les plus agréables et positives que je connaisse. Merci beaucoup Audrey pour ton aide et ta bonne humeur, j'espère que ta nouvelle équipe l'apprécie tout autant que nous 😊 Virginie, j'ai vraiment apprécié ta personnalité et ta présence, même de courte durée, dans l'équipe. Tu as toujours été particulièrement appliquée et impliquée, inquiète à l'idée de mal faire pour ce premier stage (je me souviens de ta première électroporation *in utero* ^^). J'espère que tu reviendras confiante de ton stage au Canada pour une thèse avec Alexandra que je ne peux que te recommander 😊

Je remercie Mythili Savariradjane pour le temps qu'elle a pris à me former sur l'utilisation des microscopes, Theano Eirinopoulou pour son aide précieuse pour certains fichiers et les discussions d'optimisation des acquisitions pour mon projet. Merci également à Xavier Marques nouvellement arrivé sur la plateforme d'imagerie avec qui j'ai particulièrement apprécié passer de longues heures au light sheet avec toutes ses explications.

Merci également à l'équipe de gestion de l'animalerie de l'IFM et en particulier à François et Gaël pour ne pas avoir compté les heures et nous permettre de travailler dans de bonnes conditions. Merci aussi aux équipes de gestion de l'Animalerie du centre Charles Foix et de la Pitié Salpêtrière pour avoir pris soin de nos lignées de souris. Enfin je remercie aussi toute l'équipe administrative et celle logistique de l'IFM du 3ème étage et en particulier Baptiste que j'apprécie voir revenir travailler dans cet institut. Merci à tous ceux qui ont fait de l'IFM un endroit chaleureux d'entraide alliant excellence scientifique et bienveillance.

En dehors de l'institut, j'aimerais remercier Adrien, Agathe, Charlotte, Ferdinand et Romain avec qui j'ai eu la chance de partager ces 3 années de MBA en parallèle de nos thèses respectives. J'ai adoré nos discussions sur des sujets très variés et vous entendre parler de vos thèses aussi différentes soient-elles de la mienne. D'une simple promotion « Sciences et Management 7 », vous êtes aujourd'hui de réels amis et j'aime particulièrement notre petit groupe aux personnalités très complémentaires.

J'aimerai également remercier toutes les personnes avec qui j'ai interagit durant ma vie associative de doctorante via l'association Doc'up (avec une pensée particulière pour la team des afterworks pro !) mais aussi toutes les autres associations de jeunes chercheurs du réseau BIOTechno. J'ai été très fière et heureuse de porter ce beau projet qu'est le Forum BIOTechno Paris aux côtés d'Alexandra (Frazao) que je remercie particulièrement ainsi que l'ensemble de l'équipe organisatrice. Merci à Juliette, Claire et Manon d'avoir repris le flambeau car je sais qu'il est entre de bonnes mains 😉 Merci aussi à Diana et Mathieu de m'avoir soutenue en cette fin de thèse et d'avoir repris avec moi la tête du Réseau pour cette année qui commence.

Je tiens à remercier mes amis qui m'ont accompagnée et soutenue durant tout ce temps malgré le peu de temps que je leur ai accordé. Je remercie particulièrement Alexis pour sa présence à mes côtés durant bon nombre d'années avant et pendant ma thèse, notre complicité, nos discussions sur nos choix d'avenir dont celui qui nous a amené à vouloir faire nos thèses respectives et son soutien infaillible.

Merci infiniment à mon cher Alexandre avec qui j'ai tout partagé durant cette dernière année. Tu as toujours su m'écouter, me rassurer et ce même dans les moments les plus délicats. Merci de me suivre dans mes discussions passionnées sur mon projet comme sur tant d'autres sujets d'ailleurs. Tous nos moments ensemble ont été pour moi de vrais bols d'air frais, qui m'ont fait un bien fou, et qui m'ont aussi permis de prendre du recul et de repartir de plus belle. J'ai pu compter sur toi à toute heure du jour et de la nuit et je mesure la chance que j'ai de t'avoir eu près de moi cette année.

Enfin, je ne remercierai jamais assez ma petite famille, ce pilier inébranlable dans ma vie et ce aussi pour ma thèse. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de me soutenir dans tous mes choix, de m'avoir accompagnée tout au long de cette thèse dont vous avez entendu parler des centaines d'heures, de vous intéresser sincèrement à tout ce que j'entreprends. Pour tout cela et tout le reste, milles mercis !!!

SOMMAIRE

Table des Figures et Tableaux **3**
Liste des Abréviations **5**
PREAMBULE **6**
INTRODUCTION **7**
Le système visuel **8**
1.La rétine 8
2.Les cellules ganglionnaires de la rétine et leurs cibles 10
a. Les différentes sous-populations de CGRs 10
b. Projections des CGRs dans les différentes cibles et leurs fonctions 14
i. Noyau suprachiasmatique *14*
ii. Noyaux prétectaux *15*
iii. Système optique accessoire *16*
iv. Le colliculus supérieur *16*
v. Le thalamus visuel *17*
3.Cartographie des projections rétiniennes dans les principales cibles 19
a. La carte œil-spécifique 19
b. La carte rétinotopique 20
4.Développement des projections rétino-thalamiques 21
a. Fasciculation et croissance orientée de la rétine au tractus 23
b. Points de décision et changements de direction 24
i. Guidage au chiasma optique *24*
ii. Choix des cibles *25*
c. Ciblage fin ou intra-cible : rétinotopie et ségrégation 26
i. Topographie « grossière » par les signaux de guidage axonal *28*
ii. Raffinement des connexions et ségrégation œil-spécifique *30*
Les Sémaphorines et leurs récepteurs **31**
1.Présentation des Sémaphorines 31
a. La famille des Sémaphorines 31
b. Les Sémaphorines 6 33
2.Les Récepteurs aux Sémaphorines 33
a. Les Plexines 33
b. Les Neuropilines 34
c. Les autres récepteurs 35
d. Les Sémaphorines elles-mêmes 36
3.Les différents modes de transduction du signal 36
a. Signalisation principale (*trans* et *forward*) 37
i. Mécanismes principaux déclenchés en aval des Plexines *37*
ii. Mécanismes permettant de moduler cette signalisation *38*
b. Signalisation *reverse* 40
c. Signalisation *en cis* 42
4.Rôle des Sémaphorines et Plexines 43
a. Dans le système nerveux 44
i. Différenciation et migration neuronale *44*

ii. Guidage dendritique et mise en place de laminations *46*
iii. Croisement de lignes médianes par les axones *48*
iv. Guidage/ciblage axonal et interactions axone-axone *50*
v. Formation des synapses *51*
b. En dehors du système nerveux 52
i. Angiogenèse et vasculogenèse *52*
ii. Autres systèmes *53*
RESULTATS 55
1.ARTICLE 56
2.Résultats complémentaires 78
a. Test in vitro de shARN. 78
b. Effet de la surexpression rétinienne de Plexine-A1 et Sema6D dans le ciblage du CGLd. 80
c. Etude du rôle de Plexine-A1 et Sema6D dans le nombre de CGRs ipsilatérales 83
d. Etude de la lignée de souris transgéniques Sema6D-GFP et sous-populations rétiniennes 84
e. Matériel et Méthodes complémentaires 87
i. Souris Tg-Sema6D-GFP *87*
ii. Marquage rétrograde des projections retinogéniculées *87*
iii. Plasmides pour la surexpression de Sema6D et Plexine-A1 ..... *87*
iv. Tests de shARN par transfection de COS et Western-blot *88*
v. Electroporation de rétines in utéro pour la surexpression de Plexine-A1 et Sema6D *89*
vi. Immunohistochimie *89*
vii. Imagerie *90*
viii. Analyses *90*
CONCLUSION / DISCUSSION 91
1.Le CGLd des souris Sema6D -/- et Plexine-A1 -/- : modèle d'étude des mécanismes de ciblage axonal ? 92
a. Un nouveau type de phénotype. 92
b. Un mécanisme indépendant de celui de guidage au chiasma optique 93
c. Inconvénients et avantages liés à l'étude d'un tel phénotype 94
2.Lieux d'action et exclusivités dans le couple Plexine-A1 et Sema6D. 96
3.Effets non-cellulaires autonomes et sens possibles de signalisation 99
4.Interactions inter-axonales et mécanismes de ciblage 101
5.Défauts probables de branchements et/ou de choix des cibles 104
6.Sous-population de CGRs exprimant Sema6D et hypothèses la concernant 105
BIBLIOGRAPHIE 107
ANNEXES 136

Table des Figures et Tableaux

Figures

Figure 1 : Organisation schématique des neurones dans la rétine de mammifère 9

Figure 2 : Schéma des projections de différentes populations de CGRs marquées par des lignées transgéniques de souris dans les cibles visuelles sub-corticales 15

Figure 3 : Schéma illustrant l'organisation du corps genouillé latéral dorsal (CGLd) 18

Figure 4 : Schéma de la carte œil-spécifique 20

Figure 5 : Schéma de la carte rétinotopique 21

Figure 6 : Schéma des différentes étapes de développement des fibres rétiniennes dans le cerveau….. 22

Figure 7 : Schéma des étapes de la mise en place de la carte topographique 27

Figure 8 : Schéma des différentes phases de mise en place de la carte œil-spécifique 28

Figure 9 : Schéma des projections rétiniennes dans le CS combiné avec les patrons d'expression d'éphrines A et de leurs récepteurs EphA 29

Figure 10 : Schéma de la structure des différentes classes de Sémaphorines 32

Figure 11 : Représentation schématique des Sémaphorines de Vertébrés et de leurs principaux récepteurs et corécepteurs connus dans différents types cellulaires 34

Figure 12 : Illustration des voies de signalisation principales activées par les Plexines en réponse aux Sémaphorines 38

Figure 13 : Schéma des mécanismes de signalisation entre Sema6D, Plexine-A1, Sema3A et leurs corécepteurs dans la formation osseuse 40

Figure 14 : Schéma de la signalisation *reverse* entre Sema6D et Plexine-A1 durant le développement du cœur chez le poulet. 41

Figure 15 : Exemples de signalisation en cis entre Sémaphorines et Plexines 43

Figure 16 : Sema6A régule la migration des neurones granulaires du cerebellum 45

Figure 17 : Les signaux répulsifs des Sema5 et 6 via leur récepteurs Plexines-A permettent la lamination dendritique de nombreux sous-types cellulaires dans la couche plexiforme interne de la rétine 47

Figure 18 : Sema6D, Plexine-A1 et Nr-CAM interagissent pour contrôler le croisement du chiasma optique par les axones rétiniens controlatéraux 49

Figure 19 : Effet des shARN contre Plexine-A1 et Sema6D sur la surexpression de Sema6D et Plexine-A1 dans des cellules COS 80

Figure 20 : Effet de la surexpression de Plexine-A1 et de Sema6D dans la rétine sur le ciblage du CGLd… 82

Figure 21 : Effet de Plexine-A1 et Sema6D sur le nombre de CGRs projetant ipsilatéralement.. 84

Figure 22 : Identification de CGRs exprimant la Sema6D chez la souris Tg-Sema6D-GFP .. 86

Figure 23 : Modélisation du mécanisme ayant probablement lieu entre Sema6D et Plexine-A1 le long des axones rétiniens pour leur permettre de cibler correctement le CGLd. 103

Tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principaux sous-types de CGRs et de leurs caractéristiques 13

Liste des Abréviations

AMPc : Adenosine MonoPhosphate Cyclique

CGLd : Corps Genouillé Latéral dorsal

CGLv : Corps Genouillé Latéral ventral

CGR : Cellule Ganglionnaire de la Rétine

CS : Colliculus Supérieur

CTB : Sous-unité B de la Toxine Cholérique

DS-CGR : CGR sensible à la direction

E : Jour Embryonnaire

Eph : Ephrin receptor

GAP : Domaine à activité GTPase

GAP43 : Growth Associated Protein 43

GFP : Green Fluorescent Protein

GMPc : Guanosine MonoPhoshate cyclique

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

GTP : Guanosine TriPhosphate

IGL : Intergeniculate Leaflet

ipCGR : CGR intrinsèquement photosensible

KO : Knock-Out

Nr-CAM : Neuronal Cell Adhesion Molecule

NSC : Noyau Supra Chiasmatique

NTD : Noyau Terminal Dorsal

NTL : Noyau Terminal Latéral

NTM : Noyau Terminal Medial

NTO : Noyau du Tractus Optique

Nrp : Neuropiline

OPN: Olivary Pretectal Nucleus

OSNs : Neurones Sensoriels Olfactifs

P : Jour Post-natal

PKA : Protéine Kinase A

PSI : Plexine-Sémaphorine-Intégrine

RBD : Rho GTPase Binding domain

Rho : Ras homologue gene family

SAC : Starbust Amacrine Cell

SERT : Transporteur de la sérotonine

Sfrp : Secreted frizzled related protein

Shh : Sonic hedgehog

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : VEGF Receptor

VT : Ventro-Temporal

ZT : Zone de Terminaison

PREAMBULE

Durant ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes permettant le ciblage spécifique des axones rétiniens dans le cerveau murin et en particulier à un mécanisme impliquant deux protéines connues que sont la Sémaphorine 6D (Sema6D) et la Plexine-A1.

Les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs) envoient leur axone innerver différentes cibles dans le cerveau dont les deux cibles principales que constituent le corps genouillé latéral dorsal (CGLd) et le colliculus supérieur. Des résultats préliminaires ont montré des défauts de ciblage dans le CGLd par ces axones dans des souris déficientes en Sema6D ou en Plexine-A1. Ce phénotype n'étant pas comparable aux autres défauts possibles décrits précédemment dans le CGLd, j'ai cherché à mieux le caractériser et à déterminer quel(s) rôle(s) pouvaient jouer ces deux protéines durant le ciblage du CGLd. Les résultats de cette étude sont présentés dans un article, suivi de résultats complémentaires.

Pour mieux évaluer l'intérêt de tels travaux et le contexte dans lequel ils s'inscrivent, j'introduirai ces résultats par une présentation générale du système visuel puis des Sémaphorines et Plexines. Une description plus détaillée des mécanismes de guidage au niveau du chiasma optique a fait l'objet durant cette thèse d'une revue publiée dans Developmental Neurobiology, présentée en annexe.

Enfin, dans une dernière partie, je discuterai de mes résultats et proposerai des hypothèses quant aux mécanismes précis dans lesquels Sema6D et Plexine-A1 pourraient intervenir pour réguler le ciblage du CGLd par les axones rétiniens.

INTRODUCTION

Le système visuel

Le système visuel est un système complexe permettant la transmission d'informations concernant l'environnement extérieur à différents centres de traitement de ces informations dans le cerveau. Il regroupe donc à la fois la rétine, ses projections et l'ensemble des cibles du cerveau qu'elles innervent. De par la séparation anatomique des structures qui le composent (la rétine et les différentes régions du cerveau) et la précision dans l'espace des différentes projections, il constitue un modèle de choix pour étudier les mécanismes de formation des connexions neuronales. De plus, les projections rétiniennes dans le cerveau étant facilement visualisables par différentes techniques de traçage, celles-ci ont été particulièrement bien décrites et cartographiées. Un tel contexte permet donc plus facilement de déceler de fines perturbations quant au développement des connexions. Plusieurs systèmes visuels ont été particulièrement étudiés, tels que ceux du macaque, du chat, de la souris et du rat, mais aussi du poisson zèbre et de la drosophile, chacun de ces systèmes ayant ses avantages pour l'étude de certains mécanismes. Dans cette étude, je me focaliserai surtout sur le système visuel de la souris mais ferai allusion également aux études faites chez d'autres espèces en particulier lorsque celles-ci ont mis en évidence des mécanismes cellulaires de guidage et de ciblage axonal.

1. La rétine

La rétine des vertébrés est une structure composée de différentes couches : 3 couches de corps cellulaires et 2 couches dites plexiformes, s'intercalant entre les 3 autres et comportant les arborisations synaptiques de ces cellules. Dans ces différentes couches s'organisent 5 grandes classes de cellules neuronales permettant les premières étapes d'intégration de l'information visuelle (**Figure 1**).

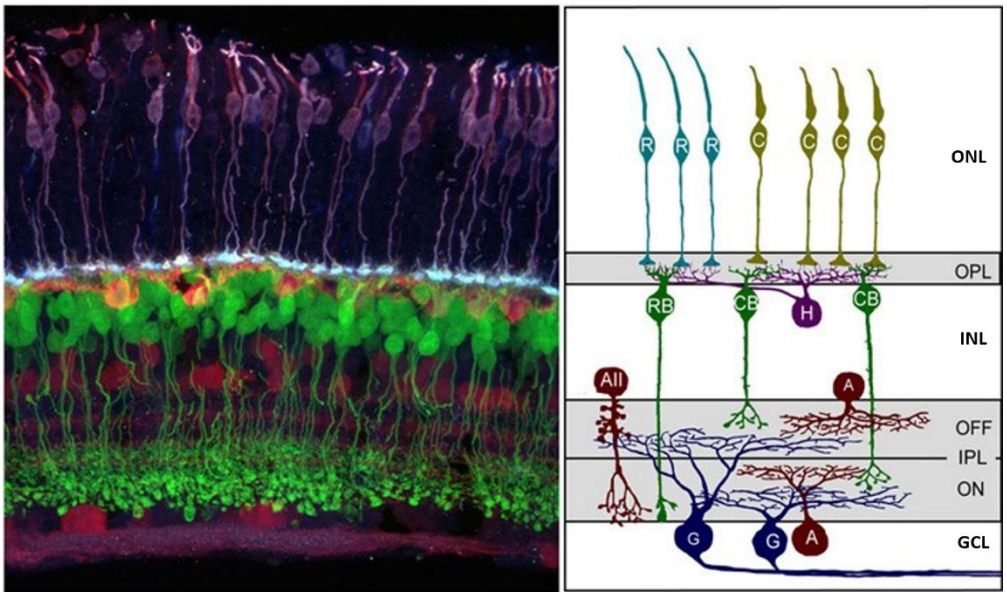


Figure 1 : Organisation schématique des neurones dans la rétine de mammifère.

(à gauche) Coupe verticale d'une rétine de souris adulte montrant les principaux types cellulaires, les différentes couches de corps cellulaires et de terminaisons synaptiques. Les photorécepteurs sont immunomarqués en violet (anti-cône arrestin), les cellules amacrines, les cellules ganglionnaires et les cellules horizontales sont marquées en rouge (anti-calbindin). La rétine provient d'une souris transgénique dans laquelle un sous-type des cellules bipolaires (ON) exprime la Yellow Fluorescent Protein (visualisée ici en vert).

(à droite) Schéma des différents types cellulaires de la rétine et des différentes couches. ONL : outer nuclear layer = couche nucléaire interne, OPL : outer plexiform layer = couche plexiforme interne, INL : inner nuclear layer =couche nucléaire interne, IPL : inner plexiform layer = couche plexiforme interne et GCL : ganglion cell layer = couche des cellules ganglionnaires. R : rod photoreceptor = bâtonnet, C : cône, H : cellule horizontale, CB et RB : cellules bipolaires connectées aux (R) bâtonnets ou (C) cônes, A : cellules amacrines, G : cellules ganglionnaires. Les photorécepteurs transduisent la lumière en signal chimique pour le transmettre aux cellules bipolaires. Ces dernières la transmettent aux cellules ganglionnaires qui l'enverront via leurs axones dans le cerveau Les cellules physiologiquement de type ON et celles de type OFF arborisent dans deux sous-couches distinctes de l'IPL. De Morgan Josh and Wong Rachel.

La couche la plus externe de la rétine contient les cellules neuronales sensibles à la lumière que sont les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) (**Figure 1**). Les cônes étant sensibles à des longueurs d'onde spécifiques, ils sont responsables de la vision de jour et des couleurs. Ils restent cependant beaucoup moins sensibles que les bâtonnets qui, eux, permettent la vision en basse luminosité. Les photorécepteurs traduisent l'information lumineuse en une information électrique puis chimique. Situés dans la couche nucléaire externe, ils la transmettent ensuite via leurs synapses au niveau de la couche plexiforme interne aux cellules bipolaires situées elles dans la 2ème couche cellulaire : la couche nucléaire interne (**Figure 1**). Cette couche comporte également des cellules horizontales capables de moduler l'activité des photorécepteurs (**Figure 1**). Parmi les cellules bipolaires, on distingue 2 grands types selon qu'elles se dépolarisent (type ON) ou s'hyperpolarisent (type OFF) suite à

une augmentation d'intensité lumineuse. Les cellules bipolaires contactent enfin au sein de la couche plexiforme interne les cellules ganglionnaires de la rétine (CGRs). Celles-ci composent la couche la plus interne de la rétine et envoient leur axone jusqu'au cerveau (**Figure 1**). A ce niveau, ce sont les cellules amacrines qui jouent le rôle de modulateur de l'activité sur les CGRs (**Figure 1**).

Ces différentes étapes d'intégration et de modulation de l'information au sein de la rétine sont d'autant plus importantes que ces CGRs sont ensuite les seules cellules de la rétine qui projettent leur axone hors de l'œil formant le nerf optique pour transmettre l'information au cerveau. Il en existe plus de 30 sous-types différents recevant les données de plus de 70 types d'interneurones. Ainsi ces sous-populations de CGRs sont spécialisées dans la transmission d'informations concernant une caractéristique du champ visuel, comme le mouvement, la direction ou le contraste des couleurs (Sanes & Masland, 2015; Baden *et al.*, 2016).

2. Les cellules ganglionnaires de la rétine et leurs cibles

Toutes les cellules ganglionnaires sont des neurones glutamatergiques situés dans la même couche de la rétine qui porte leur nom, sauf quelques rares exceptions : les displaced-CGRs que l'on retrouve dans la couche plexiforme interne et la couche nucléaire interne (Dräger & Olsen, 1980, 1981; Balkema & Dräger, 1990). Les CGRs arborisent dans la couche plexiforme interne et envoient leur axone dans une ou plusieurs cibles visuelles du cerveau. Elles expriment certaines protéines qui leur sont spécifiques et celles-ci peuvent donc servir de marqueur tels que la protéine membranaire Thy1 (Barnstable & Dräger, 1984), les facteurs de transcription Brn3 (Xiang *et al.*, 1995; Badea *et al.*, 2009), et la protéine de liaison à l'ARN RBPMS (Rodriguez *et al.*, 2014). Toutefois, les différentes caractéristiques cellulaires ont permis d'identifier jusqu'à présent plus de 30 sous-types de CGRs présentés ci-dessous **(Tableau 1)**

a. Les différentes sous-populations de CGRs

Actuellement la classification des CGRs repose sur 4 critères : une morphologie équivalente (le critère historique défini historiquement par Ramon y Cajal), des propriétés physiologiques communes, une expression génique similaire et enfin un espacement régulier entre les cellules d'une même sous-population. En effet ce dernier critère est un bon moyen de

confirmer l'existence d'une sous-population, car la rétine a la particularité que les CGRs d'un même type ont tendance à former une mosaïque, c'est-à-dire qu'elles évitent les cellules du même type et semblent indifférentes aux autres (Wässle & Riemann, 1978; Rockhill *et al.*, 2000; Reese, 2008; Kay *et al.*, 2012). Certains critères sont souvent liés, des études ayant montré un lien entre la morphologie de certains types de CGRs avec leur réponse physiologique (Cleland *et al.*, 1975). Des chercheurs ont ensuite réussi à lier ces caractéristiques morphologiques et physiologiques à l'expression de molécules (Karten & Brecha, 1983). Suite à la démocratisation de l'analyse moléculaire qui s'est ajoutée aux 3 précédents critères, les CGRs ont pu être subdivisées en au moins 25 sous-types voire plus de 30 sous-types en comptant ceux qui nécessitent une caractérisation plus précise (Roska & Meister, 2014). Depuis, l'avancée d'une nouvelle approche d'analyse moléculaire reposant sur le séquençage d'ARN à l'échelle d'une seule cellule (singe cell RNA sequencing) (Jaitin *et al.*, 2014; Klein *et al.*, 2015; Macosko *et al.*, 2015) a permis d'étudier les différences moléculaires entre chaque CGR individuelle. Ainsi l'analyse de plus de 6000 CGRs via des algorithmes de regroupement a déterminé de nouveaux sous-types amenant ce chiffre à 40 aujourd'hui (Rheaume *et al.*, 2018). Etant donné le grand nombre de critères, on peut difficilement déterminer lesquels sont déterminants en premier pour établir une hiérarchie parmi les différents sous-types de CGRs, la répartition en sous-groupe ci-aprés ne reflète donc pas forcément une hiérarchie dans les processus de différenciation des CGRs.

Les propriétés physiologiques ont permis de distinguer dans un premier temps 3 types de CGRs selon qu'elles répondent préférentiellement à une augmentation (ON) ou une diminution (OFF) de l'intensité lumineuse ou indifféremment aux deux (ON-OFF) (Kuffler, 1953). Ceci est étroitement lié à leurs connexions avec des cellules bipolaires déjà elles-même ON ou OFF. Il s'avère que les dendrites des ON-CGRs arborisent au niveau de la couche plexiforme interne dans sa moitié la plus interne tandis que les OFF-CGRs arborisent dans la moitié la plus externe (Famiglietti & Kolb, 1976; Famiglietti *et al.*, 1977). On distingue ensuite différents types de CGRs ON-OFF, ou ON dites « Directionally selective » car elles sont préférentiellement sensibles aux mouvements allant dans une des 4 directions (ventral, dorsal, nasal et temporal) (Weng *et al.*, 2005) (**Tableau 1***).* Les CGRs « alpha » ont été identifiées par des caractéristiques moléculaires mais partagent certaines caractéristiques physiologiques des ON ou OFF-CGRs. Parmi elles, on distingue chez la souris les sON-CGRs, les sOFF-CGRs et les tOFF-CGRs selon leurs propriétés physiologiques (Réponse soutenue ou transitoire) (Murphy & Rieke, 2006). Parmi les sous-types principaux de CGRs,

on distingue également les ipCGRs par le fait que ces CGRs sont intrinsèquement photosensibles car elles contiennent une opsine (la mélanopsine) : On en compte 5 sous-types (M1 à M5). En dehors de ces types de CGRs les plus connus, on retrouve encore de nombreux sous-types comme par exemple les J-CGRs, F-miniON et F-miniOFF-CGRs, les CGRs W3B, celles « supprimées » par contraste. Les principaux sous-types sont présentés de façon plus détaillée ci-aprés dans le **Tableau 1.**

A ces différents sous-types relativement bien décrits jusqu'à présent s'ajoutent aujourd'hui les sous-types identifiés par analyse fonctionnelle systématique telle que l'ont fait Baden *et al.* en 2016 (identifiant au moins 32 sous-types fonctionnels) et par séquençage d'ARN unicellulaire tel que l'ont présenté Rheaume *et al.* 2018, identifiant plus de 40 sous-types moléculairement distincts. Si la plupart de ces données se rejoignent sur les sous-types de CGRs les plus connus, le chevauchement des critères recensés concernant les nouveaux sous-types découverts reste encore à prouver par des analyses plus ciblées.

Ces différentes sous-populations de CGRs, de par leurs propriétés intrinsèques mais aussi par le fait qu'elles reçoivent des informations provenant de plus de 70 types d'interneurones sont ainsi le support d'informations spécialisées dans différents types de perceptions comme la direction, l'intensité ou le contraste. Elles envoient alors leur axone hors de l'œil dans le nerf optique qui transporte ainsi de nombreuses représentations parallèles de l'environnement visuel, chacune d'elle étant destinée à une ou plusieurs régions du cerveau capables de l'analyser.

Nom	Marqueurs ou lignée	Morphologie	Physiologie	Projections
ON-OFF DS-CGRs (ou PV0) dorsales	CART, Cdh6-CreER	ON OFF DS-CGR ventrale	Réponse à la diminution et l'augmentation de l'intensité et à une direction préférentielle du mouvement.	CGLd, CGLv, NTO, NTD, SC, zona incerta
ON-OFF DS-CGRs (ou PV0) ventrales	CART, HB9-GFP, BD-CreER,Cdh6-CreER			
ON-OFF DS-CGRs (ou PV0) nasales	CART, DRD4-GFP, THRH-GFP, MMP17			
ON-OFF DS-CGRs (ou PV0) temporales	CART			
W3B (ou LED)	Sdk2-CreER, TYW3		Réponse à un objet se mouvant dans le champ visuel	CS
ON DS-CGRs ventrales	SPIG1-GFP, Hoxd10-GFP	ON CGR	Réponse à l'augmentation de l'intensité et à une direction préférentielle du mouvement.	NTO, NTD
ON DS-CGRs dorsales	Hoxd10-GFP			
ON DS-CGRs nasales	HoxD10-GFP			
sOFF α CGRs = PV6	Spp1, Kcng4-cre, TYW7	tOFF α	Réponse soutenue à la diminution de l'intensité	CGLd, CS
tOFF α CGRs = PV5	Spp1, Kcng4-cre, TYW7, CB2-GFP		Réponse transitoire à la diminution de l'intensité	
ON α CGRs = ipCGRs M4 = PV1	Spp1, Kcng4-cre, low Opn4	M4	Réponse à l'augmentation de l'intensité, et photosensibles	IGL, CGLd, OPN
ipCGRs M1	Opn4	M1	Sont elles-mêmes photosensibles	Brn3- : NSC Brn3 + : IGL et NSC, et OPN
ipCGRs M2	Opn4	M2		IGL, NSC, OPN
ipCGRs M3	Opn4 (faible)	M3		IGL, OPN
ipCGRs M5	Opn4 (faible)	M5		
J-CGRs = PV7 *(= OFF DS-CGRs)*	JAM-B-CreER		Réponse à un stimulus allant de leur soma vers leurs dendrites	CGLd, SC

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principaux sous-types de CGRs et de leurs caractéristiques.

Abréviations : Cdh6 : cadherin 6, CART : cocaine- and amphetamine-regulated transcript, DS-CGRs : cellules ganglionnaires sélectives à la direction, GFP : green fluorescent protein, JAM-B : junctional adhesion molecule B, J-CGRs : CGRs JAM-B-positives, MMP17 : matrix metalloprotease 17, Opn4 : melanopsin,CGRs : cellules ganglionnaires de la rétine, PV : contenant de la paravalbumine. Adapté de Dhande et al. 2015; Sanes and Masland 2015.

b. Projections des CGRs dans les différentes cibles et leurs fonctions

Environ 46 régions reçoivent des afférences directes de CGRs (Morin & Studholme, 2014). Ces régions font partie de différents circuits neuronaux que l'on peut scinder en 3 grandes voies : les circuits subcorticaux qui régissent l'état physiologique général de l'animal (comportant par exemple la gestion des cycles circadiens), les circuits permettant les comportements réflexes comme les mouvements oculaires pour la stabilisation de l'image, et ceux codant pour des caractéristiques visuelles plus complexes pour la formation d'une image notamment dans le corps genouillé latéral dorsal (CGLd) et la vision consciente comme dans le colliculus supérieur. Je décrirai donc ci-après les cibles principales, leur fonction connue dans l'un de ces circuits et les sous-types de CGRs qui y projettent.

i. Noyau suprachiasmatique

La première cible que rencontre le tractus optique longeant le cerveau est le noyau suprachiasmatique (NSC) **(Figure 2)**. Situé juste au-dessus du chiasma optique, ce noyau constitue la région de l'horloge biologique du cerveau. Le rythme du NSC correspond à un cycle de 24 heures et est synchronisé avec la lumière grâce aux CGRs l'innervant (Welsh *et al.*, 2010; Lucas *et al.*, 2012; Morin, 2013; LeGates *et al.*, 2014). Les projections rétiniennes principales allant dans le NSC proviennent des ipCGRs (Gooley *et al.*, 2001; Berson *et al.*, 2002; Hattar *et al.*, 2002, 2006), ces cellules étant indispensables pour le photo-entrainement circadien (Göz *et al.*, 2008; Güler *et al.*, 2008; Hatori *et al.*, 2008). Le NSC reçoit principalement des projetions des ipCGRs M1 et M2 innervant des territoires spécifiques (Abrahamson & Moore, 2001; Baver *et al.*, 2008; Ecker *et al.*, 2010) **(Figure 2).** De plus, le manque d'expression du facteur de transcription Brn3 dans les ipCGRs M1 irait de pair avec leur projection dans le NSC, celles l'exprimant allant dans d'autres régions (Chen *et al.*, 2011). Ainsi, à côté de leur rôle dans le cycle circadien, les ipCGRs projettent selon leurs sous-types dans de nombreuses autres régions que le NSC (Hattar *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2011; Münch & Kawasaki, 2013).

De manière intéressante, le NSC reçoit des axones rétiniens ipsilatéraux et controlatéraux en proportion presque équivalente alors que tous les noyaux reçoivent majoritairement des projections controlatérales. Ceci est dû à certaines ipCGRs controlatérales qui peuvent innerver les deux cotés du NSC par une branche collatérale. De plus, ces ipCGRs projettent également vers d'autres régions du cerveau (Fernandez *et al.*, 2016) **(Figure 2)**

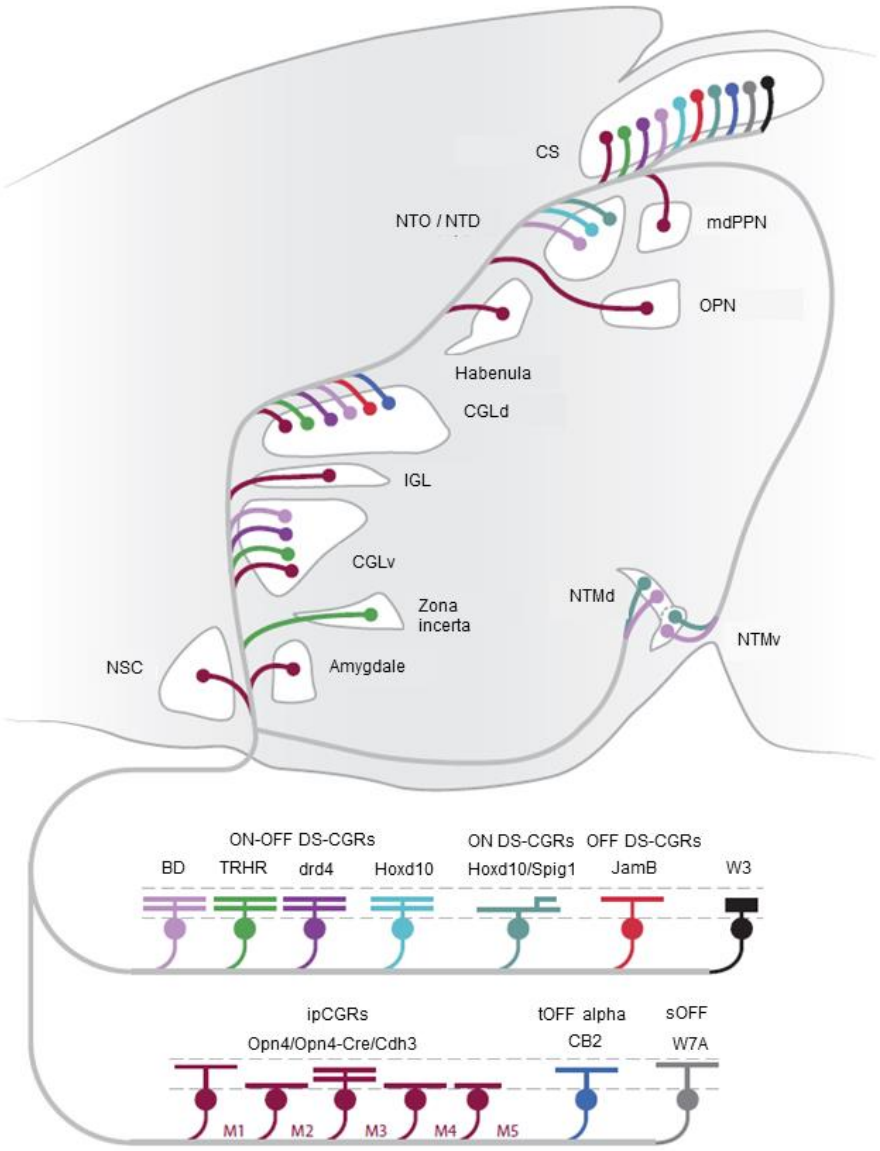


Figure 2 : Schéma des projections de différentes populations de CGRs marquées par des lignées transgéniques de souris dans les cibles visuelles sub-corticales.

Pour simplifier le schéma, les projections des ipCGRs ont été fusionnées en une seule. La localisation des arbres dendritiques des CGRs dans la rétine est schématisée entre les pointillés délimitant l'IPL. Abréviations: CGLd : corps genouillé lateral dorsal, CGLv : corps genouillé lateral ventral, CS : colliculus supérieur, DS-CGRs : cellules ganglionnaires sensibles à la direction, IGL : intergeniculate leaflet, ipCGRs :cellules ganglionnaires photosensibles, mdPPN : medial division of the posterior pretectal nucleus, NTMd : noyau terminal medial dorsal, NTMv : noyau terminal medial ventral, NTO/NTD : noyaux du tractus optique et terminal dorsal, OPN : olivary pretectal nucleus, NSC : noyau suprachiasmatique, sOFF : OFF soutenue; tOFF : OFF transitoire; D'après Dhande et al. 2015.

ii. Noyaux prétectaux

Parmi les cibles principales recevant aussi des afférences des ipCGRs, se trouvent les noyaux prétectaux (olivary pretectal nucleus : OPN). Cette région régit le réflexe pupillaire

(Trejo & Cicerone, 1984; Distler & Hoffmann, 1989a, 1989b; Young & Lund, 1994; Gamlin & Clarke, 1995; Gamlin *et al.*, 1995; Gamlin, 2006). Ce réflexe de contraction ou de dilatation de la pupille permet d'ajuster la quantité de lumière entrant dans l'œil afin d'optimiser la vision (Campbell & Gregory, 1960). Les ipCGRs sont responsables de ce reflexe (Ecker *et al.*, 2010) et sont les seules CGRs projetant dans l'OPN (Mao *et al.*, 2014; Sweeney *et al.*, 2014). La périphérie de l'OPN reçoit principalement les afférences des ipCGRs M1 Brn3+ tandis que le cœur de l'OPN est innervé par d'autres ipCGRs telles que les M2 (Hattar *et al.*, 2002, 2006; Baver *et al.*, 2008; Ecker *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011) **(Figure 2).**

iii. Système optique accessoire

Le système optique accessoire se compose de différents noyaux : Le noyau du tractus optique (NTO), et les noyaux terminaux dorsal, médial et latéral (NTD, NTM et NTL). Ces noyaux semblent être importants pour les réflexes optocinétiques, qui permettent de stabiliser les images perçues en compensant les mouvements de la tête ou des yeux qui peuvent perturber l'analyse de l'image. Les CGRs projetant dans ces régions ont été impliquées dans ces mouvements réflexes (Simpson, 1984; Giolli *et al.*, 2006; Yonehara *et al.*, 2008, 2009; Distler & Hoffmann, 2011; Dhande *et al.*, 2013). Les ON DS-CGRs constituent les afférences rétiniennes principales du système accessoire de la souris (Yonehara *et al.*, 2008; Dhande *et al.*, 2013). En plus des ON DS-CGRs, le système accessoire reçoit également des afférences de ON-OFF DS-CGRs (Kay *et al.*, 2011; Dhande *et al.*, 2013). Le NTM, jouant un rôle dans les mouvements compensatoires verticaux reçoit ainsi les projections de ON-OFF DS-CGRs sensibles aux mouvements vers le bas. (Kay *et al.*, 2011). Le NTO, jouant un rôle dans les mouvements oculaires horizontaux, il reçoit des afférences de ON-OFF DS-CGRs sensibles aux mouvements lents vers l'avant (Dhande *et al.*, 2013) et l'arrière (Kay *et al.*, 2011) **(Figure 2)**.

iv. Le colliculus supérieur

Le Colliculus supérieur (CS) est une des cibles les plus distales des CGRs. Elle est située à la surface dorsale du mésencéphale et est partiellement recouverte par le cortex visuel. Cette structure est homologue au tectum chez les oiseaux et Vertébrés à sang froid. C'est une structure multi-sensorielle de 7 couches, et la partie dédiée au système visuel se trouve dans les couches les plus superficielles (Dhande & Huberman, 2014). Cette structure

intégrative est ainsi importante pour la génération de nombreuses réactions motrices, que ce soit pour le mouvement des yeux, de la tête, de comportements défensifs, etc. (Ingle, 1973; Sahibzada *et al.*, 1986; Dean *et al.*, 1988, 1989; Ellard & Goodale, 1988; Northmore *et al.*, 1988; Westby *et al.*, 1990; Sparks, 2002; Gandhi & Katnani, 2011). Pour permettre cela, le CS se connecte au thalamus, au pont, au tronc cérébral et à la moelle épinière (Drager & Hubel, 1975a, 1975b; Dräger & Hubel, 1976; Westby *et al.*, 1990).

Concernant la partie visuelle du CS, plus de 90% des CGRs projettent dans cette cible chez la souris (Linden & Perry, 1983; Hofbauer & Dräger, 1985) et les différents sous-types de CGRs innervent différentes couches du CS (Dhande & Huberman, 2014). Dans la moitié supérieure du CS on retrouve les projections des ON, OFF et ON-OFF DS-CGRs (Kim *et al.*, 2008; Huberman *et al.*, 2009; Kay *et al.*, 2011; Rivlin-Etzion *et al.*, 2011). La moitié inférieure du CS reçoit, elle, préférentiellement les afférences des ipCGRs et CGRs alpha (Hattar *et al.*, 2006; Huberman, Feller, *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2010; Ecker *et al.*, 2010) **(Figure 2)**. De plus, une portion de neurones de la couche superficielle du CS visuel organisés en colonne (comme observé chez d'autres espèces) répondent spécifiquement à des stimuli orientés dans une direction particulière (Wang *et al.*, 2009, 2010; Gale & Murphy, 2014; Feinberg & Meister, 2015). Ce type de réponse pourrait être dû à la combinaison d'afférences de CGRs sélectives pour l'orientation et sélectives pour la direction ou à une propriété du CS (Wang *et al.*, 2010; Ahmadlou & Heimel, 2015; Feinberg & Meister, 2015). Il existe ainsi au sein du CS plusieurs cartes correspondant à différentes caractéristiques de l'environnement visuel.

v. Le thalamus visuel

Les cibles rétiniennes principales du thalamus visuel comprennent 3 régions : Les noyaux genouillés latéraux (ventral : CGLv et dorsal : CGLd) et les feuillets inter géniculés latéraux (IGL pour « intergeniculate leaflet »). Bien que le CGLd ait été la cible la plus étudiée, le CGLv est assez comparable en taille et reçoit, tout comme l'IGL, des afférentes de multiples CGRs y compris des ipCGRs (Hattar *et al.*, 2006; Ecker *et al.*, 2010) **(Figure 2).**

Le CGLd est la cible la plus importante du thalamus car elle relaie les informations au cortex visuel (couche IV) permettant la vision consciente et la construction d'image. Il forme avec le CS la voie majoritaire de transmission des informations visuelles (Usrey & Alitto, 2015). En effet une grande partie des CGRs innervent les 2 cibles à la fois : elles innervent

par une branche le CS puis via la croissance d'une branche collatérale le CGLd (Dhande *et al.*, 2011). Le CGLd reçoit les afférences de nombreux sous-types de CGRs et celles-ci sont organisées en couches (Huberman, Manu, *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008, 2010; Huberman *et al.*, 2009; Ecker *et al.*, 2010; Kay *et al.*, 2011; Rivlin-Etzion *et al.*, 2011; Dhande & Huberman, 2014). On distingue la région du cœur et la région périphérique du CGLd, chacune recevant les projections de sous-populations spécifiques de CGRs **(Figure 3)**.

Le cœur reçoit les afférences de CGRs ressemblant aux alpha mais non sensibles à la direction (Huberman, Feller, *et al.*, 2008), de CGRs supprimées par contraste (Ivanova *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014) et de ipCGRs M4 (Brown *et al.*, 2010; Ecker *et al.*, 2010; Estevez *et al.*, 2012). Les ipCGRs M4 ont par ailleurs été montrées comme essentielles à la perception des contrastes (Schmidt *et al.*, 2014), alimentant ainsi l'idée que les ipCGRs peuvent, en plus de leur rôle dans les cycles circadiens et les réflexes, moduler la perception des images. Il s'avère que les réponses à la lumière via la mélanopsine des CGRs peuvent stimuler et influencer près de 40% des neurones du CGLd (Brown *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2014). La périphérie est innervée préférentiellement par de multiples sous-types de CGRs sensibles à la direction (Kim *et al.*, 2008, 2010; Huberman *et al.*, 2009; Kay *et al.*, 2011; Rivlin-Etzion *et al.*, 2011). Cette sous-régionalisation du CGLd par les types d'afférences que ces régions comportent correspondrait également à une répartition différente de sous-types de neurones thalamiques (Krahe *et al.*, 2011; Seabrook *et al.*, 2013; Bickford *et al.*, 2015) **(Figure 3)**.

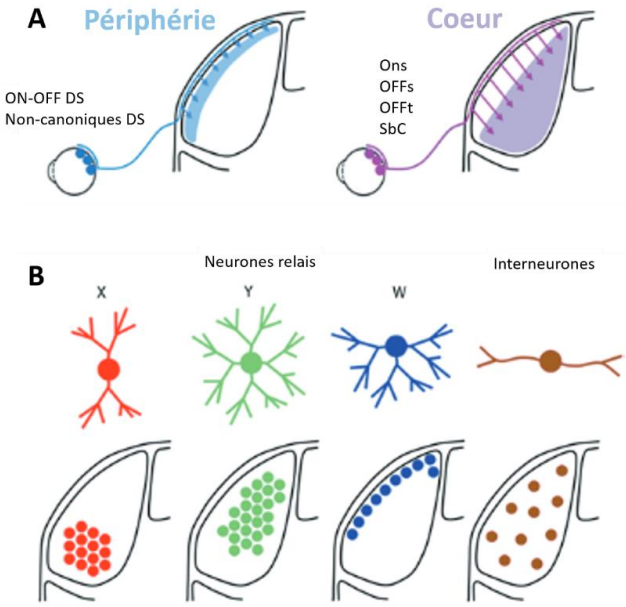


Figure 3: Schéma illustrant l'organisation du corps genouillé latéral dorsal (CGLd).

(A) Schéma des projections de différents sous-types de CGRs en fonction de la zone du CGLd. La périphérie reçoit les afférences des ON-OFF DS-CGRs et CGRs non canoniques et le cœur celles des DS-CGRs ON et OFF et des CGRs supprimées par contraste. (B) Architecture dendritique des différents types de neurones thalamiques (relais) (X, Y, W) et des interneurones ainsi que leur répartition préférentielle dans le CGLd.

Adapté de Kerschensteiner and Guido 2017.

Il existe deux sous-types principaux de cellules thalamiques : les neurones thalamiques (90%) dits « relais » et les interneurones (10%) (Arcelli *et al.*, 1997). Seuls les neurones thalamiques envoient leur axone hors du CGLd et projettent dans le cortex visuel. L'analyse morphologique et physiologique des neurones thalamiques (Rafols & Valverde, 1973; Parnavelas *et al.*, 1977; Jaubert-Miazza *et al.*, 2005; Krahe *et al.*, 2011; Seabrook *et al.*, 2013; El-Danaf *et al.*, 2015) a permis de distinguer 3 classes qui ressemblent fortement à celles déjà décrites chez le chat à savoir les X (bi-coniques), Y (symétriques), et W (hémisphérique) (Friedlander *et al.*, 1981; Stanford *et al.*, 1981, 1983; Krahe *et al.*, 2011). Les X préfèrent la région ventrale du CGLd, les Y se trouvent plutôt au centre du cœur et les W exclusivement à la périphérie (Krahe *et al.*, 2011; Bickford *et al.*, 2015) **(Figure 3)**.

3. Cartographie des projections rétiniennes dans les principales cibles

Si le CGLd reçoit des afférences provenant de diverses sous-populations de CGRs de façon organisée, il s'avère également que toutes ces projections sont organisées au sein du CGLd suivant 2 autres critères, menant ainsi à 2 types de cartographie, l'une dite « œil-spécifique » (Rakic, 1976; Jaubert-Miazza *et al.*, 2005) et l'autre « rétinotopique » (Pfeiffenberger *et al.*, 2006; Piscopo *et al.*, 2013). Ces cartes concernent principalement le CGLd et le CS, la majorité des CGRs projetant dans le CS et une grande partie d'entre elles innervant également le CGLd (Dhande *et al.*, 2011).

a. La carte œil-spécifique

En envoyant leur axone hors de l'œil formant ainsi le nerf optique, les axones des CGRs des 2 yeux se retrouvent au chiasma optique. A cet endroit, la plupart des axones des CGRs vont aller du côté opposé du cerveau (projections controlatérales) tandis que les autres axones vont continuer du même côté (projections ipsilatérales) (Petros et al 2008). Les axones rétiniens des deux yeux se regroupent ensuite de chaque côté en un tractus optique qui innerve les différentes cibles visuelles du cerveau (dont le CGLd et le CS). La souris possède des projections ipsilatérales réduites (3 à 5 % des projections de la rétine) (Petros *et al.*, 2008) en comparaison avec l'humain (40 %) **(Figure 4)**.

Dans le CGLd et le CS, les axones ipsilatéraux et controlatéraux innervent des régions bien distinctes au sein de ces deux structures et cette carte œil-spécifique est essentielle à la vision binoculaire (Rakic, 1976; Jaubert-Miazza *et al.*, 2005). Les CGRs controlatérales,

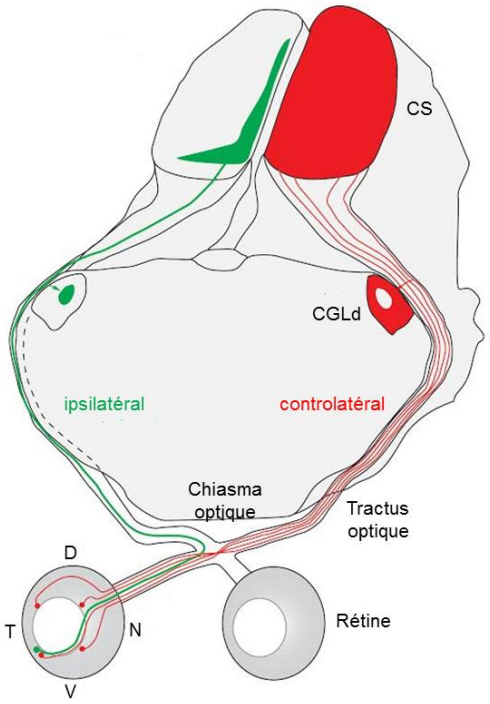
réparties dans toute la rétine, innervent la totalité de la surface du CS et quasiment toute celle du CGLd à l'exception du territoire minoritaire innervé par les CGRs ipsilatérales. Ces dernières sont quant à elles localisées principalement dans le quadrant ventro-temporal (VT) de la rétine et innervent un point central du CGLd. Puis dans le CS, elles innervent une zone restreinte dans une couche plus profonde du CS que celle des projections controlatérales (Godement *et al.*, 1984) **(Figure 4)**.

Par ailleurs, même s'il est avéré que chez les rongeurs, la majorité du CGLd est contrôlé par l'œil controlatéral (Reese, 1988; Grubb & Thompson, 2003), de récentes études ont montré une forte incidence de réponses binoculaires de neurones thalamiques pouvant pour certains d'entre eux recevoir jusqu'à 36 afférences de CGRs différentes (Howarth *et al.*, 2014; Santiago Rompani *et al.*, 2017).

Figure 4 : Schéma de la carte œil-spécifique

Les projections ipsilatérales et controlatérales occupent des territoires bien ségrégés dans leurs cibles. Les projections ipsilatérales (en vert) occupent une petite région centrale dans le corps genouillé latéral dorsal (CGLd) et les projections controlatérales (en rouge) innervent tout le reste de la cible. Concernant le Colliculus supérieur, les projections controlatérales occupent la couche superficielle (stratum griseum superficiale) alors que les projections ipsilatérales innervent une couche plus profonde (stratum opticum). Les territoires innervés par ces dernières forment des amas tout le long de l'axe médio-latéral du CS antérieur et un amas plus caudal dans le CS médial.

D'aprés Assali, Gaspar, and Rebsam 2014.



b. La carte rétinotopique

La carte rétinotopique reflète le fait que les CGRs de régions voisines de la rétine projettent précisément et respectivement dans des régions voisines du CGLd, puis de même dans le CS permettant ainsi une bonne représentation spatiale de l'environnement. Ainsi, les CGRs de la région temporale de la rétine projettent dans la région medio-dorsale du CGLd et antérieure du CS et celles de la région nasale de la rétine projettent dans la région ventro-latérale du CGLd et postérieure du CS **(Figure 5)** (Pfeiffenberger *et al.*, 2006).

Grâce à ce type de carte, et plus particulièrement dans le CS ou la disposition des cellules voisines recevant des afférences de cellules voisines s'effectue sur un même plan (en 2D), les chercheurs ont ainsi pu déterminer précisément certains facteurs moléculaires ou physiologiques importants dans la mise en place de ces connexions et donc dans les processus de guidage axonal, de ciblage et de ségrégation des connexions (McLaughlin & O'Leary, 2005; Cang & Feldheim, 2013; Kirkby *et al.*, 2013; Ackman & Crair, 2014; Triplett, 2014).

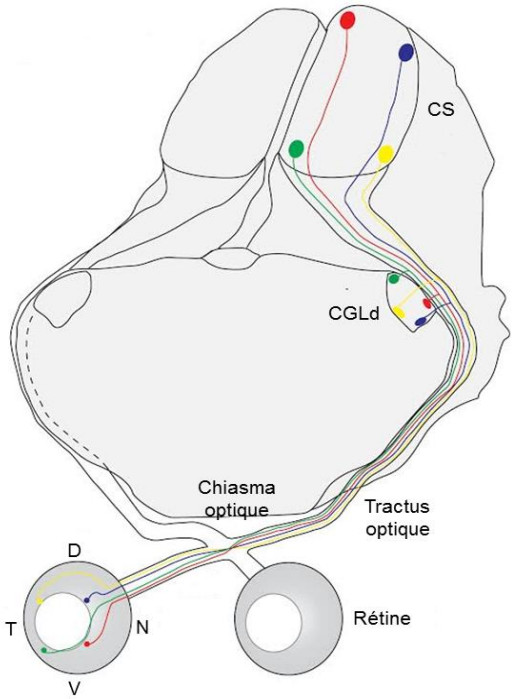


Figure 5 : Schéma de la carte rétinotopique.

Les CGRs voisines dans la rétine connectent des cellules voisines dans les cibles. les CGRs de la région temporale de la rétine projettent dans la région medio-dorsale du CGLd et antérieure du CS et celles de la région nasale de la rétine projettent dans la région ventro-latérale du CGLd et postérieure du CS.

De Assali et al. 2014.

La formation de ces connexions visuelles précises est le résultat de nombreuses étapes au cours du développement allant de la génération des CGRs, la croissance de leur axone, leur fasciculation et leur guidage jusqu'à leur cible pour finir par un raffinement des connexions, que je détaillerai ci-dessous.

4. Développement des projections rétino-thalamiques

Dans un premier temps, les CGRs se différencient à partir de leurs progéniteurs dès le jour embryonnaire (E)11 et jusqu'à la naissance ou jour post-natal (P)0 avec un pic de production autour de E14,5 (Dräger, 1985; Hufnagel *et al.*, 2010). Les CGRs ipsilatérales naissent parmi les premières de E11 à E16, les CGRs controlatérales se différenciant de E11 à E19 (Marquardt & Gruss, 2002). Aussitôt la différenciation terminée, les axones des CGRs vont croître sur la membrane interne de la rétine en direction du disque optique pour sortir de l'œil. Ils continuent alors leur route dans le nerf optique jusqu'à rejoindre, entre E12 et P0, la

ligne médiane au chiasma optique que les CGRs controlatérales vont traverser et les CGRs ipsilatérales éviter pour innerver l'hémisphère du cerveau situé du même côté que leur œil d'origine (**Figure 6**). Mises à part les ipCGRs allant innerver les noyaux suprachiasmatiques situés juste au-dessus, les autres axones rétiniens se rejoignent ensuite dans le tractus optique pour aller innerver leurs différentes cibles, la majorité d'entre eux allant dans le CS et CGLd. Ces deux principales cibles sont innervées à partir de E16 par les axones controlatéraux et seulement à partir de P0 pour les ipsilatéraux pourtant générés en premier (Godement *et al.*, 1984). Dans ces cibles, juste après l'innervation (à P3) les projections controlatérales occupent l'ensemble de la cible s'entremêlant avec les projections ipsilatérales. Ces projections se ségrégent ensuite via des mécanismes de raffinement des connexions durant les deux premières semaines post-natales pour former les deux territoires bien distincts observés sur la carte œil-spécifique.

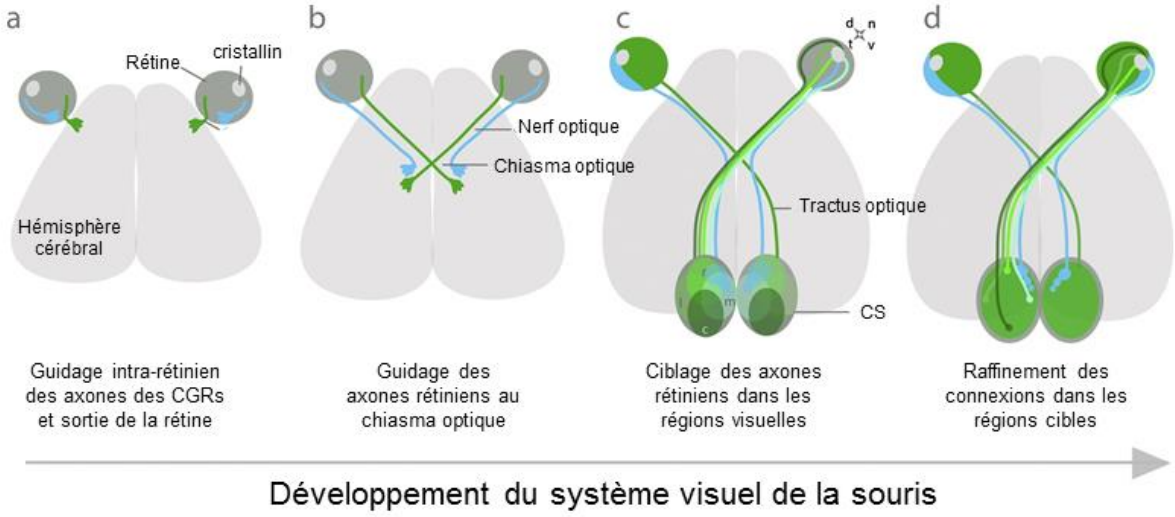


Figure 6 : Schéma des différentes étapes de développement des fibres rétiniennes dans le cerveau.

Une fois différenciées, les CGRs envoient leur axone à la surface interne de la rétine vers le disque optique puis hors de l'œil formant le nerf optique. Ils sont ensuite guidés jusqu'au chiasma optique. A cet endroit, la plupart des axones (en vert) croisent le chiasma pour projeter dans l'hémisphère controlatéral du cerveau tandis que quelques axones (en bleu, situés dans la région ventro-temporale de la rétine) l'évitent pour innerver le côté dit ipsilatéral. De chaque côté les axones se rejoignent et fasciculent formant le tractus optique allant innerver les différentes cibles (ici seul le CS est représenté). Une fois dans la cible, les axones arborisent de façon excessive menant à l'entremêlement des projections qui se raffinent par la suite et se ségrégent. d : dorsal, v : ventral, n : nasal, t : temporal, r : rostral, c : caudal, m : médial, l : latéral. D'après Herrera and Erskine 2017.

Durant leur cheminement vers leur cible, les axones rétiniens sont soumis à 3 grands types de mécanismes que je détaillerai ci-après : (a) la fasciculation des axones et leur croissance organisée au sein d'un nerf ou d'un tractus, (b) des choix de direction aux points cruciaux tels que le chiasma et leurs cibles, et (c) un ciblage plus fin couplé à l'affinage des

connexions au sein des cibles (**Figure 6**). L'ensemble de ces processus est rendu possible grâce à l'action combinée de molécules dites de guidage, des mécanismes d'interaction cellulaire et activité-dépendants.

a. Fasciculation et croissance orientée de la rétine au tractus

Suite à leur différenciation, dès le début de la croissance des axones rétiniens, ceux-ci sont déjà contraints à la surface interne de la rétine et guidés vers le disque optique pour l'entrée dans le nerf optique. Différentes molécules de guidage permettent ces mécanismes et la plupart d'entre elles sont redondantes et impliquées dans plusieurs des mécanismes décrits dans cette partie. Parmi les principales on citera les Slits et leur récepteur Robo2 (Erskine *et al.*, 2000; Niclou *et al.*, 2000; Ringstedt *et al.*, 2000; Thompson, Barker, *et al.*, 2006; Thompson, Camand, *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2009). Les Secreted frizzled related proteins Sfrp1 et 2 (Marcos *et al.*, 2015), des proteoglycanes (Brittis *et al.*, 1992; Hu, 2001; Hussain *et al.*, 2006; Piper *et al.*, 2006; Conway *et al.*, 2011; Ogata-Iwao *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2012), des molécules d'adhésion cellulaires comme L1 (Brittis *et al.*, 1996) et ALCAM (Weiner *et al.*, 2004), Sonic hedgehog (Sánchez-Camacho & Bovolenta, 2008), la netrine-1 et son recepteur DCC (Deiner *et al.*, 1997) ainsi que les récepteurs EphBs et Bmp receptor 1b (Birgbauer *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003).

Une fois entrés dans le nerf ou le tractus optique, les axones des CGRs sont là encore guidés par diverses molécules pour leur permettre de se maintenir dans leur axe et de rester groupés. Que ce soit dans le nerf, le tractus optique ou la formation du chiasma, les Slit et Srfps sont essentielles pour ces mécanismes (Erskine *et al.*, 2000; Plump *et al.*, 2002; Thompson, Barker, *et al.*, 2006; Thompson, Camand, *et al.*, 2006; Plachez *et al.*, 2008; Marcos *et al.*, 2015). D'autres molécules semblent participer à ce mécanisme sur une partie du chemin seulement comme Sema5A dans le nerf (Oster *et al.*, 2003), Islr2 dans le tractus optique et le chiasma optique (Panza *et al.*, 2015), et le facteur Sonic Hedgehog (Shh) (Sánchez-Camacho & Bovolenta, 2008). Celles-ci sont importantes pour une décussation correcte des axones rétiniens au niveau du chiasma optique.

A côté de ces signaux plutôt inhibiteurs pour maintenir les axones dans le bon axe, d'autres facteurs favorisent leur croissance dans la bonne direction. Par exemple, la protéine Vax1 secrétée par les cellules au chiasma optique (Bertuzzi *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2014) et Sonic hedgehog (Sánchez-Camacho & Bovolenta, 2008) aident les axones à atteindre le

chiasma. Puis une fois le chiasma passé, l'expression par les CGRs de la Growth Associate protein GAP-43 (Sretavan & Kruger, 1998; Zhang *et al.*, 2000) ou de DSCAM (Bruce *et al.*, 2017) leur permet d'atteindre leurs cibles.

b. Points de décision et changements de direction

i. Guidage au chiasma optique

Au niveau du chiasma optique, les axones rétiniens rencontrent une barrière de cellules gliales de part et d'autre d'une bordure de neurones du diencéphale ventral. Ces derniers sont essentiels pour la formation du chiasma et du tractus optique (Sretavan *et al.*, 1995) en grande partie car ils expriment une gamme de protéines de surface cellulaire (Marcus & Mason, 1995; Chung *et al.*, 2000). Cette ligne médiane et les cellules qui la composent constituent une barrière qui impose un choix de direction aux axones rétiniens. La majorité des CGRs la croisent et sont appelées CGRs controlatérales tandis que d'autres non, appelées ipsilatérales. Pour cela, elles expriment différents gènes et répondent ainsi différemment aux signaux présents au chiasma optique (Wang *et al.*, 2016). L'ensemble des mécanismes de guidage au chiasma optique est détaillé dans une revue publiée dans Developmental Neurobiology et présentée en annexe (Prieur & Rebsam, 2017), et seuls les principaux processus sont évoqués ci-après.

Ainsi seules les CGRs controlatérales vont exprimer certaines molécules favorisant le croisement du chiasma comme la Neuropiline 1 (Nrp1) (un récepteur du vascular endothelial growth factor, VEGF-A exprimé au chiasma) (Erskine *et al.*, 2011; Tillo *et al.*, 2015). Les CGRs controlatérales expriment également Plexine-A1 et Nr-CAM qui interagissent avec le complexe que forment la Sémaphorine 6D (Sema6D) et Nr-CAM exprimées par les cellules gliales et Plexine-A1 exprimée par les neurones de la ligne médiane pour leur permettre de croiser le chiasma optique (Kuwajima *et al.*, 2012). L'expression spécifique de ces protéines résulte d'une détermination de l'identité cellulaire des CGRs avant le croisement par différents facteurs de transcription (Pak *et al.*, 2004; Quina *et al.*, 2005; Triplett *et al.*, 2014; Kuwajima *et al.*, 2017). A l'inverse, les CGRs ipsilatérales, localisées dans le quadrant VT de la rétine et se différenciant à partir de E14,5, expriment spécifiquement le facteur de transcription Zic2 et celui-ci est déterminant pour leur projection du côté ipsilatéral (Herrera *et al.*, 2003; Garcia-Frigola *et al.*, 2008). Zic2 induit, entre autres, l'expression dans les CGRs ipsilatérales du récepteur EphB1 qui interagit avec l'ephrine-B2 exprimée par les cellules

gliales du chiasma, induisant une répulsion et le détournement de ces CGRs du chiasma optique (Williams *et al.*, 2003; Garcia-Frigola *et al.*, 2008).

Des CGRs précoces (appelées Early-born) provenant de la rétine dorso-centrale, arrivent au chiasma avant l'expression de ces signaux répulsifs, dès E12,5 et certaines d'entre elles projettent tout de même du côté ipsilatéral. Contrairement à celles projetant controlatéralement, elles ne vont pas toutes jusqu'aux cibles et disparaissent à la fin du développement (Insausti *et al.*, 1984; Dräger, 1985; Colello & Guillery, 1990; Guillery *et al.*, 1995; Marcus & Mason, 1995; Soares & Mason, 2015). Ces CGRs ipsilatérales précoces résulteraient donc peut-être d'une erreur de guidage rectifiée par la suite durant le développement ou pourraient être des axones pionniers servant de guides aux autres axones arrivant plus tardivement, comme cela a été suggéré chez le poisson zèbre (Pittman *et al.*, 2008). On notera également que certaines ipCGRs peuvent innerver bilatéralement le NSC (Fernandez *et al.*, 2016). Le NSC n'étant totalement innervé qu'après P10 (McNeill *et al.*, 2011), il semble probable que ces projections bilatérales innervent le NSC plus tard durant le développement que les autres CGRs, une fois que les signaux répulsifs sont diminués à la ligne médiane.

ii. Choix des cibles

Un autre point important de décision par les axones se situe au niveau des cibles, car les axones auront des comportements différents à leur approche : y entrer pour les innerver ou continuer leur chemin. La liste exhaustive des protéines impliquées dans les mécanismes indiquant à chaque type de CGRs quelles cibles elles doivent innerver est loin d'être déterminée, mais certaines d'entre-elles ont été découvertes récemment.

Par exemple, il s'avère que la cadhérine 6 (Cdh6) exprimée par certaines CGRs (regroupant des CGRs de différents sous-types) est nécessaire pour qu'elles reconnaissent leurs cibles et y projettent, ces dernières exprimant aussi la cadhérine 6 (le CGLd, l'IGL, l'OPN, certains noyaux prétectaux, le NTM, et le CS). De plus, chez les mutants n'exprimant pas la Cdh6, les CGRs normalement Cdh6-positives ne reconnaissent plus leurs cibles et finissent par former des terminaisons ectopiques au sein du CS (Osterhout *et al.*, 2011). La Reelin est également importante pour le ciblage du CGLv et de l'IGL dans lesquels elle est sélectivement exprimée (elle ne l'est pas dans le CGLd). En effet, certaines ipCGRs expriment Dab1, une protéine activée par la Reelin et l'expression de la Reelin et de Dab1 est

nécessaire pour que ces ipCGRs projettent dans leurs cibles, le CGLv et l'IGL (Su *et al.*, 2011).

Concernant le guidage vers le système accessoire, la contactine 4 est spécifiquement exprimée dans les CGRs y projetant (les ON-DS-CGRs marquées par la lignée HoxD10-GFP) et s'avère déterminante pour leur projection dans le NTO, via un mécanisme impliquant le peptide amyloïde APP (Osterhout *et al.*, 2015). La Sema6A est importante, elle, dans les ON-DS-CGRs pour leurs projections ciblées vers le NTM et partiellement vers le NTD. Ces CGRs sont attirées vers le NTM qui exprime Plexine-A2 et Plexine-A4, via un mécanisme de signalisation dite « *reverse* » dans lequel Sema6A semble être le récepteur (Sun *et al.*, 2015). Plus précisément durant le développement, en l'absence de Sema6A, les axones des ON-DS-CGRs arrivent près du NTM mais de façon défasciculée et plus dispersée et n'arrivant pas à se connecter, la plupart de ces DS-CGRs meurent (Sun *et al.*, 2015).

Enfin de nouveaux travaux suggèrent de façon plus générale que le choix des cibles par les CGRs dépend aussi en grande partie du moment de leur naissance et de celui de croissance de leur axone. Les CGRs nées en premier feraient plus d' « erreurs » dans leur choix de cible que celles nées plus tard, pour lesquelles on observe beaucoup moins d'innervation transitoire de certaines cibles. Ainsi les CGRs Cdh3 positives qui innervent leurs cibles durant la fin de la période embryonnaire, subissent par la suite la rétraction de CGRs dans certaines cibles (comme le CGLd). Les CGRs Hoxd10 positives arrivent plus tard et n'innervent aucune cible de façon transitoire. Les CGRs DRD4 innervent, elles, leurs cibles (CGLd et CS) en début de période post-natale et ne font qu'une erreur en innervant transitoirement le NTO (Osterhout *et al.*, 2014). Cependant, les mécanismes qui sous-tendent ces processus d'innervation transitoire et de rétraction dans le choix des cibles restent encore incompris.

c. Ciblage fin ou intra-cible : rétinotopie et ségrégation

Comme mentionné auparavant, les CGRs qui projettent dans les principales cibles (le CGLd et le CS, servant à la vision « consciente »), les innervent de façon précise, selon 2 cartes : œil-spécifique et rétinotopique. Ces caractéristiques existent aussi dans d'autres cibles mais y sont moins étudiées. La carte rétinotopique est d'ailleurs particulièrement étudiée au niveau du CS car celle-ci est observable en 2 dimensions contrairement au CGLd.

Lorsque les CGRs rejoignent le CS, la topographie se met en place en plusieurs étapes durant les 2 premières semaines post-natales chez la souris. La première phase est une phase d'expansion où les axones rétiniens entrent dans le CS pour rejoindre sa partie la plus caudale. Ensuite, des branches interstitielles poussent de ces axones afin d'innerver une zone de terminaison (ZT) puis celle-ci se précise par le retrait des branches inappropriées (Feldheim & O'Leary, 2010) (**Figure 7**).

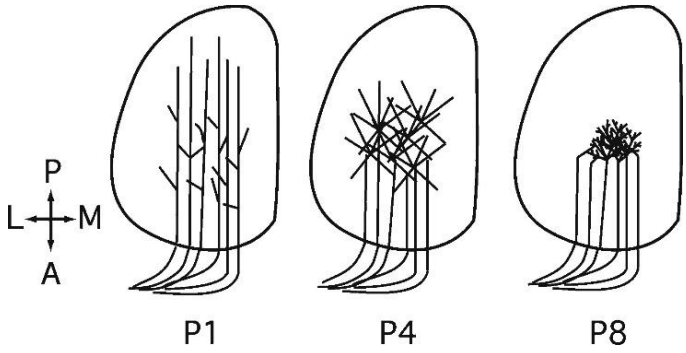


Figure 7 : Schéma des étapes de la mise en place de la carte topographique.

Les axones venant de la rétine temporale sont distribués dans tout le CS à P1. Ils forment ensuite des branches interstitielles vers la région qu'ils doivent innerver (dans la partie rostrale du CS) avec quelques branches inappropriées déjà rétractées à P4. A P8, après les étapes de raffinement des connexions, ils innervent spécifiquement une zone terminale précise. P : postérieur, A : antérieur, L : latéral, M : médial. De Assali et al. 2014.

Concernant la carte œil-spécifique, elle se met également en place en plusieurs étapes, les axones ipsilatéraux et controlatéraux se mélangeant à P3 après la phase d'innervation dans le CGLd et le CS, puis se ségrégant petit à petit jusqu'à former deux régions parfaitement distinctes à P14. Ce processus, tout comme pour la rétinotopie, implique une arborisation étendue puis un raffinement des connexions par rétraction des branches inutiles **(Figure 8)**. Si certains mécanismes de raffinement des projections peuvent être spécifiques à cette distribution ipsilatérale versus controlatérale des projections, l'innervation des différentes zones semble être déterminée par les mécanismes contrôlant la topographie, les axones ipsilatéraux localisés dans la rétine ventrotemporale projetant dans la région rostro-médiale du CS.

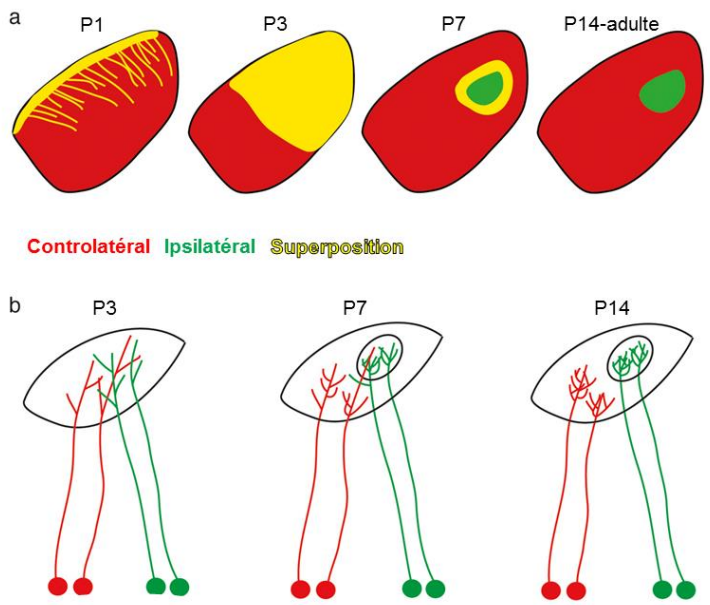


Figure 8 : Schéma des différentes phases de mise en place de la carte œil-spécifique.

A P1, les axones controlatéraux recouvrent l'ensemble du CGLd et les axones ipsilatéraux commencent à l'innerver. A P3, les deux types d'axones se mélangent dans une vaste région du CGLd (en jaune). A P7, certaines branches ipsilatérales surnuméraires ont déjà commencé à se rétracter. Enfin à P14, les axones controlatéraux et ipsilatéraux arborisent précisément dans deux domaines distincts dans le CGLd.

De Assali et al. 2014.

i. Topographie « grossière » par les signaux de guidage axonal

La mise en place des zones de terminaison repose principalement sur une combinaison de signaux répulsifs via différentes ephrines et leurs récepteurs Ephs exprimés en gradients dans la rétine comme dans le CS. Au niveau de la rétine, les CGRs expriment les récepteurs EphA5 et EphA6 selon un gradient temporo-nasal (T > N) (Carreres *et al.*, 2011) tandis que le CS exprime un gradient rostro-caudal (R > C) du ligand répulsif éphrine-A5 (Frisén *et al.*, 1998). A l'inverse, il existe des gradients opposés d'éphrine-A5 (N > T) dans la rétine et de récepteurs EphAs dans le CS (McLaughlin & O'Leary, 2005) (**Figure 9**). Ces protéines éphrines-A et leurs récepteurs sont importants pour la mise en place des zones de terminaison selon l'axe rostro-caudal, leur délétion via des souris simple, double voire triple KO induisant un déplacement des zones de terminaisons sur le plan rostro-caudal (Feldheim *et al.*, 2004; Suetterlin & Drescher, 2014). De plus récents travaux ont ensuite montré que la répulsion inter-axonale via les éphrines-A est aussi impliquée dans la mise en place de la topographie (Suetterlin & Drescher, 2014). En effet, la délétion conditionnelle de l'éphrine-A5 seulement dans le CS ne suffit pas à induire des défauts de ciblage majeurs dans le CS alors que la délétion de l'éphrine-A5 à la fois dans le CS et la rétine induit la formation par les axones temporaux de plusieurs zones de terminaisons au lieu d'une seule ciblée dans le CS (Suetterlin & Drescher, 2014). L'éphrine-A5 présente dans les axones rétiniens des CGRs nasales est donc aussi importante pour la mise en place de la topographie rostro-caudale.

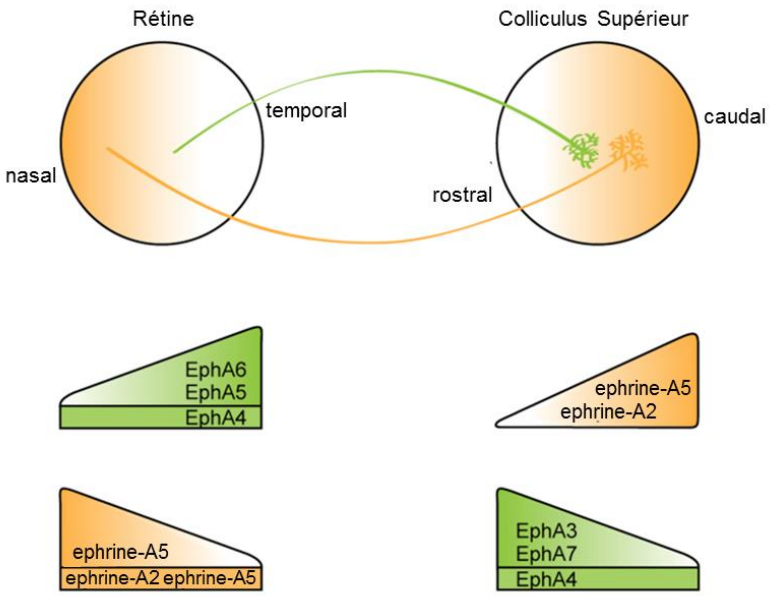


Figure 9 : Schéma des projections rétiniennes dans le CS combiné avec les patrons d'expression d'éphrines A et de leurs récepteurs EphA.

Ces molécules s'expriment selon des gradients ou de façon uniforme au sein du CS et de la rétine.

Le gradient orange sur le schéma représentant la rétine et le CS, représente l'expression uniquement de l'ephrin A5 comme exemple pour plus de clarté.

De Suetterlin and Drescher 2014

Tandis que les EphAs et ephrines A mettent en place la rétinotopie selon l'axe rostro-caudal, les EphBs et ephrines B la mettent en place sur l'axe latéro-médial. EphB1 et EphB2 sont exprimées dans la rétine selon un gradient ventro-dorsal (V > D) et les ephrines B1 et B2 dans le SC selon un gradient médio-latéral (M > L) (Hindges *et al.*, 2002; McLaughlin *et al.*, 2014). Comme pour les EphAs et ephrines A, les ephrines B et EphB ont aussi des gradients opposés au sein de chaque structure. Certaines molécules d'adhésion semblent interagir avec cette signalisation entre ephrines et EphBs, telles que L1 (une molécule d'adhésion interagissant avec le cytosquelette, exprimée dans les CGRs et le SC) (Dai *et al.*, 2012) et ALCAM, exprimée dans le SC (Buhusi *et al.*, 2009). La voie Wnt semble elle aussi impliquée dans la rétinotopie de cet axe medio-latéral, les signaux Wnt du colliculus médial repoussant les CGRs ventrales via le récepteur Ryk, exprimé préférentiellement dans la rétine ventrale (Schmitt *et al.*, 2006).

Une autre famille de protéines : les Teneurines / Ten m, semblent impliquées dans le ciblage intra-cible, leur délétion induisant une altération de la topographie et particulièrement celle des axones ipsilatéraux (Leamey *et al.*, 2007; Dharmaratne *et al.*, 2012). Enfin ces mécanismes de mise en place de la rétinotopie semblent faire intervenir une synthèse locale de protéines dans les cônes de croissance des axones rétiniens (Shigeoka *et al.*, 2016).

ii. Raffinement des connexions et ségrégation œil-spécifique

Après l'établissement de la topographie approximative des CGRs dans le CS par les molécules de guidage, les axones des CGRs subissent un raffinement poussé de leurs terminaisons durant les 2 premières semaines post-natales. Ce processus ne semble pas dépendre de molécules de guidage (Benjumeda *et al.*, 2013) ou de facteurs neurotrophiques (Cohen-Cory, 1999) mais de l'activité rétinienne.

Ainsi, même avant l'ouverture des yeux (P13) et le début de la vision chez la souris, il existe déjà une activité spontanée dans la rétine (Galli & Maffei, 1988). Ce sont des vagues d'activité spontanée initiées par les cellules amacrines étoilées, qui partent de régions aléatoires mais préférentiellement dans la rétine ventrotemporale (Ackman *et al.*, 2012) et se propagent dans toute la rétine (Feller *et al.*, 1996). Elles permettent une activation corrélée des CGRs voisines dans la rétine et dépendent de l'acétylcholine. En effet, le blocage des récepteurs nicotiniques, que ce soit via l'injection oculaire d'épibatidine ou dans des souris beta2-KO, perturbe ces vagues (Cang *et al.*, 2005; Sun, Speer, *et al.*, 2008; Sun, Warland, *et al.*, 2008). Cette perturbation induit un raffinement incomplet des connexions retino-colliculaires que ce soit au niveau de la carte œil-spécifique ou celle rétinotopique (Rossi *et al.*, 2001; Muir-Robinson *et al.*, 2002; Pfeiffenberger *et al.*, 2006; Rebsam *et al.*, 2009) confirmant que ces vagues d'activité spontanées contrôlent le raffinement fin des connexions rétiniennes dans les cibles.

Toutefois les mécanismes en aval de cette activité rétinienne permettant le raffinement des connexions restent à déterminer comme par exemple la nécessité ou non de la libération synaptique de neurotransmetteurs par les axones rétiniens (Nicol *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2011). Ainsi, il semble que la neurotransmission soit nécessaire pour le raffinement de la carte oeil-spécifique mais pas forcément pour la carte rétinotopique (Assali *et al.*, 2017). Enfin, le transporteur de la sérotonine (SERT) semble lui aussi jouer un rôle important dans la ségrégation œil-spécifique. Celui-ci ne s'exprime que dans les CGRs ipsilatérales (son expression étant contrôlée par Zic2), et favoriserait la rétraction des axones ipsilatéraux (Bastos *et al.*, 1999; Upton *et al.*, 1999; García-Frigola & Herrera, 2010).

Les Sémaphorines et leurs récepteurs

1. Présentation des Sémaphorines

a. La famille des Sémaphorines

La première Sémaphorine fut découverte en 1992 sous le nom de Fascilin IV, ayant une activité répulsive sur les neurones durant le développement des membres de l'insecte (Kolodkin *et al.*, 1992) et qui s'avèrera par la suite être l'homologue de la Sémaphorine (Sema) 3A chez les vertébrés. Parallèlement, une autre étude chez le poulet a identifié une protéine induisant la collapse de cônes de croissances de neurones, appelée alors Collapsin-1 et qui s'avère elle aussi être l'homologue de la Sema3A (Luo *et al.*, 1993). Si les Sémaphorines ont d'abord été décrites comme importantes dans le développement du système nerveux, elles ont depuis été impliquées dans de nombreux autres mécanismes. Elles semblent être exprimées dans bien d'autres systèmes du corps si ce n'est tous, tels que les systèmes respiratoire, cardiovasculaire, endocrinien, gastro-intestinal ou musculaire. De façon générale, elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires et participent ainsi au contrôle de l'angiogenèse, de la morphogénèse, de la différentiation, de la prolifération, de l'adhésion et de la migration cellulaire.

En 1999, elles ont été officiellement classifiées et l'on distingue depuis 8 classes de Sémaphorines (1 à 7 et la classe V) regroupant près de 30 membres. Les classes 1 et 2 n'existent que chez les Invertébrés, les classes 3, 4, 6 et 7 seulement chez les Vertébrés, la classe 5 est mixte et s'exprime chez les Vertébrés et Invertébrés, et enfin la classe V a été identifiée dans les virus. Parmi les Sémaphorines de Vertébrés on distingue également les Sémaphorines sécrétées (la classe 3), celles avec une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (la classe 7) et celles transmembranaires (classes 4, 5 et 6) (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999) (**Figure 10**).

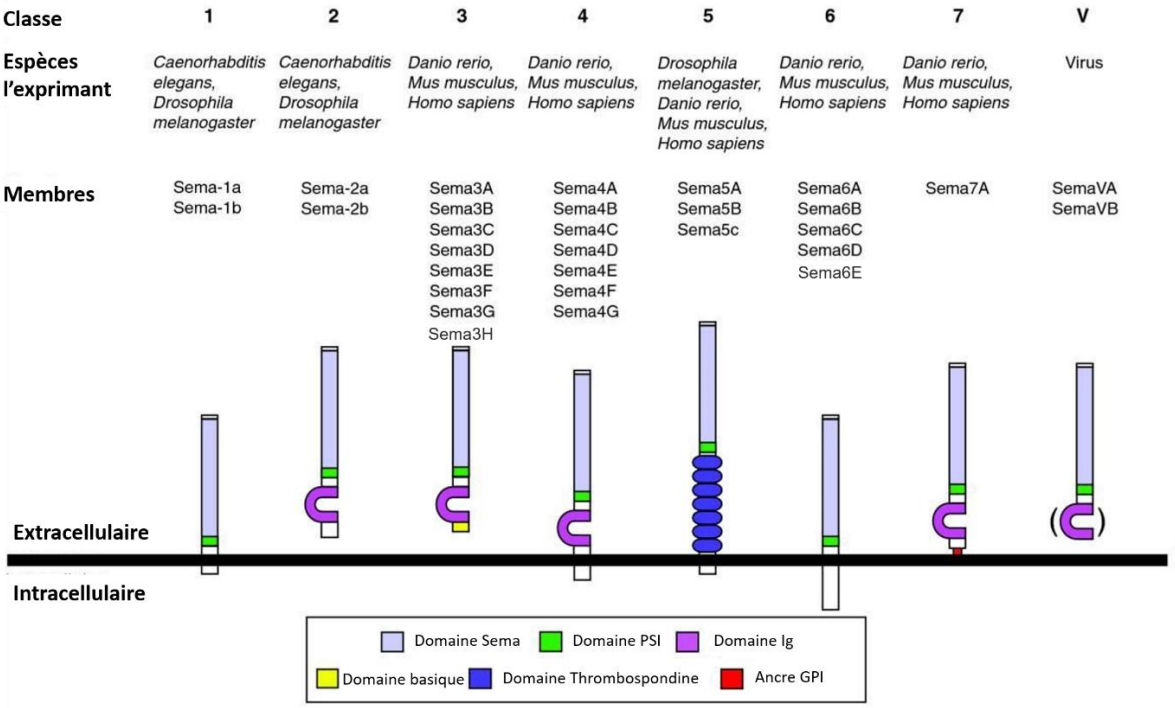


Figure 10 : Schéma de la structure des différentes classes de Sémaphorines.

Les Sémaphorines sont orientées avec leur partie N-terminale en haut (côté extracellulaire) et C-terminale en bas (côté intracellulaire). Les classes 1, 2 et 5C sont présentes chez les Invertébrés, les 3, 4, 5A, 5B, 6 et 7 chez les Vertébrés et la classe V chez les virus. Les classes 2 et 3 sont sécrétées et sont structurellement similaires. Chez les Vertébrés, les classes 4 à 6 sont transmembranaires et les Semaphorines 6 sont similaires aux Sema1 des Invertébrés. Les Semaphorines 5 présentent des domaines Thrombospondine et la classe 6 un domaine C-terminal assez long. La classe 7 est ancrée à la membrane par une ancre GPI et en dehors de cet ancrage, est assez similaire aux Semaphorines V des virus. Ces dernières comportent 2 sous-classes selon qu'elles possèdent un domaine Immunoglobuline (Ig) (Semaphorines VB) ou non (Semaphorines VA). Abréviations : Sema : Sémaphorine, PSI : Plexine-Sémaphorine-Integrine, Ig : immunoglobuline, GPI : glycosylphosphatidylinositol. Adapté de Yazdani and Terman 2006.

Toutes les Sémaphorines ont un point commun au niveau structurel : elles comportent un domaine N-terminal appelé « Sema » qui représente environ 500 acides aminés formant des feuillets beta. A la suite de ce domaine Sema, on retrouve également chez toutes les Sémaphorines un domaine appelé PSI car partagé entre les Plexines, Sémaphorines et Intégrines. Les autres caractéristiques structurelles sont spécifiques de certaines classes de Sémaphorines. La plupart présentent un domaine Immunoglobuline (Ig), tandis que la classe 5 présente un domaine Thrombospondine. Parmi les classes présentes chez les Vertébrés, seule la classe 6 ne présente aucun de ces 2 domaines (**Figure 10**). Pour exercer leurs fonctions, les Sémaphorines doivent s'homodimériser grâce à leur domaine Sema, qui interagit également avec leurs récepteurs (Kumanogoh & Kikutani, 2013).

b. Les Sémaphorines 6

On distingue 5 sous-types de Sémaphorines 6 (A à E). Elles sont toutes transmembranaires et ont un domaine intracellulaire particulièrement long (environ 400 acides aminés) et riche en proline. Les Sémaphorines 6 sont également sujettes à de l'épissage alternatif induisant la présence de plusieurs isoformes de chacune d'entre elles, et ce généralement de façon tissu-spécifique (Zhou *et al.*, 1997; Kikuchi *et al.*, 1999; Klostermann *et al.*, 2000; Correa *et al.*, 2001; Taniguchi & Shimizu, 2004). Si les Sémaphorines agissent principalement via leurs récepteurs que l'on détaillera ci-après, les Sémaphorines 6 ont la particularité (avec les Semaphorines de classe 1 et 4) de pouvoir, elles aussi, activer via leur domaine intracellulaire une cascade de signalisation et ainsi agir comme un récepteur. Elles peuvent donc agir de façon bidirectionnelle et font partie des Sémaphorines permettant la signalisation dite « *reverse* » en opposition à celle classique en tant que ligand dite « f*orward* ».

2. Les Récepteurs aux Sémaphorines

a. Les Plexines

Les Sémaphorines exercent majoritairement leurs fonctions via leurs récepteurs principaux que sont les Plexines divisées en 4 sous-types : A à D selon leur structure (Fujisawa, 2004; Hota & Buck, 2012; Perälä *et al.*, 2012). Chez les Vertébrés on compte 9 Plexines au total (A1 à 4, B1 à 3, C1 et D1) et 2 chez les Invertébrés : A et B. Les Plexines présentent dans leur partie extracellulaire, tout comme les Sémaphorines, un domaine Sema, et dans leur partie intracellulaire un domaine à activité GTPase (GAP). Le domaine Sema sert d'auto-inhibiteur du récepteur et cette inhibition est levée par un changement de conformation induit par la liaison du domaine avec une Sémaphorine (Takahashi & Strittmatter, 2001). Le domaine GAP semble, quant à lui, important dans la transduction du signal par les Plexines (Oinuma *et al.*, 2004; He *et al.*, 2009; Sakurai *et al.*, 2010; Worzfeld *et al.*, 2014). Les Plexines A forment comme les Sémaphorines des dimères (hétéro ou homodimères) pour exercer leur fonction (Janssen *et al.*, 2010; Nogi *et al.*, 2010; Kigel *et al.*, 2011) et ces dimères passent d'une conformation inactive à une conformation active par la liaison directe des Sémaphorines (Liu *et al.*, 2010; Nogi *et al.*, 2010). Chaque Plexine reconnait spécifiquement certaines Sémaphorines comme résumé dans la **Figure 11**. Par exemple, la Plexine-B1 est le

récepteur de la Sema4D (Tamagnone *et al.*, 1999), Plexine-A2 et Plexine-A4 des Sémaphorines 6A et 6B (Suto *et al.*, 2005, 2007), etc.

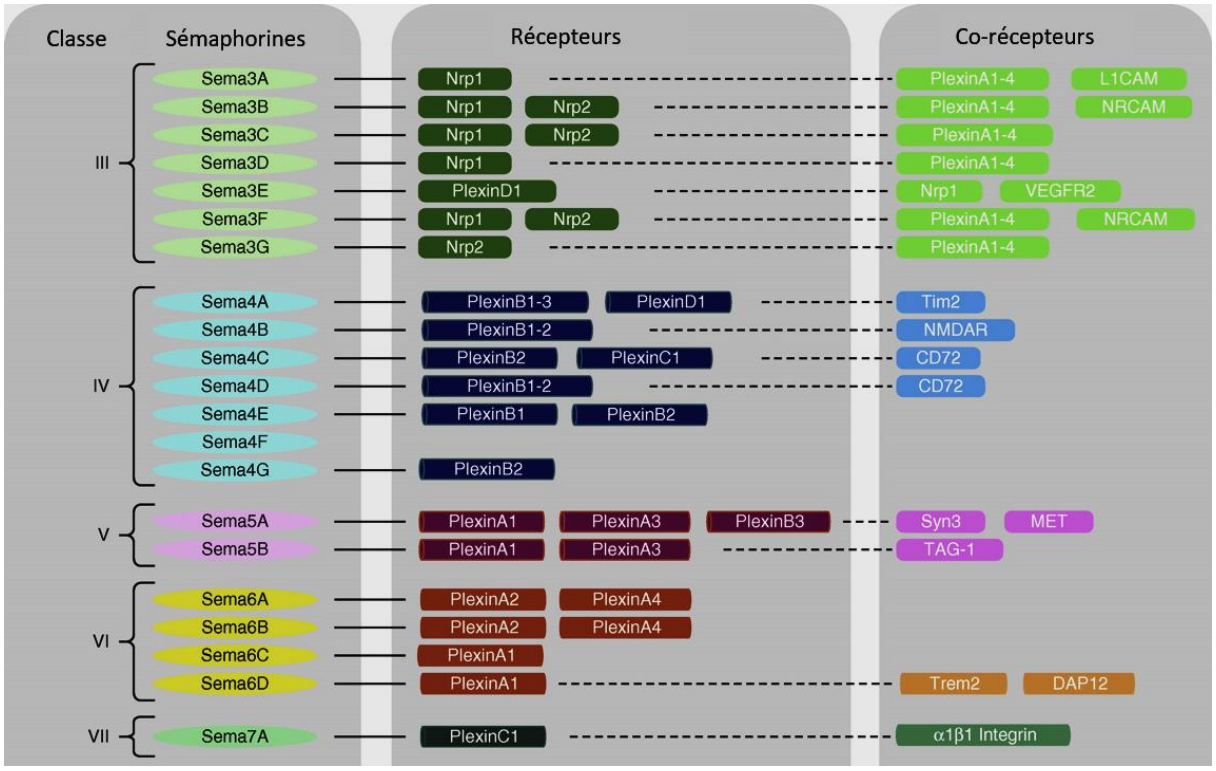


Figure 11 : Représentation schématique des Sémaphorines de Vertébrés et de leurs principaux récepteurs et corécepteurs connus dans différents types cellulaires.

Certains récepteurs reconnaissent plusieurs types de Sémaphorines. Abréviations : DAP12 : DNAX activation protein 12, L1CAM : neural cell adhesion molecule L1, MET : hepatocyte growth factor receptor, NMDAR : N-methyl-D-aspartate receptor, Nr-CAM : neuronal cell adhesion molecule, Nrp : neuropiline, Sema : Sémaphorine, Syn : syntaxine, TAG-1 : transient axonal glycoprotein 1, Tim2 : T cell Ig and mucin domain–containing protein 2, Trem : triggering receptor expressed on myeloid cells, VEGFR2 : vascular endothelial growth factor receptor 2. De Movassagh, Khadem, and Gounni 2018.

b. Les Neuropilines

Généralement les Sémaphorines se lient directement aux Plexines mais il existe aussi d'autres récepteurs ou corécepteurs aux Sémaphorines. Parmi eux ont été identifiées les Neuropilines (Nrp). Il en existe 2 (Nrp1 et 2) chez les Vertébrés. Elles peuvent servir à la fois de corécepteurs (en facilitant l'interaction entre une Sémaphorine et une Plexine) ou de récepteurs (en liant directement la Sémaphorine et en transduisant le signal via une Plexine). La plupart des Sema3 (toutes sauf la Sema3E qui lie directement la Plexine-D1 (Gu *et al.*, 2005) ne peuvent se lier directement aux Plexines et se lient à la place aux Nrps (Neufeld & Kessler, 2008). Les Nrps ont un domaine intracellulaire plus court que les Plexines et ne peuvent transduire seules le signal des Sémaphorines. C'est pourquoi les Nrps s'associent aux

Plexines A et D1 (qui jouent ici le rôle de corécepteurs) afin de transduire le signal des Sema3 (Takahashi *et al.*, 1999; Tamagnone *et al.*, 1999; Gitler *et al.*, 2004). Les récepteurs et corécepteurs des Sema3 semblent former un complexe tétramérique comprenant un homodimère de Neuropiline et un dimère de Plexine qui se lient ensemble par l'interaction avec les Sema3 (Kigel *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2012; Sabag *et al.*, 2014). En plus des Sémaphorines, les Nrps sont aussi les récepteurs de différents facteurs de croissance dont VEGF (vascular endothélial growth factor) (Gitay-Goren *et al.*, 1996; Migdal *et al.*, 1998; Soker *et al.*, 1998; Makinen *et al.*, 1999; Kärpänen *et al.*, 2006; Glinka & Prud'homme, 2008; Sulpice *et al.*, 2008). Certaines Sémaphorines peuvent ainsi jouer un rôle de régulateur de signaux comme celui de VEGF via Nrp1 (Guttmann-Raviv *et al.*, 2007) voire entrer en compétition avec VEGF pour se lier aux Neuropilines (Mumblat *et al.*, 2015). De plus, les signaux des Semaphorines par les Nrps peuvent être également modulés si les Nrps forment des complexes avec d'autres types de molécules telles que des VEGFR (Favier *et al.*, 2006; Kärpänen *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010), les molécules d'adhésion L1-CAM (Castellani *et al.*, 2002; Julien *et al.*, 2005; Bechara *et al.*, 2008) ou des protréoglycanes à héparane sulfates (Thacker *et al.*, 2016).

c. Les autres récepteurs

Enfin, à côté des récepteurs principaux aux Sémaphorines que sont les Plexines et les Neuropilines, on trouve plus rarement d'autres types de récepteurs. Par exemple, la Sema4A peut se lier au récepteur Tim-2 (T-cell immunoglobuline domain and mucine domain) exprimé sur les cellules T activées (Kumanogoh *et al.*, 2002). La Sema4D peut interagir avec le récepteur CD-72 des lymphocytes (Kumanogoh *et al.*, 2000). Les Sema5A et Sema3A peuvent se lier à des protéoglycanes chondroitine sulfates, ce qui dans le cas de Sema5A transforme le signal attractif en signal répulsif (Kantor *et al.*, 2004; Dick *et al.*, 2013). La Sema7A interagit avec les intégrines α-1/β-1 pour moduler certaines réponses inflammatoires (Suzuki *et al.*, 2007). Enfin parmi les autres types de récepteurs ou corécepteurs identifiés qu'on ne pourra pas tous citer ici, on relèvera que la Sema6D en plus de son interaction principale avec Plexine-A1 peut également avoir pour corécepteur Nr-CAM au niveau du chiasma optique (Kuwajima *et al.*, 2012) ou Trem-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells-2) et DAP12 dans la réponse immunitaire et l'homéostasie osseuse (Takegahara *et al.*, 2006).

d. Les Sémaphorines elles-mêmes

Pour clore ce chapitre sur les récepteurs aux Sémaphorines, on mentionnera le fait que certaines Sémaphorines pourraient se lier à d'autres Sémaphorines transmembranaires jouant le rôle de récepteur. Ainsi Sema1a dans le système olfactif de la drosophile serait un récepteur de Sema2 (Sweeney *et al.*, 2011). Plus récemment, il a également été montré, toujours chez la drosophile que Sema1a agissait à la fois comme ligand et comme récepteur pour réguler la répulsion inter-axonale durant le développement du système visuel (Hsieh *et al.*, 2014).

3. Les différents modes de transduction du signal

Décrites dans un premier temps comme étant les molécules permettant de guider les cellules et les axones tels des sémaphores, les Sémaphorines ont aujourd'hui été impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la division, la différenciation, la survie, entre autres mécanismes développementaux (Neufeld *et al.*, 2012; Pasterkamp, 2012; Giacobini & Prevot, 2013; Kang & Kumanogoh, 2013; Kumanogoh & Kikutani, 2013). Des actions aussi diversifiées pour un nombre de Sémaphorines restreint (30 membres toutes espèces confondues) impliquent la redondance de l'utilisation des Sémaphorines dans des processus différents. Pourtant, les signaux transduits étant très précis, ils résultent d'un nombre important d'interprétations possibles en fonction du contexte cellulaire. En effet, les Sémaphorines peuvent agir via différents modes de transduction, différentes combinaisons de récepteurs et via de nombreux effecteurs intracellulaires que je présenterai ci-après.

On distingue ainsi 4 modes de transduction : Selon (1) si le récepteur transduit l'information de la Sémaphorine en tant que ligand (*forward*) ou (2) si la Sémaphorine est le récepteur (*reverse*), (3) si le récepteur et le ligand sont situés sur la même cellule (*cis*) ou (4) s'ils sont situés dans des structures distinctes (*trans*). Le mode de transduction le plus souvent décrit jusqu'à présent est donc un mécanisme en *trans* et *forward* impliquant une Sémaphorine d'une autre cellule qui se lie à son récepteur et déclenche une cascade de signalisation dans sa partie intracellulaire. En règle générale, la signalisation induite par les Sémaphorines a pour but principal un remodelage du cytosquelette et la modulation de l'adhésion cellulaire concrétisant ainsi son action dans des processus comme la migration cellulaire, la croissance, le guidage et le ciblage axonal. Néanmoins, il s'avère qu'elles peuvent également jouer d'autres rôles comme par exemple dans la régulation de l'expression

de gènes ou de protéines (Tran *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008; Hota & Buck, 2012; Yoshida, 2012; Siebold & Jones, 2013; Cagnoni & Tamagnone, 2014).

a. Signalisation principale (*trans* et *forward*)

Le plus souvent, on décrit la signalisation des Sémaphorines comme étant celle déclenchée lorsque celles-ci se lient aux Plexines qui activent alors une cascade de signalisation intracellulaire (signalisation *forward* et *trans*). Même si les Plexines ont des points communs concernant leur fonctionnement et les facteurs impliqués dans leur cascade de signalisation, chaque type de Plexine a des particularités (Yaron *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2008). Je décrirai ici les mécanismes principaux déclenchés par les Plexines et les molécules qui permettent de les moduler.

i. Mécanismes principaux déclenchés en aval des Plexines

Lorsqu'une Sémaphorine se lie à son récepteur Plexine et ce pour toutes les classes de Plexines, celle-ci change de conformation, menant entre autres effets, à l'activation de son domaine GAP. Cette activation conduit alors à la modulation de l'activité de différentes protéines comme des kinases, GTPases ou des molécules associées au cytosquelette (Tran *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008; Hota & Buck, 2012; Cagnoni & Tamagnone, 2014). Parmi les protéines impliquées dans la signalisation des Plexines (Hota & Buck, 2012), les petites protéines GTPases (ou protéines G) ont un rôle majeur (Püschel, 2007). Ces protéines sont inactivées par les GAPs (Bos & Pannekoek, 2012). Ainsi l'activation du domaine GAP de la Plexine diminue l'activité de GTPases telles que Ras et Rap (Oinuma *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012; Yang & Terman, 2012; Mizumoto & Shen, 2013; Worzfeld *et al.*, 2014). Ces GTPases sont impliquées dans le contrôle de l'adhésion cellulaire par les intégrines et la stabilisation du cytosquelette (Kinbara *et al.*, 2003; Hall & Lalli, 2010). L'inactivation de Ras mènerait *in vitro* à la déstabilisation du cytosquelette via l'inactivation par la voie PI3K-AKT-GSK3β de CRMP-2, une protéine de polymérisation des microtubules (Pasterkamp, 2005). L'inactivation de protéines de la famille des Ras peut également mener à la diminution de l'adhésion cellulaire via l'inhibition de PIPKIϒ661 par FARP2 comme décrite durant certains mécanismes de répulsion axonale (Toyofuku *et al.*, 2005; Oinuma *et al.*, 2006) (**Figure 12**).

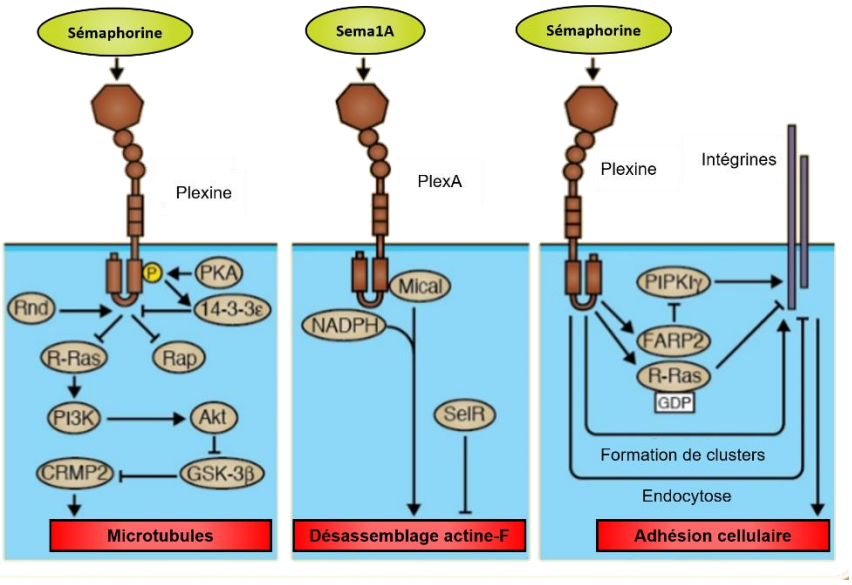


Figure 12 : Illustration des voies de signalisation principales activées par les Plexines en réponse aux Sémaphorines.

La liaison des Sémaphorines aux Plexines induit, entre autres, l'activation de leur domaine GAP, menant à l'inactivation de certaines GTPases comme Ras ou Rap et à un effet sur l'état de polymérisation des microtubules. Certaines Plexines affectent directement les filaments d'actine via leur interaction avec l'enzyme oxydative Mical. Les Plexines régulent également l'adhésion cellulaire en régulant les mécanismes d'endocytose ou l'activité des intégrines. D'après Jongbloets and Pasterkamp 2014.

En parallèle des voies de signalisation impliquant des GTPases pour influer sur l'état des microtubules et de l'adhésion cellulaire, les Plexines peuvent aussi directement agir sur le cytosquelette grâce par exemple à l'enzyme oxydative Mical. Associée aux Plexines A, c'est un facteur de déstabilisation des filaments d'actine (Hung & Terman, 2011). L'enzyme SelR/MsrB a l'effet inverse de Mical sur l'actine, restaurant sa polymérisation (Hung *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013) et constitue un moyen de moduler cette signalisation en aval des Plexines (Hung *et al.*, 2010) (**Figure 12**).

Les Plexines pourraient également agir sur les mécanismes d'endocytose et d'exocytose même si la signalisation sous-jacente à cet effet reste encore peu connue. Une endocytose asymétrique comme celle induite par Sema3A par exemple, permet le changement de direction de cônes de croissance et son effet répulsif (Tojima *et al.*, 2010).

ii. Mécanismes permettant de moduler cette signalisation

Cette signalisation générale des Sémaphorines via leur récepteurs Plexines peut être modulée par de nombreux effecteurs, que ce soit en aval des Plexines ou directement lors de l'interaction récepteur / ligand.

Concernant les effecteurs en aval des Plexines, ces dernières possèdent d'autres domaines que le domaine GAP capables d'interagir avec des molécules intracellulaires. Les Plexines présentent par exemple un domaine RBD capable d'interagir avec les GTPases Rho (Hota & Buck, 2012), qui ont un rôle important dans le remodelage du cytosquelette contrôlant ainsi certains mouvements cellulaires (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Si l'effet de leur liaison aux Plexines n'est pas tout à fait clair, cela constitue une des nombreuses façons de moduler la signalisation en aval des Plexines (Hota & Buck, 2012). D'autres seconds messagers impliqués dans la signalisation en aval des Plexines sont également des sources de modulation de cette signalisation. Parmi ces molécules, on trouve un grand nombre de tyrosine kinases comme Pyk2, Syk, FAK, Fer/Fes, Fyn ou les Src (Hota & Buck, 2012), ou bien les nucléotides cycliques (Song *et al.*, 1998; Polleux *et al.*, 2000). Ainsi par exemple, la PKA dépendante de l'AMPc peut phosphoryler le domaine GAP des Plexines A, ce qui l'inactive via le recrutement de la protéine 14-3-3ε (Yang & Terman, 2012).

Cette signalisation entre Sémaphorines et Plexines est bien évidemment modulée par le type de Sémaphorine et de Plexine impliquées. Différentes Sémaphorines peuvent parfois avoir la même Plexine comme récepteur mais selon la Sémaphorine liée, le signal transduit est différent voire opposé. C'est le cas par exemple dans le développement du système nerveux de la drosophile où Sema2a est attractive et Sema2b répulsive alors qu'elles agissent via le même récepteur PlexB (Wu *et al.*, 2011). Ce partage des récepteurs par différentes Sémaphorines induit également des mécanismes de compétition dans l'interaction ligands / récepteur. De plus, comme vu précédemment, la présence de co-récepteurs influe sur le signal transduit. Un exemple phare de combinaison de ces 3 types de modulation a été décrit dans les mécanismes de formation des os (Hayashi *et al.*, 2012). La formation des os repose sur un équilibre entre la formation d'os par les ostéoblastes et leur résorption par les ostéoclastes. Les jeunes ostéoclastes expriment à leur surface Plexine-A1 et les co-récepteurs Trem2 et DAP12. La liaison de Sema6D à ce complexe déclenche leur différenciation en ostéoclastes matures capables de résorber les os (Hayashi *et al.*, 2012). Les axones des neurones sensoriels innervant les os secrètent Sema3A, qui entre en compétition avec Sema6D, se lie à Plexine-A1 et empêche Plexine-A1 d'interagir avec ses 2 co-récepteurs Trem2 et DAP12 (Fukuda *et al.*, 2013). A côté de cela, Sema3A favorise via le complexe de récepteurs Plexine-A1 et Nrp1 la différentiation des ostéoblastes capables de former de l'os et inhibe la migration des précurseurs d'ostéoclastes (**Figure 13**).

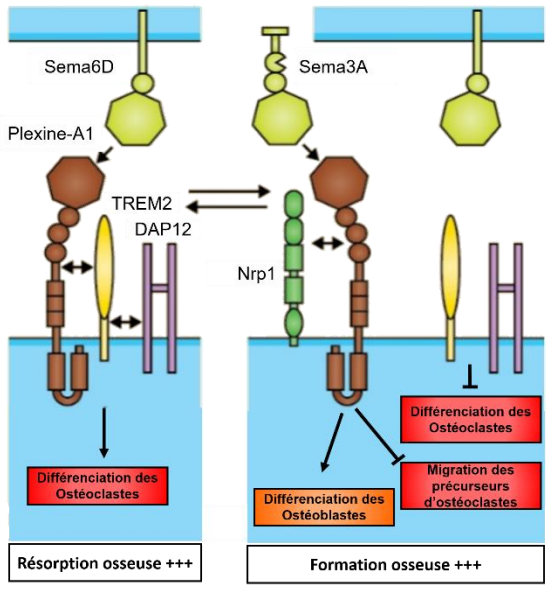


Figure 13 : Schéma des mécanismes de signalisation entre Sema6D, Plexine-A1, Sema3A et leurs corécepteurs dans la formation osseuse.

La liaison de Sema6D à Plexine-A1 entourée de ces corécepteurs Trem2 et DAP12 entraine la différenciation des précurseurs en ostéoclastes mature et favorise ainsi la résorption osseuse. La présence de Sema3E dans le milieu extracellulaire bloque cette signalisation. Plexine-A1 n'interagit alors plus avec Trem2 et DAP12 mais avec Nrp1. Cela induit une autre cascade de signalisation inhibant la migration des précurseurs des ostéoclastes et activant la différenciation des ostéoblastes, ce qui favorise la formation osseuse. (Hayashi *et al.*, 2012). *D'après Jongbloets and Pasterkamp 2014.*

b. Signalisation *reverse*

Il s'avère cependant que certaines Sémaphorines ne jouent pas uniquement un rôle de ligand. En effet des Sémaphorines transmembranaires comme les Sema1, 4, 5 ou 6 peuvent jouer dans certains cas le rôle de récepteur et activent elles-mêmes une cascade de signalisation via leur partie intracellulaire. Ce mode de signalisation a d'abord été décrit chez la drosophile, la Sema1a pouvant servir de récepteur dans des mécanismes de synaptogénèse ou de ciblage durant le développement du système nerveux (Godenschwege *et al.*, 2002; Cafferty *et al.*, 2006; Komiyama *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2012). Tout comme les Plexines, les Sémaphorines peuvent activer des cascades de signalisation différentes en fonction de leur ligand et de leur environnement cellulaire. Ainsi dans les neurones moteurs, Sema1a interagit avec RhoGAPp190 et Pebble, afin de réguler l'activité de Rho et favoriser la défasciculation (Jeong *et al.*, 2012), tandis que dans les photorécepteurs, elle interagit en réponse à la Plexine A avec la Moesin, inhibant l'activité de Rho et favorisant la fasciculation (Hsieh *et al.*, 2014).

Chez les Vertébrés, un exemple de cette signalisation *reverse* a été observé durant le développement du cœur chez le poulet. La mise en place des trabéculations dans le cœur nécessite que des cellules myocardiques, récemment générée par les cellules prolifératives situées dans la couche compacte des cellules myocardiques, migrent en dehors de cette couche et envahissent les régions trabéculaires du cœur. Ce processus requiert différentes étapes durant lesquelles Sema6D agit à la fois comme un ligand et comme un récepteur pour

Plexine-A1 (Toyofuku, Zhang, Kumanogoh, Takegahara, Suto, *et al.*, 2004; Toyofuku, Zhang, Kumanogoh, Takegahara, Yabuki, *et al.*, 2004) (**Figure 14**). Les cellules myocardiques qui migrent en dehors de la couche compacte, dans les couches trabéculaires expriment Sema6D mais pas Plexine-A1. Elles interagissent avec celles situées dans la couche compacte et qui expriment, elles, Sema6D et Plexine-A1. Plus précisément, la liaison (*en trans*) de la Plexine-A1 des cellules de la couche compacte avec les récepteurs Sema6D des cellules myocardiques nouvellement générées induit leur répulsion et leur migration vers les couches trabéculaires (Toyofuku, Zhang, Kumanogoh, Takegahara, Yabuki, *et al.*, 2004). Pour cela, Sema6D via son domaine intracellulaire recrute et active Abl, induisant l'activation par phosphorylation du régulateur du cytosquelette Mena (homologue mammalien d'Enabled) (Toyofuku, Zhang, Kumanogoh, Takegahara, Yabuki, *et al.*, 2004) qui se détache de Sema6D. Cela relâche ainsi l'effet inhibiteur de Mena sur la migration (**Figure 14**).

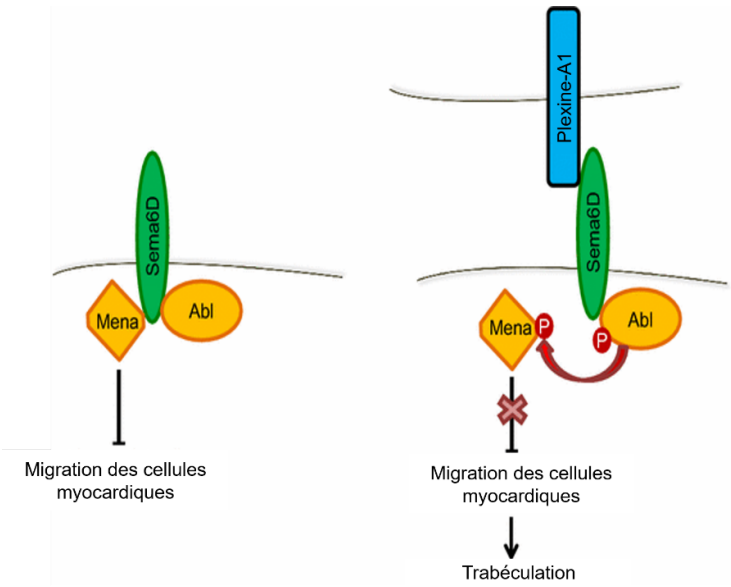


Figure 14 : Schéma de la signalisation reverse entre Sema6D et Plexine-A1 durant le développement du cœur chez le poulet.

La Sema6D exprimée par les cellules myocardiques interagit avec Abl et Mena via son domaine cytoplasmique. En réponse à la Plexine-A1 exprimée par les cellules de la couche compacte, Abl est activée ce qui mène à la phosphorylation de Mena et à sa dissociation de Sema6D. Cela supprime l'effet inhibiteur de Mena sur la migration cellulaire et permet la trabéculation (Toyofuku, Zhang, Kumanogoh, Takegahara, Yabuki, et al., 2004). D'après Battistini and Tamagnone 2016.

c. Signalisation *en cis*

En plus de cette signalisation dite « en *trans* » la plus répandue, les Plexines et Sémaphorines peuvent également interagir « en *cis* », c'est à dire lorsqu'elles sont situées sur la même cellule. Cette interaction peut directement induire une cascade de signalisation, comme cela a été décrit par exemple entre la Sémaphorine SMP-1 et PLX-1 dans la formation des synapses chez *C. Elegans* (Mizumoto & Shen, 2013), mais permet aussi d'empêcher une signalisation en *trans* en bloquant le récepteur ou le ligand.

Un exemple d'inhibition en *cis* du récepteur a été décrit entre Sema6A et Plexine-A2 et est important dans la mise en place de la morphologie des cellules amacrines étoilées (SACs : starburst amacrine cells) et la stratification de leur dendrite dans la rétine de souris. Les ON-SACs expriment Sema6A et Plexine-A2 tandis que les OFF-SACs n'expriment que Plexine-A2. *In vitro* il a été montré que l'expression de Sema6A dans les SACs les protègerait du signal répulsif de la Sema6A extérieure. Cette signalisation serait nécessaire pour l'établissement de la stratification de leurs dendrites, les souris déficientes pour l'une de ces protéines présentant des défauts de stratification et de morphologie (Sun *et al.*, 2013). Ce mécanisme a également été décrit dans les neurones sensoriels de la souris entre Plexine-A4 et Sema6A (Haklai-Topper *et al.*, 2010) (**Figure 15**).

Dans l'hippocampe, on retrouve un exemple de mécanisme inverse où le ligand est bloqué par un récepteur en *cis* (Suto *et al.*, 2007). La Sema6A est exprimée par les neurones pyramidaux CA3 dans l'hippocampe, et se trouve être répulsive pour les fibres moussues exprimant Plexine-A4. Cependant, les neurones CA3 expriment également localement Plexine-A2 dans une partie de leur dendrite apicale. Dans ce segment, Plexine-A2 interagit en *cis* avec Sema6A l'empêchant d'interagir avec Plexine-A4 sur les fibres moussues. Ce système crée un couloir dans lequel les fibres moussues peuvent innerver la région CA3 (Suto *et al.*, 2007) (**Figure 15**).

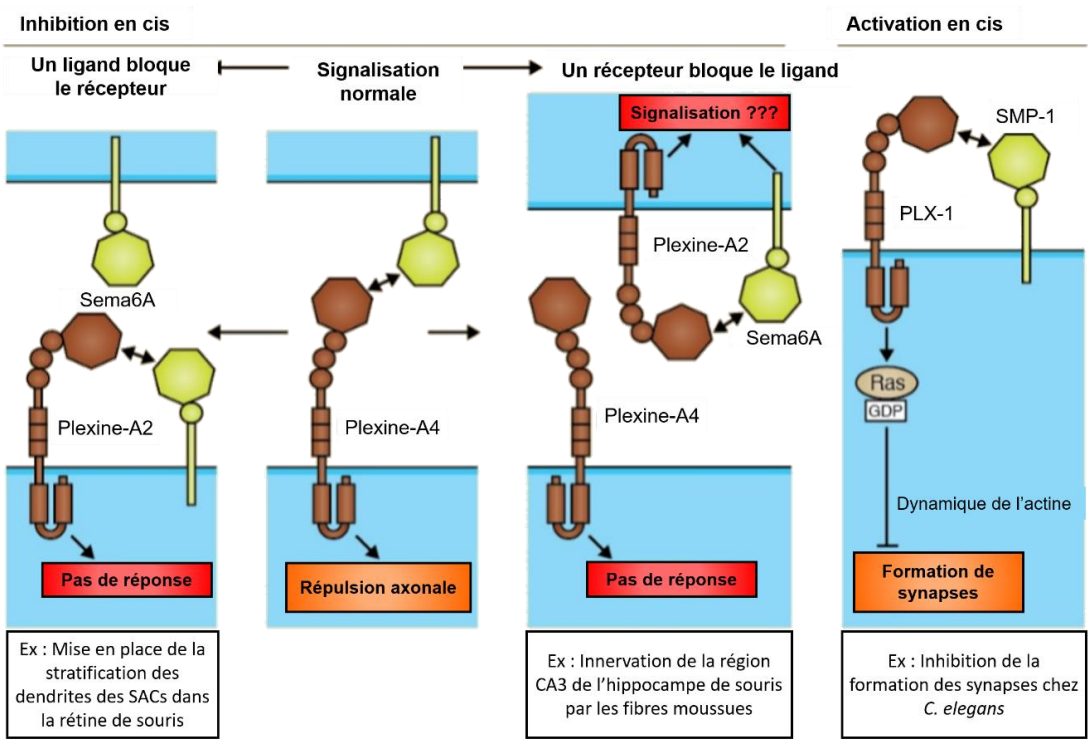


Figure 15 : Exemples de signalisation en cis entre Sémaphorines et Plexines.

Le signal répulsif de la Sema6A via Plexine-A2 ou Plexine-A4 en trans peut être inhibé par une interaction en cis. Par exemple dans certaines cellules amacrines étoilées de la rétine (SACs) l'expression de la Sema6A bloque en cis le récepteur et cela permet la mise en place de la stratification des dendrites entre les différentes sous-populations de SACs (ON et OFF). Sur les neurones pyramidaux CA3, dans une partie de leurs dendrites, l'expression localisées de Plexine-A2 bloque en cis la Sema6A et laisse ainsi un couloir non-répulsif pour les fibres moussues exprimant Plexine-A4. L'interaction en cis entre la Sémaphorine SMP1 et PLX-1 chez C. elegans déclenche directement une voie de signalisation et inhibe via Ras la formation de synapses. D'après Jongbloets and Pasterkamp 2014.

4. Rôle des Sémaphorines et Plexines

Les Sémaphorines sont à l'origine de voies de signalisation agissant principalement sur les mécanismes d'adhésion cellulaire et ceux régissant l'état du cytosquelette. Elles sont ainsi impliquées dans des mécanismes cellulaires fondamentaux dans le développement tels que ceux affectant la morphologie, la migration, la mobilité, la prolifération ou la différentiation cellulaire. De plus, la multitude de combinaisons entre Sémaphorines et Plexines ainsi que les différents modes de signalisation et de modulation permettent la mise en place de signalisations complexes utiles pour le développement de certains systèmes. Elles ont jusqu'à aujourd'hui été impliquées majoritairement dans le système nerveux, mais également dans les systèmes circulatoire, immunitaire ou dans la formation de nombreux organes comme le rein ou les os entre autres. Si leurs fonctions sont particulièrement importantes dans les étapes du développement, elles semblent également jouer un rôle majeur

dans les mécanismes tumoraux. Je présenterai ci-après brièvement les principaux systèmes dans lesquels les Sémaphorines sont impliquées afin de donner des exemples de leurs fonctions connues.

a. Dans le système nerveux

Les Sémaphorines définissent de façon générale la mobilité et la motilité neuronale. Elles sont ainsi impliquées à la fois dans la différenciation, la migration neuronale et dans l'établissement des trajectoires axonales et dendritiques chez les Vertébrés. Elles participent par exemple à la formation de laminations cellulaires ou dendritiques, de tractus, et guident les axones lors du croisement de lignes médianes et de l'arrivée dans leur cible. Je décrirai dans cette partie leurs implications dans ces mécanismes du système nerveux.

i. Différenciation et migration neuronale

Les Sémaphorines sont fortement impliquées dans la mobilité et la motilité des neurones et ce dès les premiers stades du développement. Par exemple, durant l'embryogenèse des Vertébrés, des gradients de Sémaphorines orientent la migration des cellules des crêtes neurales pour la formation du système nerveux périphérique (Ruhrberg & Schwarz, 2010). Durant le développement du système nerveux central, les Sémaphorines participent par exemple à la migration des interneurones corticaux. Les Sémaphorines 3 (A et F) régulent ainsi à la fois leur migration tangentielle (Marín *et al.*, 2001) et radiale (Sema3A) (Chen *et al.*, 2008). Pour cela, le gradient de Sema3A au sein des couches corticales semble interagir avec Nrp1 exprimée par les interneurones afin de contrôler l'orientation radiale des interneurones durant leur migration (Chen *et al.*, 2008).

La Sémaphorine 6A est également impliquée dans ces mécanismes de migration, et en particulier celle des cellules granulaires post-mitotiques du cervelet (Kerjan *et al.*, 2005). En effet, la Sema6A est exprimée dans la couche externe granulaire et la migration des cellules granulaires au départ ou vers cette couche est perturbée en son absence (Kerjan *et al.*, 2005). Celle-ci agirait de façon non-cellulaire autonome via le récepteur Plexine-A2 (Kerjan *et al.*, 2005; Renaud *et al.*, 2008) sur le couplage noyau-centrosome, ce qui impacterait la migration de ces cellules (Renaud *et al.*, 2008) (**Figure 16**). Si la Sema6A semble impliquée dans la migration, les Semaphorines 4C et 4G semblent, elles, importantes dans la prolifération et la

différenciation des cellules granulaires du cerebellum, et ce via le récepteur Plexine-B2 (Friedel *et al.*, 2007; Maier *et al.*, 2011).

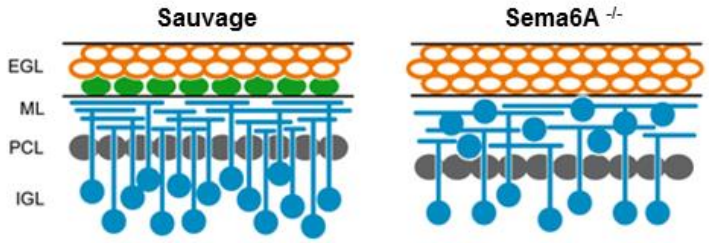


Figure 16 : Sema6A régule la migration des neurones granulaires du cerebellum.

Schéma du développement du cortex cérébelleux chez une souris sauvage et une souris déficiente en Sema6A. Une fois produits dans la couche granulaire externe (EGL), les neurones migrent dans la couche interne (IGL). La Sema6A (en vert) est exprimée par les cellules granulaires (en orange) situées dans la partie la plus interne de la couche externe. Elle est importante pour la migration radiale des cellules granulaires vers l'IGL (en bleu). Chez le mutant déficient pour Sema6A, des cellules granulaires restent au niveau de la couche moléculaire (ML) et n'atteignent pas la couche interne. PCL, Purkinje cell layer (gris) (Kerjan et al., 2005). D'après Tran et al. 2007.

La Sema6A est impliquée de plus dans la séparation entre système nerveux central et système nerveux périphérique. En effet ces deux systèmes sont bien ségrégés dans la moelle épinière et ce grâce aux cellules dites « frontière » ou « boundary cap » cells (Vermeren *et al.*, 2003). La Sema6A exprimée dans ces cellules frontières est nécessaire pour inhiber la migration des neurones moteurs et les contraindre dans la moelle épinière et ce peut-être via Plexine-A1, Plexine-A2 voire Nrp2 (Bron *et al.*, 2007; Mauti *et al.*, 2007). De même Sema6A, Sema6D, Plexine-A1 et Plexine-A4, semblent également impliquées dans la mise en place de cette ségrégation du côté dorsal de la moelle épinière, leur absence induisant un défaut dans la formation et la ségrégation de la racine dorsale (Mauti *et al.*, 2007).

Enfin dans le système visuel, une étude plus récente a mis en évidence par vidéo-microscopie en temps réel que la signalisation entre Sema6A et Plexine-A2 est importante pour la migration nucléaire intercinétique des progéniteurs des cellules rétiniennes. En effet chez les souris déficientes pour l'une de ces deux protéines, la migration des progéniteurs rétiniens est bloquée au niveau apical (Belle *et al.*, 2016). Leur délétion maintiendrait les progéniteurs dans la phase G2/M du cycle cellulaire et allant de pair avec les défauts de migration des progéniteurs, perturberait la différenciation des précurseurs rétiniens (Belle *et al.*, 2016).

Un des aspects de la différenciation que peuvent aussi réguler les Sémaphorines est la polarisation des neurones. En effet la Sema3A semble par exemple importante dans la polarisation axone/dendrite des neurones corticaux via la favorisation de signaux dendrite-spécifiques et l'inhibition de signaux axone-spécifiques (Shelly *et al.*, 2011).

ii. Guidage dendritique et mise en place de laminations

Les connexions synaptiques dans la plupart des régions du système nerveux sont organisées sous forme de couches. Un exemple flagrant de cette lamination est observé dans la rétine et celle-ci implique de nombreuses Sémaphorines. La couche plexiforme interne de la rétine comporte les connexions de différentes cellules (amacrines, bipolaires et ganglionnaires) et celle-ci se divise en 5 voire 10 différentes sous-couches (Wässle, 2004; Sanes & Zipursky, 2010). Par exemple la Plexine-A4, exprimée dans les cellules amacrines dopaminergiques est importante pour la lamination de leur arbre dendritique dans la couche S1 mais aussi de celle des dendrites des ipCGRs M1 car son absence induit des dendrites aberrantes de ces 2 groupes cellulaires dans les couches S4 et S5 (Matsuoka, Nguyen-Ba-Charvet, *et al.*, 2011). La Sema6A exprimée dans les sous-couches internes de la couche plexiforme interne serait le facteur répulsif repoussant les dendrites exprimant Plexine-A4 dans la couche la plus externe (**Figure 17**). Les souris déficientes en Sema6D ou en Plexine-A1 seulement ne semblent, elles, ne pas présenter de défaut de lamination dendritique dans la rétine (Matsuoka, Chivatakarn, *et al.*, 2011; Matsuoka *et al.*, 2013).

Les Sémaphorines Sema5A et Sema5B seraient elles aussi des facteurs répulsifs pour les dendrites. En effet leur expression dans la partie la plus externe de la couche nucléaire interne permettrait de repousser la plupart des neurites au sein de la couche plexiforme interne (Matsuoka, Chivatakarn, *et al.*, 2011) et ce via les récepteurs Plexine-A1 et Plexine-A3. De ce fait, les souris déficientes pour ces deux Sema5 ou ces deux Plexines présentent des défauts d'arborisation dendritique pour la plupart des cellules amacrines et ganglionnaires (Matsuoka, Chivatakarn, *et al.*, 2011). Etonnamment, les ipCGRs, les cellules amacrines ou celles bipolaires projetant dans la couche « ON » sont beaucoup moins affectées par cette délétion contrairement à celles projetant dans la sous-couche « OFF » (Matsuoka, Chivatakarn, *et al.*, 2011) (**Figure 17**).

De même certaines Sémaphorines et Plexines ont été impliquées dans la lamination des projections des fibres moussues dans l'hippocampe, telles que Sema6A, Sema6B, Plexine-A2 et Plexine-A4 (Suto *et al.*, 2005, 2007; Tawarayama *et al.*, 2010). Elles sont également impliquées dans la morphologie dendritique en dehors du processus de lamination. Par exemple dans la moelle épinière, Sema3A est impliquée dans la croissance et l'orientation dendritique des neurones pyramidaux (Polleux *et al.*, 2000; Fenstermaker *et al.*, 2004), et Sema6A dans celles de sous-types de neurones moteurs (Zhuang *et al.*, 2009).

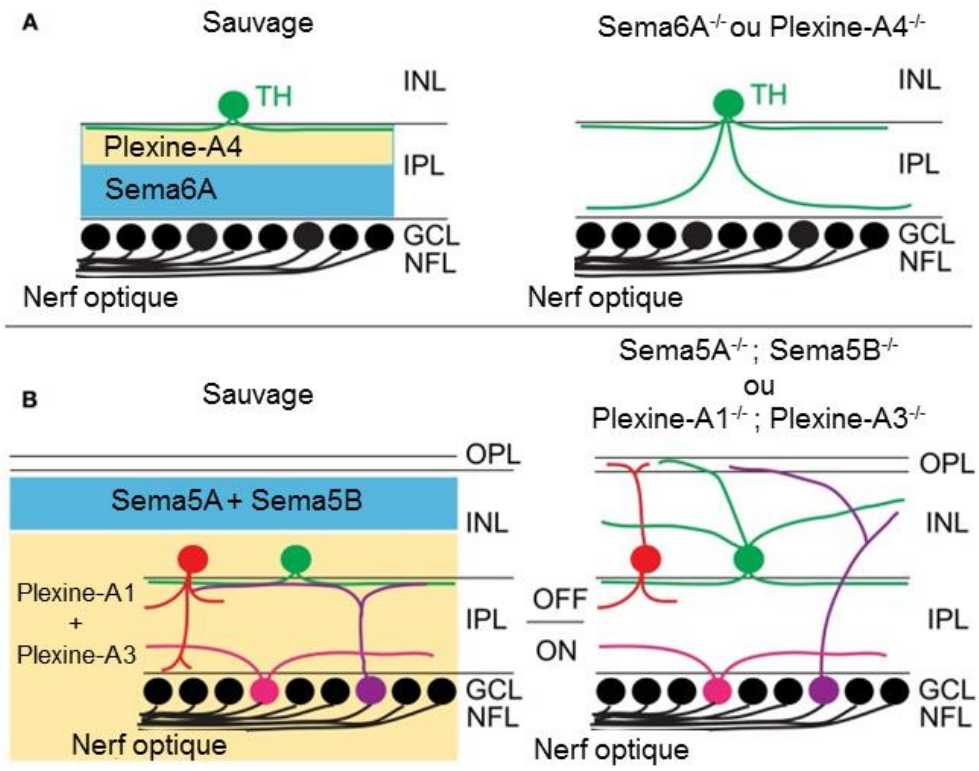


Figure 17 : Les signaux répulsifs des Sema5 et 6 via leur récepteurs Plexines-A permettent la lamination dendritique de nombreux sous-types cellulaires dans la couche plexiforme interne de la rétine.

(A) Sema6A et Plexine-A4 présentent un profil d'expression complémentaire dans la couche plexiforme interne et sont importantes pour la mise en place de l'arborisation dendritique des cellules amacrines dopaminergiques (TH, en vert) au sein de la sous-couche S1 (la plus externe). (B) L'expression de Sema5A/5B dans la couche nucléaire interne et de leur récepteurs Plexine-A1/A3 dans les dendrites permet de les repousser au sein de la couche plexiforme interne, et ce préférentiellement pour les cellules projetant dans la sous-couche "OFF" de la couche plexiforme interne. En Rouge : Cellule bipolaire ON, En Rose : Cellule ganglionnaire projetant dans la couche ON, En Violet : Cellule ganglionnaire projetant dans la couche OFF. Abréviations : OPL outer plexiform layer, INL Inner nuclear layer, IPL Inner Plexiform layer, GCL ganglion cells layer, NFL neurofilament layer. (Matsuoka, Chivatakarn, *et al.*, 2011; Matsuoka, Nguyen-Ba-Charvet, *et al.*, 2011). *D'après Yoshida 2012.*

iii. Croisement de lignes médianes par les axones

Parmi les mécanismes dans lesquels interviennent les Sémaphorines pour guider les axones, le croisement ou non de lignes médianes est un processus complexe qui nécessite un mécanisme de "*switch*" entre un signal attractif qui mène vers cette ligne puis répulsif une fois celle-ci franchie.

Cette ligne médiane correspond pour les neurones commissuraux à la « plaque du plancher » dans la moelle épinière. Les axones de ces neurones situés dans la corne dorsale de la moelle épinière croisent la ligne médiane au niveau de la plaque du plancher, pour projeter dans la corne ventrale puis dans le cerveau. Une fois la ligne médiane passée, les axones perdent leur sensibilité aux signaux attracteurs tels que la netrin-1 et deviennent sensibles aux Sema3B et Sema3F répulsives (Zou *et al.*, 2000). Shh via ses récepteurs Ptch1 ou Smo pourrait activer la réponse des neurones aux signaux répulsifs de Sema3B et F en réduisant la signalisation AMPc/PKA (Parra & Zou, 2010). Il semblerait également que la Nr-CAM exprimée spécifiquement à la plaque du plancher soit capable d'augmenter le taux de Plexine-A1 dans les neurones et ainsi les rendre plus sensibles aux Sema3 (Nawabi *et al.*, 2010).

Un mécanisme de *switch* impliquant une Sémaphorine a également été décrit dans le croisement du chiasma optique par les axones rétiniens controlatéraux. Ces axones expriment Plexine-A1 et Nr-CAM, les neurones du chiasma expriment Plexine-A1 et les cellules gliales radiales expriment Sema6D et Nr-CAM **(Figure 18 A)**. Les axones rétiniens sont normalement repoussés par la Sema6D seule mais leur croissance est augmentée en présence de Sema6D, Plexin-A1 et Nr-CAM **(Figure 18 D)**. Ce mécanisme est nécessaire au croisement du chiasma par les axones rétiniens controlatéraux (Kuwajima *et al.*, 2012) **(Figure 18 B et C)**. Ainsi chez les souris, la délétion de Sema6D ou de Plexine-A1 et Nr-CAM induit une augmentation du nombre de CGRs projetant ipsilatéralement et celles-ci sont situées en dehors du quadrant ventro-temporal de la rétine (**Figure 18 B**). On observe également chez ces souris une défasciculation des axones et des projections ipsilatérales ectopiques (**Figure 18 C**). Par contre ces défauts de projections sont plus faibles chez les souris déficientes seulement en Plexine-A1 voire inexistant chez celles déficientes seulement en Nr-CAM (**Figure 18 C**).

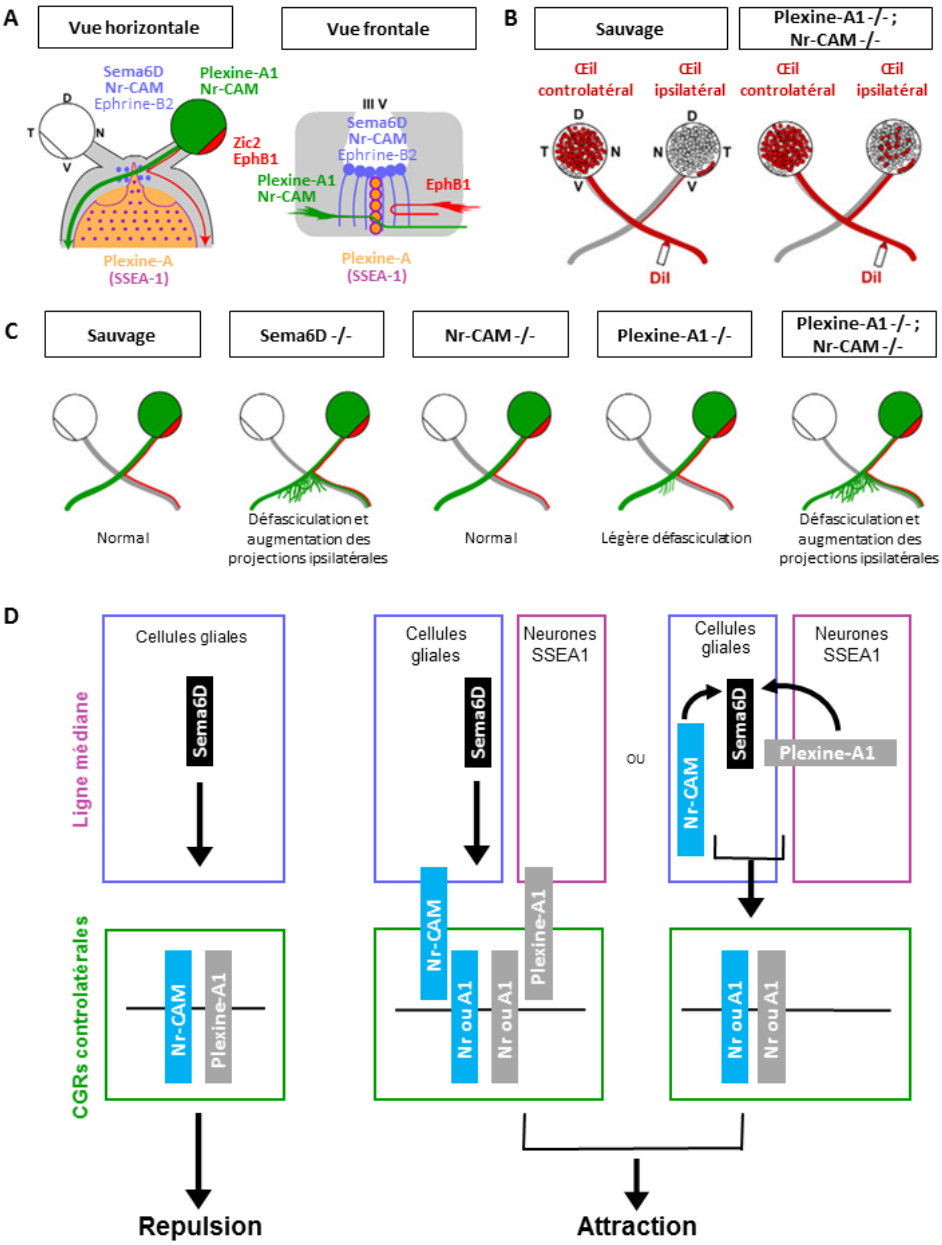


Figure 18 : Sema6D, Plexine-A1 et Nr-CAM interagissent pour contrôler le croisement du chiasma optique par les axones rétiniens controlatéraux.

(A) Au niveau du chiasma optique, les cellules gliales expriment Sema6D, Nr-CAM et l'Ephrine-B2 et les neurones SSEA1 positifs expriment Plexine-A1. Les axones ipsilatéraux expriment EphB1 leur permettant d'être repoussés par L'Ephrine-B2 des cellules gliales et les axones controlatéraux expriment Plexine-A1 et Nr-CAM. (B) Schéma de rétines sauvages ou mutantes pour Plexine-A1 et Nr-CAM à E17 montrant les CGRs controlatérales et ipsilatérales, révélées par l'application de DiI (traceur rétrograde) sur le tractus optique. Des CGRs situées en dehors du quadrant VT de la rétine ont été redirigées ipsilatéralement chez les souris déficientes en Plexine-A1 et Nr-CAM. (C) Schéma de l'état de fasciculation du tractus optique à E14,5 au niveau du chiasma et des projections rétiniennes chez les souris sauvages ou mutantes pour Sema6D, Nr-CAM, Plexine-A1 ou double mutantes pour Plexine-A1 et Nr-CAM. Un phénotype de défasciculation et d'augmentation des projections ipsilatérales est très visible chez les souris Sema6D -/- ou double mutantes Plexine-A1 -/- et Nr-CAM -/-, mais il est plus faible chez les souris Plexine-A1 -/- et inexistant chez celles Nr-CAM -/-. (A à C, adapté de Kuwajima et al., 2012). (D) Schéma du mécanisme d'action entre Nr-CAM, Plexine-1 et Sema6D démontré dans les travaux de Kuwajjima et al. 2012 au niveau du chiasma optique. La Sema6D des cellules gliales seule est répulsive pour le complexe Nr-CAM / Plexine-A1 exprimé par les axones rétiniens tandis que le complexe formé par la Sema6D / Nr-CAM des cellules gliales et Plexine-A1 des neurones chiasmatiques (SSEA1) est attractif pour les axones rétiniens (Adapté de Yoshida 2012).

iv. Guidage/ciblage axonal et interactions axone-axone

Le guidage axonal au sens large transcrit le fait que les axones sont orientés tout le long de leur développement jusqu'à leurs cibles, qu'ils innervent. Dans de nombreux cas, pour les conduire jusqu'à leurs cibles, les axones se regroupent et sont fasciculés formant ainsi ce qu'on appelle un tractus ou un nerf, comme décrit dans le système visuel. Grâce à leur propriété de signal répulsif ou attractif, les Sémaphorines sont souvent impliquées dans la formation de tractus et le guidage des axones au sein d'une voie toute tracée, certaines Sémaphorines permettant de les contraindre au sein d'un tractus et d'autres de les attirer vers leurs cibles. Ainsi, Sema6A et ce surement via Plexine-A3 et Plexine-A4, permet le guidage des axones dans le tractus cortico-spinal (Faulkner *et al.*, 2008; Rünker *et al.*, 2008). La Sema3C quant à elle contribue à l'effet attracteur via la Nrp1 des neurones calretinine positifs dans le corps calleux sur les axones calleux (Niquille *et al.*, 2009).

Ainsi les tractus ou nerfs constituent un tronc principal à partir duquel les axones défasciculent pour en sortir aux abords de leur cible et aller arboriser à l'intérieur de celle-ci. Ce processus peut concerner soit un axone entier soit seulement une de ses branches, que l'on appelle alors branche collatérale. Ce guidage précis aux abords des cibles est plus souvent appelé ciblage et fait principalement intervenir l'interaction entre molécules de guidage présentes dans la cible avec des récepteurs présents sur les axones. Cependant, d'autres études décrivent également des mécanismes impliquant une interaction entre les axones comme étant importants à la fois pour la fasciculation des axones mais aussi pour un pré-ciblage avant leur arrivée dans les cibles. Certains axones pourraient alors servir de guide aux autres axones arrivant plus tard et constituer ainsi un ensemble d'axones dits « pionniers ». Les Sémaphorines semblent impliquées dans les deux types d'interaction afin de permettre le ciblage de nombreux axones.

Comme décrit précédemment, les Sémaphorines sont en effet impliquées dans le ciblage axonal et en particulier dans le choix des cibles dans le système visuel des mammifères par les axones rétiniens (partie Système visuel-4-b-ii). Un exemple de leur implication dans des interactions axone-axone servant au ciblage a été observé durant le développement des neurones sensoriels olfactifs (OSNs) chez la souris. Les OSNs expriment un seul type de récepteur odorant (OR) et ceux exprimant le même récepteur convergent vers la même région (appelée glomérule) dans le bulbe olfactif (Mombaerts, 2006; Mori &

Sakano, 2011). Sema3A via la Nrp1 et Sema3F via Nrp2 sont impliquées dans la topographie des projections des neurones olfactifs dans le bulbe (Imai *et al.*, 2009; Takeuchi *et al.*, 2010). Le taux d'expression Nrp1 (en gradient) détermine la position des glomérules le long de l'axe antéro-postérieur du bulbe, mais l'interaction entre les axones et le bulbe ne semble pas nécessaire dans ce processus, l'absence de bulbe n'induisant pas de défaut dans la topographie (Imai *et al.*, 2009). Dans ce processus de ciblage, ce n'est donc pas une interaction entre axone et cible mais inter-axonale qui a lieu, la signalisation entre Sema3A et Npn1 régulant le tri des axones des OSNs le long du nerf olfactif (Imai *et al.*, 2009). La signalisation entre Sema3F et Npn2 semble elle réguler la topographie des OSNs le long de l'axe dorso-ventral dans le bulbe olfactif (Takeuchi *et al.*, 2010). La Sema3F serait sécrétée par les axones arrivant en premier dans le bulbe olfactif au niveau antéro-dorsal et repousserait les axones exprimant Nrp2 arrivant plus tard, la Nrp2 étant exprimée selon un gradient elle aussi (Takeuchi *et al.*, 2010).

Un mécanisme semblable d'axones « pionniers » guidant les autres a aussi été décrit dans le développement des neurones moteurs. En effet, Sema3A via la Npn1 est importante pour la fasciculation et le guidage des axones moteurs dans les membres (Huber *et al.*, 2005). De même Sema3F via Npn2 participe au guidage des neurones moteurs exprimant Npn2 le long d'une voie ventrale dans les membres antérieurs (Huber *et al.*, 2005). Si les mutants déficients pour Sema3A ou Npn1 présentent des défauts de fasciculation et des branches ectopiques dans les nerfs périphériques, la délétion spécifique de Npn1 dans les axones moteurs perturbe la fasciculation des axones moteurs mais pas sensoriels tandis que la délétion de Npn1 dans les axones sensoriels induit une défasciculation des neurones moteurs. Ainsi la fasciculation des neurones moteurs repose sur une interaction Npn1-dépendante avec les axones sensoriels (Huettl *et al.*, 2011).

De même chez la drosophile, la Sémaphorine transmembranaire Sema-1a régule les interactions inter-axonales, par exemple entre axones moteurs (Jeong *et al.*, 2017) ou entre axones des photorécepteurs (Hsieh *et al.*, 2014) et ce en jouant à la fois un rôle de ligand et de récepteur.

v. Formation des synapses

Pour clôturer le fait que les Sémaphorines sont importantes à tous les stades du développement neuronal, on mentionnera qu'elles sont également impliquées dans les

mécanismes de formation et d'élimination des synapses. Par exemple, la signalisation entre Sema6D et Plexine-A1 régule le positionnement des neurones sensoriels proprioceptifs dans la moelle épinière dorsale et la formation de synapses (Yoshida *et al.*, 2006; Leslie *et al.*, 2011). Plexine-A1 est exprimée uniquement dans les neurones sensoriels proprioceptifs mais pas dans les neurones cutanés, tandis que Sema6D est exprimée dans la moelle épinière dorsale (Yoshida *et al.*, 2006). Chez les souris déficientes pour Plexine-A1 ou Sema6D, les neurones proprioceptifs innervent de façon ectopique la corne dorsale de la moelle épinière (Yoshida *et al.*, 2006; Leslie *et al.*, 2011). Les oligodendrocytes ectopiques associés aux neurones proprioceptifs (car ils sont plus myélinisés que les neurones cutanés) dans la corne dorsale chez les souris mutantes pour Sema6D ou Plexin-A1 inhibent la formation de synapses (Yoshida *et al.*, 2006; Leslie *et al.*, 2011). Une fois que les axones proprioceptifs ont rejoint la moelle épinière ventrale, une autre Sémaphorine : la Sema3E régule via Plexine-D1 le nombre de synapses formées entre les neurones cutanés et les neurones moteurs (Pecho-Vrieseling *et al.*, 2009).

Au niveau du système nerveux central, les signalisations impliquant Sema3A/Nrp1/Plexine-A4 et Sema3F/Nrp2/Plexine-A3 régulent par exemple la connectivité via leur implication respective dans la croissance dendritique ou dans la croissance et la distribution des épines dendritiques (Tran *et al.*, 2009).

Pour compléter ce rôle dans la formation des synapses, les Sémaphorines participent également aux mécanismes d'élimination des synapses inutiles. Par exemple Plexine-A3, Plexine-A4 et Nrp2 sont impliquées dans l'élimination spécifique de synapses formées par les axones corticospinaux venant du cortex visuel mais pas ceux venant du cortex moteur (Low *et al.*, 2008). De même les Sema3F via Nrp2 et Plexine-A3 participent à l'élimination de collatérales des fibres moussues (Bagri *et al.*, 2003).

b. En dehors du système nerveux

i. Angiogenèse et vasculogenèse

Le développement de la vascularisation a de nombreux points communs avec celui du système nerveux et les Sémaphorines comme d'autres molécules du développement du système nerveux sont ainsi impliquées dans la formation de premiers vaisseaux sanguins (vasculogenèse) comme dans celle de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants

(angiogenèse). Les vaisseaux émergents sont guidés par des cellules endothéliales du front ou « tip cells». Ces cellules sont similaires à des cônes de croissance pour les neurones et expriment beaucoup de récepteurs communs (Adams & Eichmann, 2010; Tamagnone & Mazzone, 2011). Ainsi par exemple, le signal répulsif des Sémaphorines 3 sur les cellules endothéliales de vaisseaux en croissance permet de diriger la croissance des vaisseaux sanguins inter-somitiques et la formation de l'aorte dorsale du cœur (Tran *et al.*, 2007; Adams & Eichmann, 2010). De même, des signaux répulsifs entre Sema3E et Plexine-D1 permettent une vascularisation précise de la rétine (Oh & Gu, 2013).

De façon générale, il s'avère que certaines Sémaphorines peuvent se lier aux récepteurs des VEGF (Toyofuku, Zhang, Kumanogoh, Takegahara, Yabuki, *et al.*, 2004), pouvant ainsi servir de signal aux cellules endothéliales les exprimant ou servir d'antagoniste aux VEGF (Koch & Claesson-Welsh, 2012; Chauvet *et al.*, 2013; Oh & Gu, 2013). Ainsi, ce rôle des Sempahorines dans le développement de la vasculature illustre bien les interconnexions entre le développement du système nerveux et celui du système vasculaire.

ii. Autres systèmes

Les Sémaphorines sont exprimées de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus (Yazdani & Terman, 2006). Elles régulent ainsi de façon générale la morphologie et la motilité cellulaire durant le développement de nombreux systèmes tels que cardiovasculaire, immunitaire, endocrine, hépatique, rénal, reproductif, respiratoire ou musculosquelettique (Alto & Terman, 2017). Il s'avère que le développement du rein est caractérisé par la morphogenèse de tissus épithéliaux, impliquant l'expansion d'un tube épithélial et la formations de branches tubulaires (Michos, 2009) ressemblant quelque peu à l'innervation ou à la vascularisation. Par exemple, la Sema3A va inhiber les mécanismes de branchements des bourgeons urétraux tandis que Sema3 les favorise (Reidy & Tufro, 2011).

Tout comme dans les systèmes nerveux et vasculaire, les Sémaphorines ont un rôle important dans le système immunitaire via le contrôle des mouvements cellulaires. La Sema4D (autrefois appelée CD100) a été identifiée pour la première fois en tant qu'antigène des lymphocytes T (Bougeret *et al.*, 1992; Delaire *et al.*, 1998). Depuis, toutes les autres classes de Sémaphorines des Vertébrés ont été impliquées dans des fonctions immunitaires (Kumanogoh & Kikutani, 2013). En effet, les délétions de différentes Sémaphorines chez la souris induisent des défauts de migration des cellules immunitaires (Suzuki *et al.*, 2008;

Takamatsu & Kumanogoh, 2012; Roney *et al.*, 2013). Par exemple, certains récepteurs des Sémaphorines sont exprimés par les lymphocytes T qui migrent au sein du thymus jusqu'à devenir des cellules T matures (Mendes-da-Cruz *et al.*, 2012). Les Sémaphorines agissent alors comme signaux répulsifs afin de diriger cette migration (Lepelletier *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2012). Certaines Sémaphorines transmembranaires sont, elles, impliquées dans la communication entre différents types de cellules immunitaires pour déclencher leur fonction (Suzuki *et al.*, 2008; Kumanogoh & Kikutani, 2013). Par exemple, des cellules dendritiques présentatrices d'antigène qui expriment Plexine-A1 vont stimuler les cellules T via la Sema6D exprimée à leur membrane (Takegahara *et al.*, 2006).

Enfin, au vu de leurs nombreuses fonctions, les Sémaphorines ont été liées à différentes maladies affectant les systèmes dans lesquels elles agissent mais elles jouent également un rôle dans la progression des cancers. Elles peuvent agir directement sur les cellules cancéreuses qui les expriment ainsi que leurs récepteurs affectant ainsi leur croissance, leur motilité et leur métastase. Par exemple Sema3A est capable de réduire la migration et l'invasion par les cellules cancéreuses du sein en stimulant l'expression d'intégrine (Bachelder *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2009; Pan & Bachelder, 2010). Les Sema3B et 3F inhibent la croissance des cellules cancéreuses du poumon (Tomizawa *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2002). Inversement l'interaction entre Sema6D avec Plexine-A1 et VEGFR2 induit une croissance des cellules malignes de mésothéliomes (Catalano *et al.*, 2009). De plus, les Sémaphorines ont un effet sur les cellules voisines des cellules cancéreuses, comme les cellules inflammatoires, les fibroblastes, ou les cellules endothéliales (Tamagnone, 2012; Gu & Giraudo, 2013; Cagnoni & Tamagnone, 2014). Ainsi, certaines Sémaphorines ont un effet pro-tumoral de par leur capacité à recruter certains types de cellules immunitaires, à réguler la production de facteurs pro-inflammatoires et pro-angiogéniques au voisinage des tumeurs (Squadrito & De Palma, 2011). Par exemple l'expression de Sema4D est favorisée dans le cancer et favorise l'angiogenèse (Basile *et al.*, 2004, 2006; Bielenberg *et al.*, 2004; Sierra *et al.*, 2008) alors que les Sémaphorines 3 qui ont un effet anti-angiogénique vont être diminuées dans le cancer (Bielenberg *et al.*, 2004; Maione *et al.*, 2009).

RESULTATS

1. ARTICLE

Résumé de l'article

Durant le développement du système visuel, certains mécanismes permettant la mise en place des connexions entre la rétine et les différentes cibles du système visuel restent peu compris. Si les défauts de guidage et en particulier au niveau du chiasma optique ainsi que les défauts de raffinement des projections rétiniennes dans les cibles ont été beaucoup étudiés, les mécanismes de ciblage spécifique sont difficiles à isoler dans un phénotype des autres types de mécanismes.

En étudiant les souris déficientes en Sema6D ou en Plexine-A1, nous avons identifié un nouveau type de phénotype présentant des défauts de ciblage spécifique qu'il est donc particulièrement intéressant d'étudier. Les Sémaphorines et leurs récepteurs connus Plexines sont deux familles de protéines itérativement utilisées pour la connectivité neuronale. De plus chaque Sémaphorine est impliquée dans de nombreux mécanismes de façon spécifique tout en étant utilisée de façon redondante dans divers systèmes ou dans un même système au cours du développement et ce grâce à des mécanismes de signalisation parfois complexes. C'est pourquoi j'ai cherché à déterminer comment ces deux protéines pouvaient être impliquées dans un mécanisme de ciblage spécifique dans le système visuel grâce à l'étude de ce nouveau phénotype.

Par traçage antérograde des projections rétiniennes, nous avons pu montrer que chez les souris Sema6D$^{-/-}$ ou Plexine-A1$^{-/-}$, certaines d'entre elles innervent des régions ectopiques en bordure du CGLd, de l'autre côté du tractus optique qui pénètre dans le CGLd au lieu de seulement le contourner. Nous avons ainsi mis en évidence un nouveau rôle du couple Plexine-A1 et Sema6D pour l'innervation spécifique du CGLd par les axones rétiniens. De plus, l'analyse des souris simple ou double hétérozygotes Sema6D$^{+/-}$ et Plexine-A1$^{+/-}$ nous a permis de prouver que ces deux protéines interagissent durant ce mécanisme qui s'avère être également dose-dépendant. Enfin, par électroporation rétinienne *in utéro* de shARN, nous avons mis en évidence la nécessité de Sema6D et de Plexine-A1 dans la rétine pour l'innervation des axones rétiniens et ce via des effets non-cellulaire autonomes.

Ces résultats révèlent à la fois (1) un nouveau type de phénotype permettant l'étude d'un mécanisme de ciblage spécifique, (2) un nouveau rôle pour le couple Sema6D / Plexine-A1 durant le développement des axones rétiniens et (3) un mécanisme complexe dans lequel Sema6D et Plexine-A1 permettent de façonner l'innervation de régions cérébrales par certains axones via une communication inter-axonale. Ce mécanisme dose-dépendant et non-cellulaire autonome nous suggère un processus développemental impliquant des axones pionniers capable de guider l'innervation d'autres axones rétiniens par des interactions axone-axone et mettrait ainsi de nouveau en lumière ce concept encore peu étudié.

Semaphorin-6D and Plexin-A1 act in a dose-dependent and double non cell-autonomous manner for retinal axon positioning and targeting

Delphine S. Prieur 1,2,3, Cédric Francius 1,2,3, Patricia Gaspar 1,2,3, Carol A Mason 4,5,6, Alexandra Rebsam 1,2,3,*

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR-S 839, 75005, Paris, France

2 Université Pierre et Marie Curie, 75005, Paris, France

3 Institut du Fer à Moulin, 75005, Paris, France

4 Department of Neuroscience, Columbia University's Mortimer B. Zuckerman Mind Brain Behavior Institute, New York, New York, USA

5 Department of Pathology and Cell Biology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, New York, USA

6 Department of Ophthalmology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, New York, USA

* Corresponding author: Alexandra Rebsam, INSERM U839, Institut du Fer à Moulin, 17 rue du fer à moulin, 75005, Paris, France. Phone: +33 1 45 87 61 27; Fax: +33 1 45 87 61 32; email: alexandra.rebsam@inserm.fr

Short title: Plexin-A1 and Semaphorin-6D in axonal development

Abstract

Semaphorins and Plexins form ligand/receptor pairs crucial in a wide range of developmental processes in the nervous, vascular, immune, bone systems and in cancer. These Semaphorin/Plexin duos induce various responses extending from cell proliferation, differentiation, morphology, migration and motility due to complex downstream signaling and the ability to signal within the same cell (cis) or different cells (trans). Furthermore, the ability of semaphorins to also act as signaling receptors instead of ligands allows multiplex responses. Here, we describe a novel role for Semaphorin-6D (Sema6D) and Plexin-A1 in axon positioning and targeting. In Plexin-A1 or Sema6D mutant mice, the optic tract enters the dorsolateral geniculate nucleus (dLGN) instead of lining it and some retinal axons are forming ectopic projections at the border between the dLGN and the pial surface. Sema6D and Plexin-A1 act together and in a dose-dependent manner as retinal projections are altered proportionally to the decreased Sema6D or Plexin-A1 expression. In addition, using retinal in utero electroporation of Sema6D or PlexinA1 shRNA, we showed that the downregulation of Sema6D or Plexin-A1 in the retina induces a similar phenotype, suggesting that both proteins are required in RGCs for axon positioning and targeting. Furthermore, we showed that Sema6D and Plexin-A1 both act non-cell autonomously, most likely through axon-axon interactions. Thus, we provide new evidence for a dose-dependent role of Sema6D and PlexinA1 through a double non cell-autonomous effect on axonal positioning and targeting.

Introduction

Semaphorins and their receptors are crucial for a wide range of biological processes. Initially discovered as axon guidance molecules during neuronal development, they have been implicated since in cell migration, angiogenesis, bone homeostasis, immune response and cancer (1). Semaphorins can act as attractive or repulsive cues and their main functional receptors are Plexins which are single-pass transmembrane proteins (2, 3). Semaphorins are known to interact as ligands and Plexins as receptors in the classical "forward" signaling, but transmembrane semaphorins can also mediate "reverse" signaling, acting then as receptors to initiate downstream signaling cascade (4, 5). This has been well described with Drosophila Sema-1a in the nervous system that can mediate both forward and reverse signaling and is required for axon fasciculation, targeting and synapse formation (6-10). Drosophila Sema-1a closest vertebrate homologs are the class 6 Semaphorins, Sema6A–6D (11) and are also capable of bidirectional signaling. In Verterbrates, Sema6D and Plexin-A1 have been involved in chick cardiac development where forward signaling is required for ventricular expansion and reverse signaling for trabecular formation (involving migration of myocardial cells)(12, 13). Furthermore, semaphorins can signal in trans (with adjacent cells) or in cis (within the same cell)(4, 5), adding another layer of complexity and signaling possibilities. Indeed, cis interaction can simply prevent trans interactions of either the Plexin (14) or the Semaphorin (15), or can directly activate Plexin signaling within the same cell (16). Hence, Semaphorin/Plexin signaling is a complex signaling pathway allowing different cellular responses through multiple combinations of cis/trans and reverse/forward signaling.

In the mouse visual system, retinal axons from each eye are guided towards the optic chiasm and fasciculate in the optic tract before splaying out as they reach their thalamic targets, such as the dorsolateral geniculate nucleus (dLGN) (17). While some retinal axons traverse the visual thalamus, most retinal axons remain at the pial surface of the dLGN and continue to course towards the midbrain (17, 18). To innervate the dLGN, axons that reach their final target (the superior colliculus) send a collateral through the dLGN. At E16, retinal axons do not send collaterals to the dLGN but by P0, they have emitted collaterals that dive into and branch within the dLGN (18). At P3, retinal axon collaterals from both eyes have innervated the dLGN and are intermingled. From P4, retinal axon terminals from the ipsilateral or contralateral eye start branching and concomitantly prune exuberant branches (19), leading to the segregation of ipsilateral and contralateral axons in different regions of the dLGN by P7 (18, 20).

Here, we identify a new role of Sema6D and Plexin-A1 in the position and targeting of retinal axons. Moreover, our findings highlight a new developmental step required for retinal axon targeting. Using loss of function experiments, we determine that Sema6D and Plexin-A1 interact together in a dose-dependent manner for this phenomenon. Furthermore, we describe for the first time a double non-cell autonomous effect of Sema6D and Plexin-A1, suggesting that bidirectional interaction is at hand for the same biological process.

Results and Discussion

Sema6D and Plexin-A1 are both involved in dLGN targeting by retinal axons

We used ocular injections of cholera toxine subunit B (CTB) coupled to AlexaFluor dyes in Sema6D or Plexin-A1 knock-out (KO) mice to trace the retinal projections in the dLGN, the major target of retinal axons in the brain. In the dLGN of Sema6D-KO and Plexin-A1 KO mice, retinal axons from both eyes innervate ectopic target regions forming “patches” on the other side of the optic tract (Fig.1C,F) compared to projections in control dLGN (Fig.1A,D). Furthermore, while in control mice, the optic tract is encompassing and lining the dLGN and run along the pial surface (Fig.1A,D), in KO mice, the optic tract partly pass trough the superficial dLGN and slightly dive in, resulting in a small part of the dLGN being on the other side of the optic tract (Fig.1C,F). This ectopic region receives projections from both contralateral and ipsilateral RGCs in mutant mice (Fig.1C,F) but no ipsilateral axons normally invade this part of the dLGN (Fig.1A,D)(18, 20).

These ectopic regions contain cellular bodies and synapses (Fig.S1) suggesting that these projections could be functional. Interestingly, the rest of the projections in the dLGN is not affected by the absence of Sema6D or Plexin-A1 (Fig.AC,F), nor the projections in the superior colliculus (data not shown). These results indicate a new role for Plexin-A1 and Sema6D in the developing visual system for the precise targeting within the dLGN. Similar defects are already observed at P3 in Sema6D and Plexin-A1 mutant mice (Fig.S2), showing a strong ectopic ipsilateral innervation at the opposite side of the optic tract. This observation suggests that this phenotype in adult KO mice results from an initial innervation defect rather than a segregation defect as segregation of retinal projection starts at P3 (18). To better describe these ectopic regions, we used iDISCO+ technique to clear Sema6D KO mice brain and observe the dLGN in 3D. This approach showed that ipsilateral projections are in continuity with normal ipsilateral projections, forming an ectopic extension or branch along the optic tract and the contralateral ones are small “boutons” expanding from the normal

contralateral territory (Fig.2). Thus, the ectopic extension could correspond to abnormal axonal branches of certain retinal axons that change their behavior to targeting cues in or around the dLGN in absence of Plexin-A1 or Sema6D.

Interestingly, while most retinal axons are gathered in the optic tract and remain at the surface of the dLGN, several retinal axons pass through the dLGN en route to other targets (18, 21). Although both type of retinal axons emit small collaterals during early postnatal ages in other rodents, the axons that finally emit a collateral and arborize within the dLGN are the one staying in the optic tract at the surface of the dLGN (22, 23). The fact that the optic tract slightly dives in the dLGN instead of staying at the pial surface suggests that retinal axons in the mutant mice are less sensitive to repulsive guidance cues within the dLGN or attractive guidance cues at the pial surface of the thalamus, or that they follow retinal axons that are passing through the dLGN or cannot follow the ones that are at the pial surface. Furthermore, the ectopic projections most likely correspond to additional ectopic branches or collaterals along the retinal axons. However, it remains to be determined whether these axons correspond to axons that are normally eliminated, innervating another target, or innervating the dLGN.

Sema6D and Plexin-A1 interact for dLGN targeting and act in a dose-dependent manner

Interestingly, observations of Plexin-A1+/- or Sema6D+/- heterozygotes mice reveal a similar but lighter phenotype in the dLGN compared to the KO mice, with some contralateral ectopic patches (Fig.1B,E) but less than in KO mice (Fig.1A,D) and no ipsilateral ectopic patches (Fig.1B,E). This intermediate phenotype indicates that Plexin-A1 and Sema6D act in a dose-dependent manner for proper dLGN innervation by retinal axons. Furthermore, it also suggests that ipsilateral projections are less perturbed by the absence of Plexin-A1 or Sema6D than the contralateral ones, because only a total loss of either Plexin-A1 or Sema6D is able to affect ipsilateral projections (Fig.1C,F). Thus, the presence of these ipsilateral patches is specific to a stronger phenotype (total loss of Sema6D or Plexin-A1) compared to the presence of contralateral patches. Sema6D is one of the various Semaphorins able to bind the Plexin-A1 receptor (13, 24, 25). Furthermore, as both Plexin-A1 and Sema6D KO mice show similar phenotype concerning retinal projections in the dLGN, it is likely that Sema6D and Plexin-A1 could interact together. To identify a genetic interaction, we compared retinal projections in the dLGN of Plexin-A1+/-; Sema6D+/- double heterozygotes (Fig.3B) to simple Sema6D+/- heterozygotes (Fig.3A). Interestingly Plexin-A1+/-; Sema6D+/- double heterozygotes present some ipsilateral ectopic projections (Fig.3B) in addition to the

contralateral ectopic projections corresponding to the simple heterozygote phenotype (Fig.3A). The presence of ipsilateral ectopic projections is a sign of a stronger phenotype only detected in single full homozygote knock-out mice (Fig.1AC,F), showing thus that Plexin-A1 and Sema6D interact together in this newly described targeting mechanism and are likely a receptor-ligand couple as previously described in this system (26). Plexin-A1 and Sema6D have been involved in the guidance and the growth of contralateral retinal axons at the optic chiasm by a tripartite complex comprising Plexin-A1, Sema6D and NrCAM during embryonic ages. Thus, at the optic chiasm NrCAM and Plexin-A1 are converting the repulsive effect of Sema6D into a growth promoting effect on retinal axons. However, in our case, NrCAM does not seem to be involved for retinal axon positioning and targeting in the dLGN (data not shown), highlighting the fact that similar molecules are reused through different mechanisms in the same neurons for different steps of their development.

While we cannot rule out that other molecules could be important for this phenotype, such as Sema6C, another known ligand of Plexin-A1 (24), the similarity in the penetrance and the severity of the phenotype in both Sema6D and Plexin-A1 mutant mice and the persistence of this phenotype at adult age (excluding compensatory mechanisms) highly suggest a direct one to one interaction involving only these two molecules. However, this Sema6D/Plexin-A1 duo could still modulate other signaling pathways and thus other molecules could be also important for this step of retinal axon positioning and targeting.

Sema6D and Plexin-A1 are necessary in retina for proper dLGN targeting in a non-cell autonomous manner

In situ hybridization reveal that Plexin-A1 and Sema6D are both expressed in the dLGN and in the Ganglion Cell layer of the retina at P7 (Fig.4). Sema6D seems to be expressed only in a sub-population of RGCs, confirming previous studies (27). As neither molecule is important for retinal lamination and connectivity (27, 28), the previously described phenotype is not due to abnormal retinal development. In order to determine if Plexin-A1 or Sema6D is necessary in RGCs for this targeting mechanism, we used retinal in utero electroporation of sh-RNA constructs to downregulate Sema6D or Plexin-A1 only in retina. The in utero retinal electroporation was done at E14.5 in order to electroporate a large number of RGCs, as their production peaks at this age (29). Generally, more than 25% of the surface of the retina is electroporated (cells labeled with dsred2 reporter) (Fig.S3). Then, an ocular injection of CTB was performed in the electroporated mice, and retinogeniculate projections were analyzed at P15, once the eye-specific map is mature, to assess whether retinal downregulation of

Plexine-A1 or Sema6D is sufficient to perturb retinal projections. In these electroporated mice with retinal knockdown of either Sema6D or Plexin-A1, we observed dLGN targeting defects of retinal axons (Fig.5), very similar to the ones previously described in heterozygote or homozygote mice (Fig.1). In the dLGN located contralaterally to the electroporated retina with Sema6D or Plexin-A1 shRNA, we observed some ectopic projections at the other side of the optic tract as well as an optic tract slightly entering the dLGN (Fig.5A-F,J). This phenotype is similar to the phenotype observed in Sema6D+/- (Fig.1B) or Sema6D -/- (Fig.1C) and Plexin-A1+/- (Fig.1E) or Plexin-A1-/- (Fig.1F). This result indicates that Plexin-A1 and Sema6D are both necessary in the retina to play their role in the dLGN precise targeting. Interestingly, we can see that these ectopic patches are not always dsRed2-positive, meaning that electroporated axons are not the only ones innervating these ectopic regions. Thus, a lack of Plexin-A1 or Sema6D in a few retinal axons is able to influence the targeting behavior of other retinal axons. This finding shows that Plexin-A1 and Sema6D can act non-cell autonomously between retinal axons. This non-cell autonomous effect was confirmed as in some electroporated mice with Sema6D shRNA, we found ipsilateral ectopic regions located in the contralateral dLGN to the electroporated retina (Fig.5E,K) corresponding thus to axons coming from the non-electroporated eye. In addition, we also observed contralateral ectopic patches in the dLGN located ipsilaterally to the electroporated retina (Fig.5H,I,L) in a few cases. Similarly, these projections are coming from the non-electroporated eye. A non-cell autonomous effect of Sema6D and Plexin-A1 between axons from different eyes can only occur from the optic chiasm, where they regroup to form the optic tract, or along the optic tract where they are fasciculated. Together these observations suggest that Plexin-A1 and Sema6D can mediate axon-axon interactions between RGC axons coming from the same or different eyes and that their interaction is important for retinogeniculate targeting.

Furthermore, concerning the dLGN located ipsilaterally to the electroporated retina, very few axons are dsred2-positives (Fig.5H,I), which could be explained by the fact that the ventrotemporal quadrant of the retina is usually not electroporated (Fig.S2A-C). Surprisingly, the reduction in Plexin-A1 or Sema6D levels in these very few ipsilateral electroporated axons is sufficient to influence some contralateral axons. Moreover, because of the “salt and paper” expression pattern of Sema6D in RCGs (Fig.4), in the case of Sema6D sh-RNA electroporation, only a subset of ds-red2 positives RGCs are likely to be directly affected by this knock-down (Fig.5B,E,H), as several RGCs are not expressing endogenous Sema6D. This consideration reinforces the idea that very few retinal axons, probably the one normally

expressing Sema6D and Plexin-A1, could be responsible for this more generalized mispositioning and mistargeting of retinogeniculate axons.

Guidance molecule for pioneer and follower axons

Interestingly, although most RGCs projecting to the dLGN are also projecting to the SC (19, 30), retinocollicular projections did not seem affected in all mutant mice studied. This is surprising as the downregulation of Plexin-A1 or Sema6D in RGCs should affect the entire projection. Although we cannot rule out that our tracing method is not sensitive enough to capture some alterations in the retinocollicular projection, it is likely that only the axons at the vicinity of the dLGN are affected, highlighting possible interactions at this level rather than solely axon-axon interactions underscored by this non-cell autonomous positioning and targeting defect. Thus, it is possible that a yet unknown molecule at the level of the dLGN could interact with retinal axons and that this signaling pathway is regulated by the Sem6D/Plexin-A1 interaction. This molecule could be expressed within the dLGN neurons or at the pial surface, possibly on glia or blood vessels in this area.

The most striking result is that few axons electroporated with Sema6D or Plexin-A1 shRNA can affect the positioning and targeting of many more retinal axons, even coming from the opposite eye. This suggests an interaction at the level of the optic tract when retinal axons from both eyes converge and that Sema/Plexin signaling could affect either pioneer axons or follower axons. For instance, Sema3F secreted by pioneer axons of the olfactory sensory neurons, will affect the organization of follower olfactory axons expressing different levels of Neuropilin-2, specifying the olfactory topographic map (31). This effect on pioneer axons can also be indirect, as shown with midline neurons that can attract pioneer axons of the corpus callosum through Sema3C/Np1 signaling (32, 33) or by blood vessels that can shape retinal axons in the optic tract (34). More recently, distinct signaling molecules, Netrin and semaphorin on glia have been identified for the guidance of pioneer or follower axons in c.elegans, respectively (35). This suggests that molecules on non-neuronal cells in vertebrates could also differentially regulate the pathway of pioneer and followers axons.

Double non-cell autonomous effect on retinal axons

The other interesting phenotype is that similar effects on retinal axon positioning and targeting are achieved with either Plexin-A1 or Sema6D downregulation, in a dose-dependent and non-cell autonomous manner. Usually, depending on whether the ligand or the receptor is affected, there is either a non-cell autonomous or cell-autonomous effect of its

downregulation. Here, both act non-cell autonomously, thus Plexin-A1 and Sema6D have to act in *trans*. As Sema6D and Plexin-A1 are expressed together in a subset of RGCs, *cis* interactions could be involved as well. This *cis* interaction could simply prevent *trans* interactions between Plexin-A1 on this cell and Sema6D in another cell. Thus, Sema6A and Plexin-A2 interaction in *cis* in starburst amacrine cells in the mouse retina is thought to prevent these cells to be responsive to Sema6A presented in *trans* by other cells in the same layer (14). Another possibility is that the *cis* interaction could prevent *trans* interactions between Sema6D on this axon and Plexin-A1 in another cell. Indeed, the interaction of Plexin-A2 and Sema6A in a specific layer of the hippocampus, renders Sema6A unavailable for *trans* interactions with Plexin-A4 on mossy fiber axons creating a non-repulsive corridor invaded by these axons (15). Finally, cis interactions between Semaphorins and Plexins could directly activate Plexin signaling in *cis*. This is the case in C.elegans motor neuron axons where Semaphorin SMP-1 activates in cis PLX-1, a Plexin-A homolog, to inhibit synapse formation (16). While our experiments cannot distinguish whether *reverse* and/or *forward* signaling is involved, this bidirectional signaling of Sema6D and Plexin-A1 could also be important for the regulation of retinal axon positioning and targeting.

Material and Methods

The methodology used in this study is described in detail in Supplementary Material and Methods. Briefly, we performed Cholera-Toxin beta subunit (CTB)-AlexaFluor dye ocular injections for anterograde labeling of retinal projections and in utero retinal electroporation as previously described (Rebsam et al, 2009, Petros et al., 2009). All the experiments were approved (animal protocol #2496) by the French Ministry of Agriculture and Forestry, and conducted in compliance with the European community ethical guidelines - decree 2010/63/UE

Acknowledgements

This work was funded by an ANR Grant #ANR-12-BSV4-0002 and a Retina France Grant to AR, a doctoral fellowship from the French Ministry of Education and Research to DSP, by NIH Grant # to CAM. We are members of the Ecole des Neurosciences de Paris training network and Labex BioPsy.

References

1. Alto LT & Terman JR (2017) Semaphorins and their Signaling Mechanisms. Methods in molecular biology 1493:1-25.

2. Winberg ML, et al. (1998) Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. Cell 95(7):903-916.

3. Tamagnone L, et al. (1999) Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. Cell 99(1):71-80.

4. Battistini C & Tamagnone L (2016) Transmembrane semaphorins, forward and reverse signaling: have a look both ways. Cellular and molecular life sciences : CMLS 73(8):1609-1622.

5. Jongbloets BC & Pasterkamp RJ (2014) Semaphorin signalling during development. Development 141(17):3292-3297.

6. Cafferty P, Yu L, Long H, & Rao Y (2006) Semaphorin-1a functions as a guidance receptor in the Drosophila visual system. J Neurosci 26(15):3999-4003.

7. Komiyama T, Sweeney LB, Schuldiner O, Garcia KC, & Luo L (2007) Graded expression of semaphorin-1a cell-autonomously directs dendritic targeting of olfactory projection neurons. Cell 128(2):399-410.

8. Yu L, Zhou Y, Cheng S, & Rao Y (2010) Plexin a-semaphorin-1a reverse signaling regulates photoreceptor axon guidance in Drosophila. J Neurosci 30(36):12151-12156.

9. Jeong S, Juhaszova K, & Kolodkin AL (2012) The Control of semaphorin-1a-mediated reverse signaling by opposing pebble and RhoGAPp190 functions in drosophila. Neuron 76(4):721-734.

10. Godenschwege TA, Hu H, Shan-Crofts X, Goodman CS, & Murphey RK (2002) Bi-directional signaling by Semaphorin 1a during central synapse formation in Drosophila. Nat Neurosci 5(12):1294-1301.

11. Zhou L, et al. (1997) Cloning and expression of a novel murine semaphorin with structural similarity to insect semaphorin I. Mol Cell Neurosci 9(1):26-41.

12. Toyofuku T, et al. (2004) Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Sema6D reverse signalling. Nature cell biology 6(12):1204-1211.

13. Toyofuku T, et al. (2004) Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. Genes & development 18(4):435-447.

14. Sun LO, et al. (2013) On and off retinal circuit assembly by divergent molecular mechanisms. Science 342(6158):1241974.

15. Suto F, et al. (2007) Interactions between plexin-A2, plexin-A4, and semaphorin 6A control lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. Neuron 53(4):535-547.

16. Mizumoto K & Shen K (2013) Interaxonal interaction defines tiled presynaptic innervation in C. elegans. Neuron 77(4):655-666.

17. Tuttle R, Braisted JE, Richards LJ, & O'Leary DD (1998) Retinal axon guidance by region-specific cues in diencephalon. Development 125(5):791-801.

18. Godement P, Salaun J, & Imbert M (1984) Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. J Comp Neurol 230(4):552-575.

19. Dhande OS, et al. (2011) Development of single retinofugal axon arbors in normal and beta2 knock-out mice. J Neurosci 31(9):3384-3399.

20. Jaubert-Miazza L, et al. (2005) Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. Vis Neurosci 22(5):661-676.

21. Jhaveri S, Erzurumlu RS, & Schneider GE (1996) The optic tract in embryonic hamsters: fasciculation, defasciculation, and other rearrangements of retinal axons. Vis Neurosci 13(2):359-374.

22. Jhaveri S, Edwards MA, & Schneider GE (1991) Initial stages of retinofugal axon development in the hamster: evidence for two distinct modes of growth. Experimental brain research 87(2):371-382.

23. Bhide PG & Frost DO (1991) Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets. J Neurosci 11(2):485-504.

24. Yoshida Y, Han B, Mendelsohn M, & Jessell TM (2006) PlexinA1 signaling directs the segregation of proprioceptive sensory axons in the developing spinal cord. Neuron 52(5):775-788.

25. Takegahara N, et al. (2006) Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. Nature cell biology 8(6):615-622.

26. Kuwajima T, et al. (2012) Optic chiasm presentation of Semaphorin6D in the context of Plexin-A1 and Nr-CAM promotes retinal axon midline crossing. Neuron 74(4):676-690.

27. Matsuoka RL, Sun LO, Katayama K, Yoshida Y, & Kolodkin AL (2013) Sema6B, Sema6C, and Sema6D expression and function during mammalian retinal development. PLoS One 8(4):e63207.

28. Matsuoka RL, et al. (2011) Class 5 transmembrane semaphorins control selective Mammalian retinal lamination and function. Neuron 71(3):460-473.

29. Drager UC (1985) Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. Proc R Soc Lond B Biol Sci 224(1234):57-77.

30. Ellis EM, Gauvain G, Sivyer B, & Murphy GJ (2016) Shared and distinct retinal input to the mouse superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus. Journal of neurophysiology 116(2):602-610.

31. Takeuchi H, et al. (2010) Sequential arrival and graded secretion of Sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. Cell 141(6):1056-1067.

32. Niquille M, et al. (2009) Transient neuronal populations are required to guide callosal axons: a role for semaphorin 3C. PLoS Biol 7(10):e1000230.

33. Piper M, et al. (2009) Neuropilin 1-Sema signaling regulates crossing of cingulate pioneering axons during development of the corpus callosum. Cerebral cortex 19 Suppl 1:i11-21.

34. Erskine L, et al. (2017) VEGF-A and neuropilin 1 (NRP1) shape axon projections in the developing CNS via dual roles in neurons and blood vessels. Development 144(13):2504-2516.

35. Rapti G, Li C, Shan A, Lu Y, & Shaham S (2017) Glia initiate brain assembly through noncanonical Chimaerin-Furin axon guidance in C. elegans. Nat Neurosci 20(10):1350-1360.

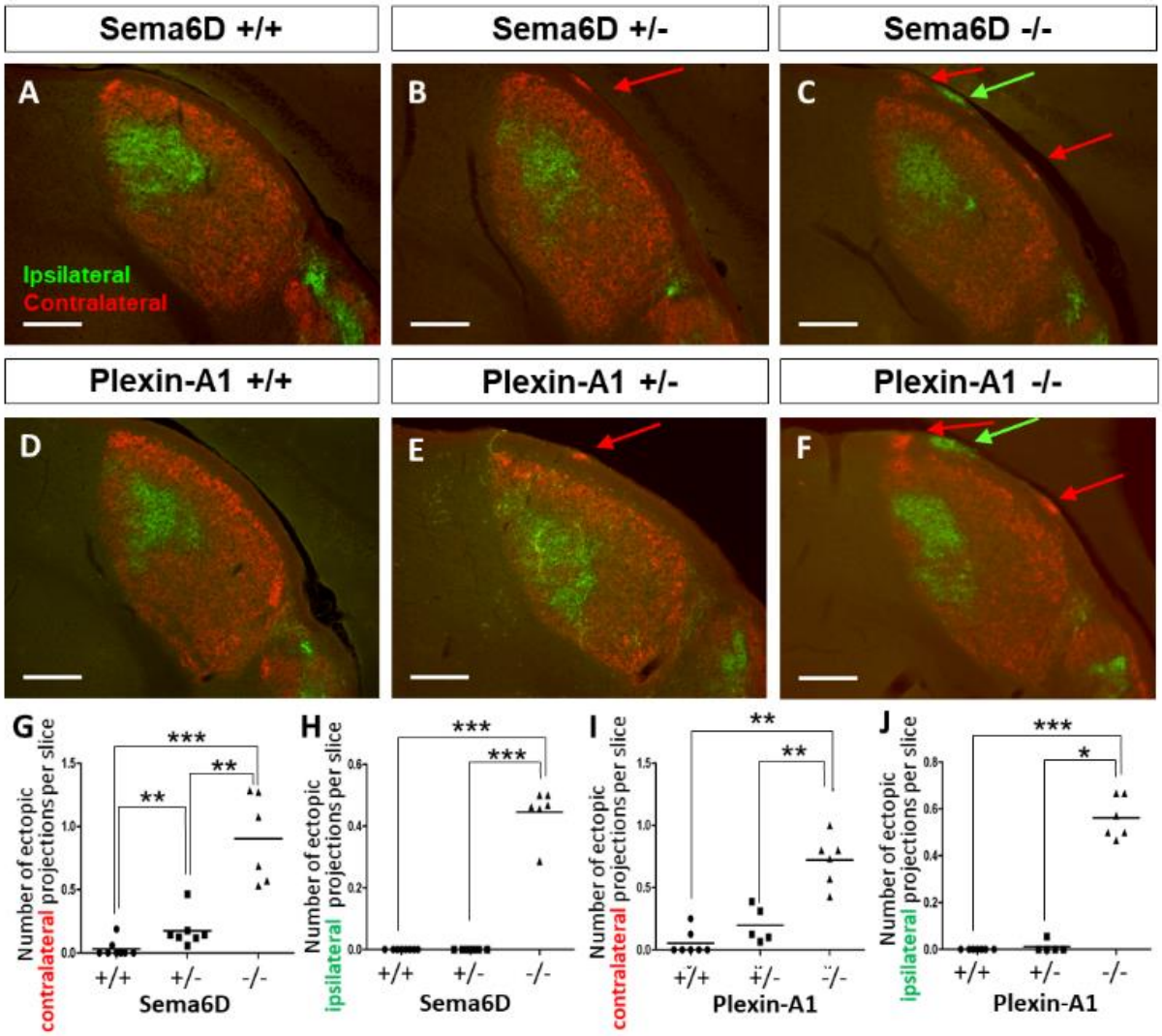


Fig. 1: Sema6D and Plexin-A1 are involved in dLGN targeting by retinal axons with a dose dependent effect.

(A-F) Eye specific projections on dLGN coronal slices in wild type, heterozygotes and knock-out adult mice for Plexin-A1 and Sema6D, respectively. Ipsilateral (in green) and contralateral (in red) projections were labeled by ocular injection of cholera toxin subunit B, coupled with an Alexa fluorophor dye. Compared to wild-type dLGN, Plexin-A1-/- and Sema6D-/- dLGN present some ectopic retinal projections (arrows) localized at the other side of the optic tract, near the ventricle. The optic tract is entering slightly in the dLGN instead of following it. Plexin-A1-/- mice and Sema6D-/- mice show ipsilateral and contralateral ectopic "patches" on slices, whereas Plexin-A1+/- and Sema6D+/- present only contralateral ectopic projections. Scale bar represent 200µm (G-J) quantification of the number of ectopic patches of each dLGN divided by the total number of dLGN slices.

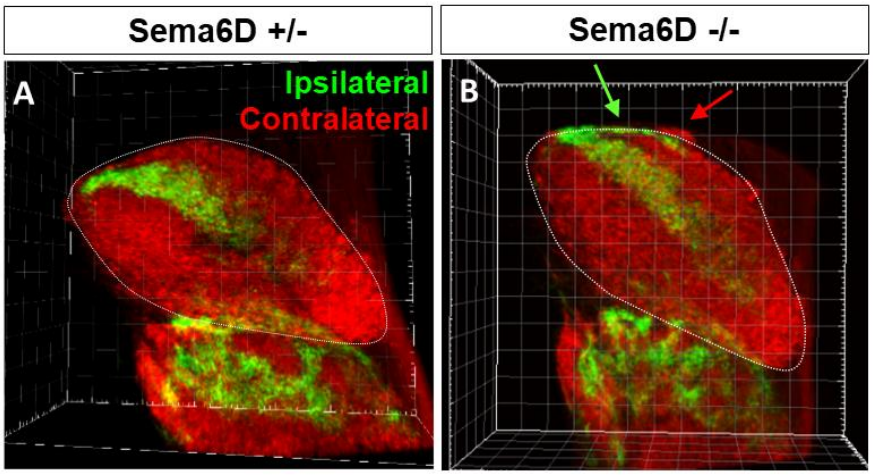


Fig. 2: Ipsilateral ectopic projections in Sema6D mutant mice are an extension of the normal ipsilateral projections.
Eye specific projections in 3D dLGN in Sema6D+/- (as a control) and Sema6D-/- mice at P15. Ipsilateral (in green) and contralateral (in red) projections were labeled by ocular injection of cholera toxin subunit B, coupled with a fluorophore. Arrows show ectopic projections and dashed lines delimit the dLGN.

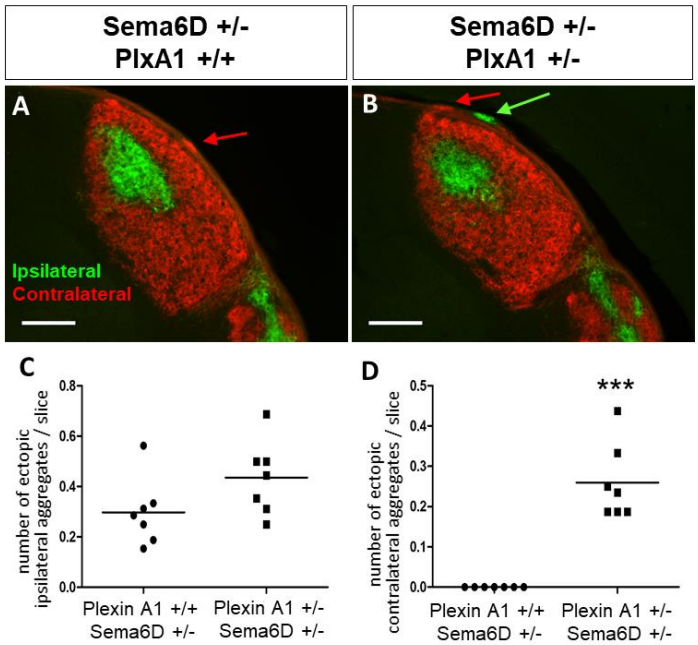


Fig. 3: Sema6D and Plexin-A1 act together for proper dLGN targeting by retinal axons.
(A-B) Eye specific projections on dLGN coronal slices in simple Sema6D+/- heterozygotes and Sema6D+/- ; Plexin-A1+/- double heterozygotes at P15. Ipsilateral (in green) and contralateral (in red) projections were labeled by ocular injection of cholera toxin subunit B, coupled with a fluorophore. The phenotype in double heterozygotes is stronger than in simple heterozygotes. Sema6D+/-; Plexin-A1+/- double heterozygotes present some ipsilateral ectopic patches, reminiscent of a stronger phenotype specific to the single-KO phenotype. Scale bar represent 200µm (C-D) quantification of the number of ectopic patches of each dLGN divided by the total number of dLGN slices.

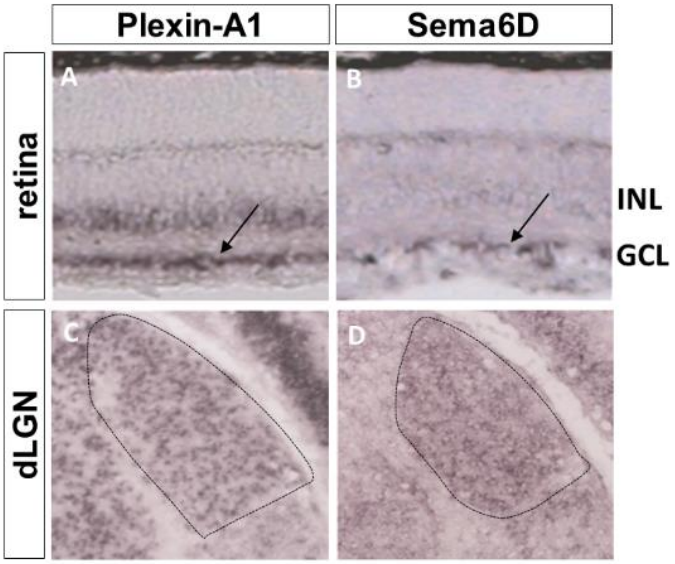


Fig. 4 : In situ hybridization for Sema6D and Plexin-A1 on sections of the retina (A-B) and coronal sections of the dLGN at P7 (C-D).
Both Plexin-A1 and Sema6D are expressed in retinal ganglion cells (localized in the GCL) and in the dLGN. Sema6D is expressed only in a subpopulation of CGRs. GCL: ganglion cells layer, INL : Inner nuclear layer.

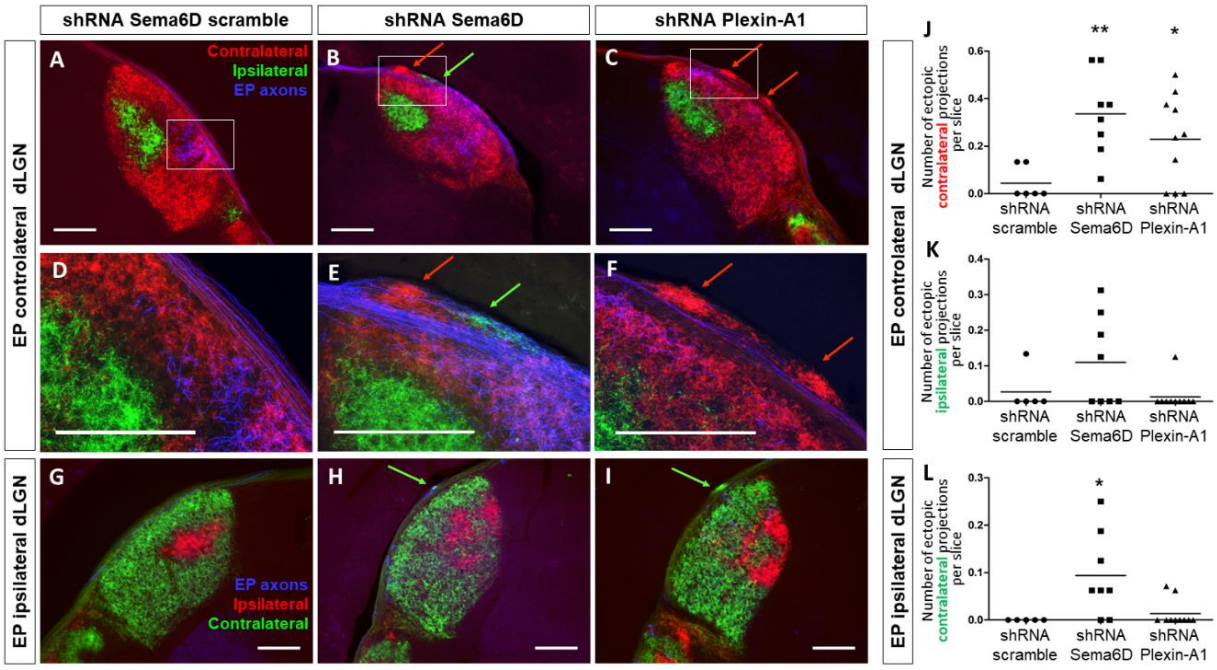


Fig. 5 : Sema6D and Plexin-A1 act non-cell autonomously in retinal axons for proper dLGN targeting.

(A-I) Eye specific projections in P15 dLGN of wild-type mice after retinal in utero electroporation at E14.5 of plasmid coding for shRNA (Sema6 scramble, Sema6D or Plexin-A1) (A-F) Eye specific projections in the dLGN localized contralaterally to the electroporated retina. Ipsilateral (in green) and contralateral (in red) projections were labeled by ocular injection of cholera toxin subunit B, coupled with a fluorophore and electroporated axons (in blue) are labeled with the dsred2 reporter. Electroporated mice with Sema6D or Plexin-A1 shRNA present some ectopic retinal projections (arrows) localized at the other side of the optic tract, near the ventricle. Most of the ectopic projections are not dsred2 positive and ipsilateral ectopic projections are coming from the non-electroporated eye. (G-I) Eye specific projections in the dLGN localized ipsilaterally to the electroporated retina. Electroporated mice with Sema6D or Plexin-A1 shRNA present some ectopic contralateral projections (arrows) localized at the other side of the optic tract and coming from the non-electroporated eye. Scale bar represent 200µm (J-L) quantification of the number of ectopic patches of each dLGN divided by the number of slices showing dLGN.

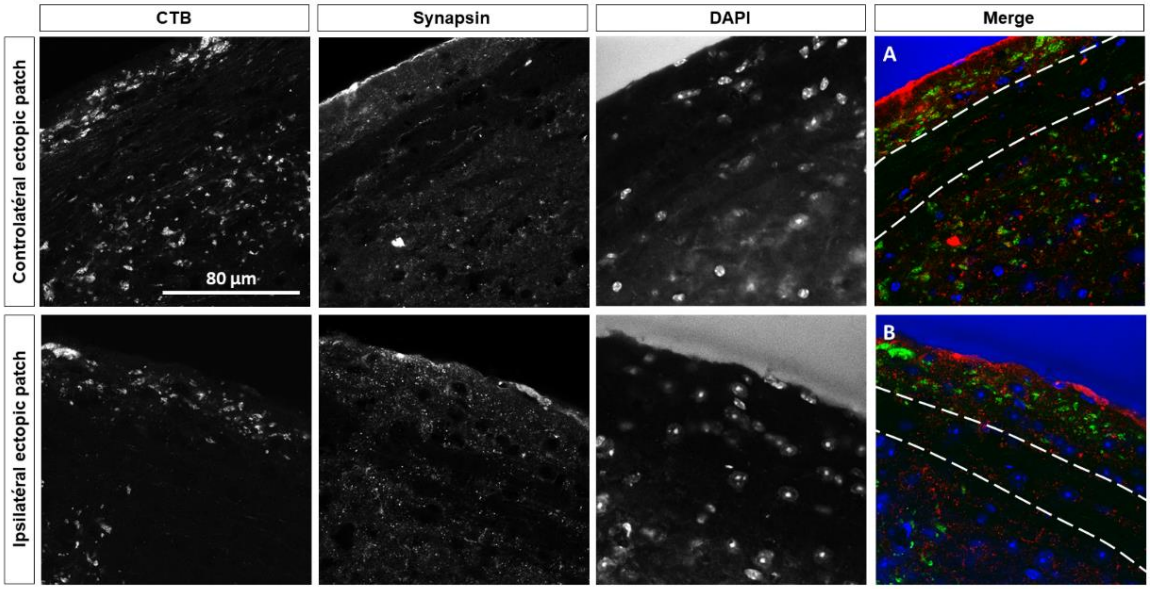


Fig. S1: Ectopic regions showed in Sema6D-/- dLGN contain synapses and cells.
dLGN coronal slices of Sema6D -/- mice. Eye specific projections (contralateral in A and ipsilateral in B) were labeled by ocular injection of cholera toxin subunit B, coupled with an Alexa-488 fluorophor. Presynaptic elements (in red) were immuno-labeled with anti-synapsin antibodies and cells (in blue) were revealed with DAPI staining. Some synapses and cells are visible in the ectopic retinal projections localized at the other side of the optic tract (delimited by dashed lines), near the ventricle.

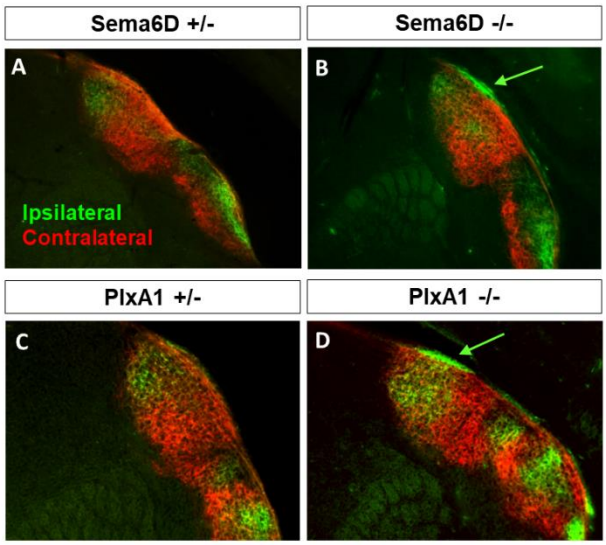


Fig. S2: Sema6D and Plexin-A1 are involved in dLGN targeting by retinal axons during the innervation step.
Eye specific projections on dLGN coronal slices in heterozygotes (as a control) and knock-out mice for Plexin-A1 and Sema6D at P3. Ipsilateral (in green) and contralateral (in red) projections were labeled by ocular injection of cholera toxin subunit B, coupled with a fluorophore. Plexin-A1-/- and Sema6D-/- dLGN already present at P3 ectopic ipsilateral projections (arrows) localized at the other side of the optic tract, near the ventricle.

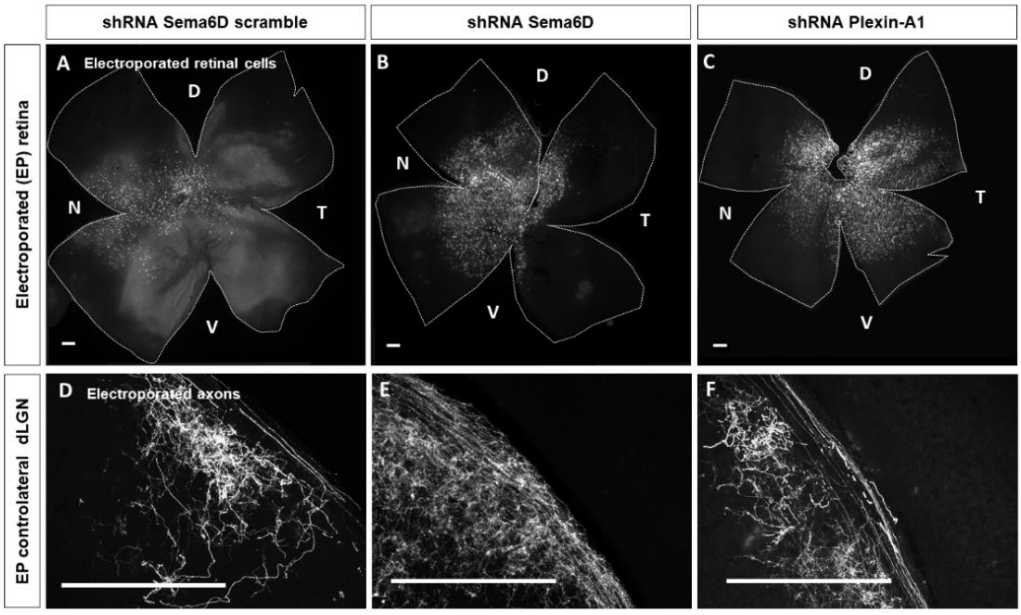


Fig. S3: Electroporated RGCs and retinal axons at P15 after retinal in utero electroporation at E14.5

(A-C) Whole mount retina showing electroporated retinal cells (dsred2 reporter) of wild-type mice after retinal in utero electroporation of plasmid coding for shRNAs (Sema6D scramble, Sema6D or Plexin-A1) (D-F) Electroporated retinal axons invading the dLGN localized contralaterally to the electroporated retina. Scale bar represent 200µm.

Supplementary Material and Methods

Animals

The Plexin-A1-/- mouse line (Yoshida et al. 2006) and the Sema6D-/- mouse line (Takamatsu et al. 2010) were maintained in a C57BL6 background. Plexin-A1+/- ; Sema6D+/- double heterozygotes were generated from these mutants. These mice are born at Mendelian ratios and survive to adulthood. For genotyping of the 2 mouse lines, mouse tail were immerged in 50mM NaOH at 95°C during 1 hour and then neutralized with 1M Tris-HCl. PCR was performed on the tail lysates using the following primers :

Line	Primers for PCR		Band size
Plexin-A1	WT sense	5'-CCTGCAGATTGATGACGACTTCTGC-3'	200 bp
	WT anti-sense	5'-TCATGCAGACCCAGTCTCCCTGTCA-3'	
	Mutated sense	5'-GCATGCCTGTGACACTTGGCTCACT-3'	600 bp
	Mutated anti-sense	5'-CCATTGCTCAGCGGTGCTGTCCATC-3'	
Sema6D	Sense	5'-ACAAACGAGAAACCAGTTTCACC-3'	WT : 850 bp
	Anti-sense	5'-CCAGCAATATAAAGTGTGTCTCG-3'	mutated : 1370

Anterograde labeling of retinogeniculate projections

For the ocular injections, P2 to P6 mice were anesthetized on ice during 5-8 min. P13 mice were anesthetized with ketamine-xylazine (75 mg/kg and 15 mg/kg) in NaCl 0,9% and concentrations were multiplied by 2 for the adult mice (>1 month). After anesthesia, each eye is injected with 2 µL of 0,2% cholera-toxin subunit B (CTB, Molecular Probes) conjugated to AlexaFluor 488, 594 or 647 depending on the experiment and diluted in 1% Dimethylsulfoxide (DMSO). If eyes are not naturally open (before P3), the skin was cut with a scalpel following the natural line between the 2 eyelids. Whole eyes of P0 to adult mice were injected intravitreally twice (diametrically opposed injections) with a glass micropipette (Drummond). Each eye received finally 2 to 3 µL of 0,2% cholera-toxin subunit B (CTB, Molecular Probes) conjugated to AlexaFluor 488, 594 or 647 depending on the experiment and diluted in 1% Dimethylsulfoxide (DMSO). Depending on their age, mice were anesthetized with Pentobarbital (547 mg/kg) and then perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.12M phosphate buffer (PB) 24h (P3) or 48h (P15-adult) after tracer injection.

Plasmids

The used plasmids were obtained by cloning using the following vectors and oligonucleotides. Concerning the shRNA plasmids, shRNA was obtained directly in pLKO vector from Sigma. ShRNA scramble were designed and corresponding oligonucleotides were integrated in Sigma MISSION pLKO.1-puro Empty Vector Control Plasmid DNA using The RNAi Consortium - Broad Institute protocol. shRNA and the mU6 promoter were then cut and placed in a pCAGG-dsRed2 vector using T4 DNA-ligase.

Final Plasmids	Used plasmids	Origin	Digestion by
pCAGG-shRNA	pCAGGS-DsRed2	(Watanabe et al. 2007)	HindIII and BsaB1
	pLKOs-shARN-Sema6D	Sigma Mouse MISSION shRNA Bacterial Clone TRCN0000112329 (NM_172537.2-2877s1c1) Sens sh sequence : 5'-GCCATAGAATATGGAAACTAT-3'	HindIII and Hinc11
	pLKOs-shARN-PlxA1	Sigma Mouse MISSION shRNA Bacterial Clone TRCN0000079190 (NM_008881.1-1752s1c1) Sens sh sequence : 5'- CCTCTATGCTATGACGGAGAA -3'	HindIII and Hinc11
	pLKOs-shARN-Sema6D scramble	Sens sh sequence : 5'- GGCAATTTAATACGCTAGAAA -3' In Sigma MISSION pLKO.1-puro Empty Vector Control Plasmid DNA	HindIII and Hinc11
	pLKOs-shARN-PlxA1 scramble	Sens sh sequence : 5'- GCGATACGTAGCGACTTACAT -3' In Sigma MISSION pLKO.1-puro Empty Vector Control Plasmid DNA	HindIII and Hinc11

In utero retinal electroporation

In utero electroporation of retina has been done as previously described (Garcia-Frigola et al. 2007; Petros, Rebsam, and Mason 2009). Pregnant wild-type mice (Janvier Labs) were anesthetized using isoflurane. Left eyes of E14,5 embryos were injected using a glass micropipette (Drummond) and an INJECT+MATIC Microinjector with a mix of plasmidic DNA generated as describe above : pCAGG-shRNAs-dsred2 or empty pCAGG-dsred2 at 2µg/µL. Eyes were then electroporated with 5 pulses of 45V during 50ms every 950ms (Nepagene electroporator) using CUY650P5 electrodes (Sonidel). For whole eye electroporation, the positive electrode was placed on the injected eye and the negative electrode at the opposite side. Mice were then injected sub-cutaneously with flunixin (16 mg/kg) before revival for analgesia after the surgery. To increase the survival of the pups, a swiss female mated one day earlier than the C57bl6 electroporated mice was added to each cage of 2 electroporated mice. At P0, all but 3 Swiss pups were removed to stimulate nursing.

Immunohistochemistry and brain clearing

After perfusion, mice brains were dissected and brains and rest of the head were post-fixed overnight at 4°C in 4% PFA. Retinas were then dissected, oriented with an incision in the dorsal part, immuno-labeled as described below, and whole-mounted. Some whole P15 brains, labeled with CTB were dissected (removal of the cortex and separation of the 2 hemispheres) and transparized following the iDISCO protocol without immunostaining (Nicolas Renier et al., Cell, 2014). Brains were cryoprotected in a bath of PBS, 30% sucrose and 0,01% azide sodium during 24h. CTB injected brains were then coronally cut at 60µm with frozen microtome (Microm). They were immuo-labeled and mounted as retinas in moviol-dabco (Calbiochem, Sigma). Electroporated retina and brain slices were washed in PBS, blocked in 0,1% Triton, 10% horse serum, 0,01% azide sodium in PBS for 30min. They were then incubated at 4°C overnight with primary antibodies in blocking solution followed by incubation with secondary antibodies at room temperature during 1h. In between and after antibodies incubations, there were washed 3 times 10 min in PBS, 0,1% Triton. For DAPI staining, an additional bath of DAPI diluted at 1/2000 in PBS, 0,1% triton was added just after secondary antibodies incubation.

Immunostaining of brain slices and electroporated whole retinas				
target	species	Mono/polyclonal	Dilution	origin
Dsred	rabbit	polyclonal	1/2000	Clontech
Synapsin	mouse	monoclonal	1/500	Synaptic System
target	species	Fluorophor	Dilution	origin
Anti-rabbit	donkey	Cy3	1/2000	Jackson
Anti-mouse	donkey	Cy3	1/1000	Jackson

In situ Hybridization

After perfusion with 4% paraformaldehyde in PB 0,12M, P7 mice brains and retinas were dissected, post-fixed overnight at 4°C in 4% PFA, then rinsed in PB 0,12M. Brains and retinas were cryoprotected overnight in 10% sucrose in PB 0,12M and embedded in 7,5% gelatine and 10% sucrose in PB 0,12M before freezing in cold isopentane (-55°C). 20 µm frozen sections (coronal for brains) are cut on a cryostat (Leica) and air dried briefly. Sections were fixed for 10 min in 4% PFA, washed 3x3 min in PBS. Proteinase K (5µg/ml) in PBS for 10 min (or less) was used followed by 3x3 min washed in PBS. An acetylation step with TEA was performed for 10 min. Sections were then pre-hybridized 2h at 68.5°C in hybridization buffer (50% formamid, 5X SSC, 5X Denhardts, 250µg/ml E. Coli tRNA, 500 µg/ml herring sperm), then overnight in hybridization buffer with RNA probe at 68.5°C. After several washes (5X SSC, 0,2x SSC), sections are equilibrated in B1 buffer (0,1M Tris pH 7.5; 0.15M

NaCl), incubated in blocking solution (B1 + 10% sheep serum) for 1h at room temperature and in anti-DIG solution (B1 + 1% sheep serum + 1/5000 anti-DIG-AP antibody) overnight at 4°C. After rinses in B1, sections were equilibrated in B3 (0,1M Tris pH 9.5; 0.1M NaCl; 50mM MgCl2). Revelation was performed in B3 solution with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (3.5µl/ml), Nitroblue tetrazolium chloride (NBT) (3.5µL/ml) and levamisol (0.24 mg/ml) in the dark until staining is observed. The reaction is stopped by rinsing sections in TE pH 8 several times, fixing in PFA 4% for 30 min, and washing in PBS. Sections are coverslipped and mounted in Gel Mount.

Imaging

Whole mount retinas and brains were images using a Leica-DM6000 fluorescence microscope with a 10X/0.3 objective and the complete image of the retina was reconstructed with Metamorph software. CTB labeled brains were imaged with a 10X/0.4 objective. The high resolution images of ectopic patches and electroporated axons in dLGN were obtained by z-stack projection of images using a Leica SP5 confocal microscope and a 40X objective. Dissected brains transparized by 3 DISCO method were imaged using a a Leica SP5 confocal microscope and a 10X objective.

Analysis

The ectopic aggregates of retinal projections in the dLGN were counted in each 60µm thickness brain slices that show the ipsilateral normal territory in order to count a comparable amount of slice at the same anatomical region and then divided by the number of total dLGN slices presenting an ipsilateral territory. The bar represent the mean and all each individual value is represented as dots. Statistical analysis were performed by GraphPad Prism, using Mann-whitney non parametric student t-test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. 3D images of CTB labeled and transparized brains were reconstructed using IMARIS software.

2. Résultats complémentaires

En parallèle des expériences présentées dans le manuscrit d'article précédent, j'ai également obtenu quelques autres résultats. Ce sont soit des résultats préliminaires, soit définitifs mais dont le résultat nous amène vers d'autres voies qui ne faisaient pas l'objet de l'article. J'ai par exemple souhaité vérifier l'efficacité des shARN dans des cas de cellules surexprimant Plexine-A1 ou Sema6D. J'ai ensuite voulu savoir quel était l'effet, à l'inverse d'un knock-down, d'une surexpression rétinienne de Plexine-A1 et Sema6D. J'ai également regardé si dans les souris Plexine-A1$^{-/-}$ou Sema6D$^{-/-}$ adulte on retrouvait toujours les défauts de guidage au chiasma identifié durant le développement (Kuwajima *et al.*, 2012). Enfin, j'ai commencé à étudier dans quelles sous-populations de CGRs est exprimée la Sema6D. Je présente donc ces résultats afin de pouvoir les discuter et préciser les hypothèses et perspectives présentées ensuite dans la discussion.

a. Test in vitro de shARN.

Afin de démontrer l'importance de l'expression de Sema6D et de Plexine-A1 dans la rétine pour jouer leur rôle de ciblage précis du CGLd par les axones rétiniens, j'ai utilisé des plasmides codant pour un shARN contre l'une ou l'autre de ces protéines. J'ai souhaité tester leur efficacité *in vitro* dans des cellules COS pour avoir un ordre de grandeur de la diminution d'expression engendrée.

Les cellules COS n'exprimant pas naturellement ni Plexine-A1 ni Sema6D, j'ai utilisé une construction plasmidique permettant de surexprimer très fortement ces 2 protéines (pCIG). J'ai transfecté les cellules COS avec différents plasmides codant soit pour Sema6D, soit pour Plexine-A1 en ajoutant ou non des plasmides codant pour les différents shARN (**Figure 19, A**) puis j'ai révélé le taux d'expression de Sema6D ou de Plexine-A1 par Western-blot. Dans un premier temps, nous pouvons voir que les constructions de surexpression de Sema6D et Plexine-A1 sont bien effectives dans les COS car nous retrouvons des bandes correspondant à Plexine-A1 ou à Sema6D dans les cellules transfectées (**Figure 19, B, C**). Etonnamment, on remarque que la construction pCIG-Sema6D utilisée permet l'expression de 2 isoformes de tailles légèrement différentes de Sema6D, puisque 2 bandes ont été reconnues par l'anticorps anti-V5 révélant la Sema6D exogène. L'isoforme 2 ne semble pas sensible à la présence du shARN contre Sema6D, tandis que l'isoforme 1 l'est.

En effet, on observe une diminution d'expression de l'isoforme 1 Sema6D en présence de shARN contre sema6D de l'ordre de 60%. Ce shARN semble donc assez efficace. Le shARN scrambled de la séquence de Sema6D (contrôle) a tout de même un effet sur l'expression de Sema6D surexprimée (**Figure 19, B, D, E**). De façon similaire, le shARN contre Plexine-A1 induit une diminution de l'expression de Plexine-A1 exogène mais le shARN Plexine-A1 scramble semble lui aussi avoir un effet de diminution (**Figure 19, C, F**). Les résultats de cette expérience restent toutefois peu représentatifs des conditions physiologiques des cellules de la rétine. *In vivo* par exemple le shARN scramble contre Sema6D avait un effet très négligeable sur le phénotype observé dans le CGLd comparé à celui du shARN contre Sema6D (cf. article), alors que la différence est beaucoup moins marquée ici *in vitro*. Il s'avère que les constructions pCIG, de par leur promoteur, surexpriment très fortement les protéines qu'elles codent. Ainsi cela ne reflète en rien la quantité de Sema6D ou de Plexine-A1 présente dans les CGRs. Il se peut par exemple que le shARN scramble ait un léger effet de réduction de l'expression de certaines des protéines de la cellule de façon aléatoire, car celui-ci n'est pas spécifique. Il se pourrait de ce fait ici qu'il ait plus d'effet sur la protéine surexprimée que sur les autres protéines affectées de façon aléatoire car celle-ci est surreprésentée dans la cellule. Cet effet serait donc plus modéré dans les cellules rétiniennes. Enfin la technique de transfection pourrait avoir un effet différent sur les cellules et leur incorporation des différents plasmides comparé à l'électroporation.

Ces résultats nous permettent toutefois de remarquer un effet préférentiel du shARN de Sema6D sur l'expression de l'une de ces isoformes. Le shARN *in vivo* ayant un effet de knock-down pour une protéine impliquée dans le mécanisme de ciblage du CGLd, il se pourrait qu'une isoforme de Sema6D soit préférentiellement impliquée dans ce mécanisme. C'est donc une piste qui peut être explorée par la suite.

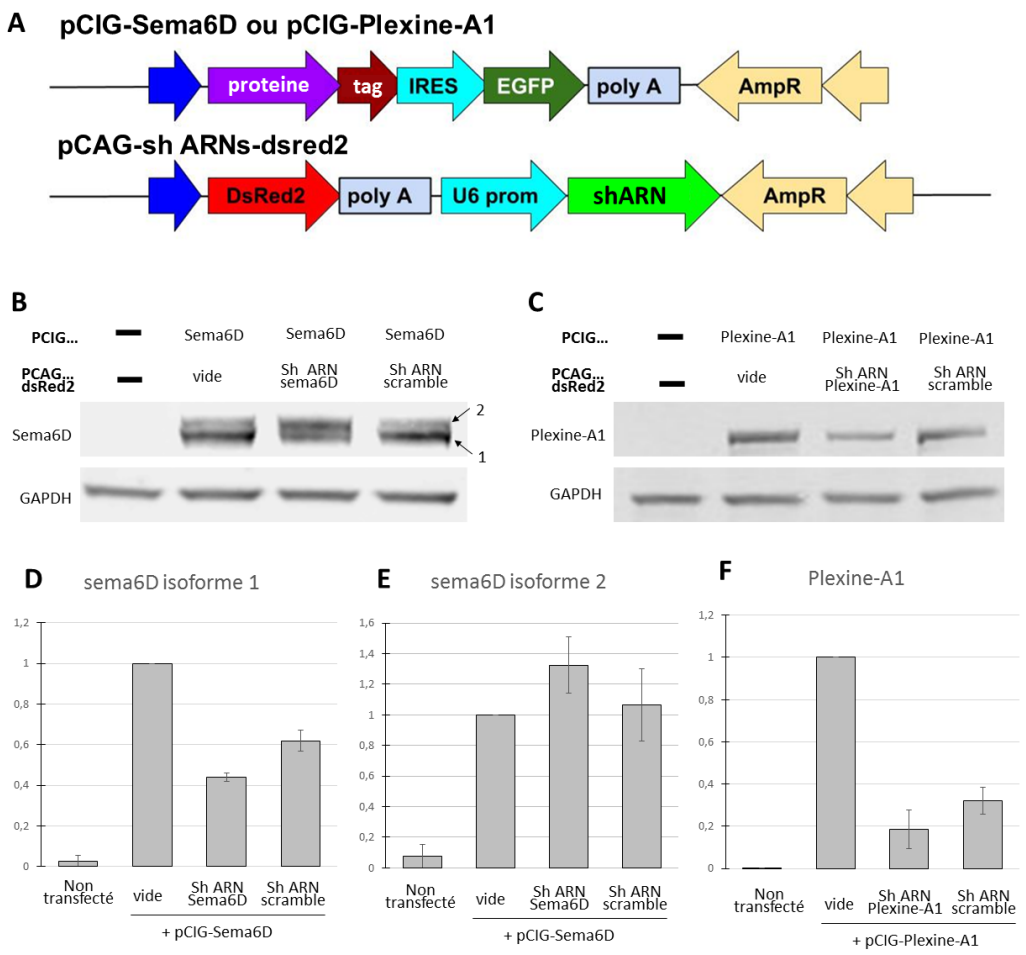


Figure 19 : Effet des shARN contre Plexine-A1 et Sema6D sur la surexpression de Sema6D et Plexine-A1 dans des cellules COS.

(A) Constructions des plasmides utilisés. (B-C) Western-Blot des lysats de cellules COS transfectées ou non 72h avant avec un plasmide (pCIG) surexprimant Sema6D (tag V5) ou Plexine-A1 (PlxA1) et un plasmide codant pour un shARN anti Sema6D ou anti Plexine-A1. (D-F) Quantification des différentes bandes correspondant au taux d'expression de Sema6D et Plexine-A1 dans les différentes conditions.

b. Effet de la surexpression rétinienne de Plexine-A1 et Sema6D dans le ciblage du CGLd.

J'ai voulu regarder quel serait l'effet d'une surexpression de Sema6D ou Plexine-A1 sur le ciblage des axones rétiniens. En effet, on pourrait s'attendre à observer un phénotype différent voire "opposé" de celui observé suite à la diminution de leur expression (dans les souris$^{-/-}$ ou celles electroporées avec des shARN). Pour répondre à cette question, j'ai donc électroporé dans la rétine d'embryons à E14,5 les constructions pCIG-Sema6D ou pCIG-Plexine-A1 qui surexpriment fortement ces protéines, comme vu précédemment (**Figure 19**

A). Malheureusement si ces constructions me permettaient de distinguer par leur fluorescence verte les cellules rétiniennes qui surexprimaient Sema6D ou Plexine-A1, les axones dans le cerveau étaient invisibles et ce même après un marquage immuo-histochimique. Aprés séquençage, il s'est avéré que la séquence codante pour la GFP dans ce vecteur était suivie d'un signal NLS d'adressage au noyau, ce qui explique ce problème de visibilité des axones. Pourtant il semblait bien y avoir des axones affectés car l'on pouvait observer des défauts de ciblage dans le CGLd (donnée non montrée). C'est pourquoi j'ai décidé de garder ces constructions car elles semblaient avoir un effet *in vivo* et les ai co-electroporées avec un plasmide simple codant fortement pour de la GFP dans tout le cystoplame afin de marquer les axones (pCAG-GFP). Cette co-électroporation a été effectuée avec un ratio molaire de 2 plasmides pCIG pour un plasmide CAG-GFP afin que presque tous les axones GFP-positifs soient aussi des axones surexprimant Plexine-A1 ou Sema6D.

Etonnamment, la surexpression de Plexine-A1 ou de Sema6D dans la rétine induit un phénotype similaire à celui observé chez les Knock-down de Sema6D ou Plexine-A1 dans la rétine. On aperçoit ainsi des patchs ectopiques controlatéraux dans le CGLd controlatéral à la rétine électroporée (**Figure 20 C-D).** De même, les axones innervant les régions ectopiques ne sont pas tous GFP positifs (**Figure 19 E-F**). Enfin, on remarque aussi dans le CGLd ipsilateral à la rétine electroporée, des projections ectopiques controlatérales, venant donc de la rétine non-électroporée (**Figure 20 I-J).** Si par contre on ne remarque pas de projections ectopiques ipsilatérales dans le CGLd controlatéral à la rétine éléctroporée, le phénotype est similaire en tous points à celui observé chez les souris électroporées dans la rétine avec les shARN contre Sema6D ou Plexine-A1 (**article)**. Ces résultats confirmeraient encore une fois un effet non-cellulaire autonome de Plexine-A1 et Sema6D dans le ciblage du CGLd par les axones rétiniens, mais suggèreraient également qu'un équilibre dans le taux d'expression de Sema6D et de Plexine-A1 serait nécessaire dans les CGRs pour ce rôle. En effet, une diminution ou une augmentation de l'expression de l'une des 2 protéines induisent pareillement des défauts de ciblage dans le CGLd. Ces résultats sont toutefois des résultats préliminaires car l'électroporation de plasmides contrôles (PCIG-vide et pCAG-GFP) n'a pas encore donné de résultats. Il semble néanmoins peu probable que de la GFP même surexprimée puisse avoir un effet aussi spécifique que celui observé à la fois chez les souris KO et les Knock-down, sachant que ce phénotype est très particulier et jamais observé auparavant malgré les nombreuses expériences de guidage entre la rétine et le CGLd. Ces résultats doivent donc être confirmés par la suite.

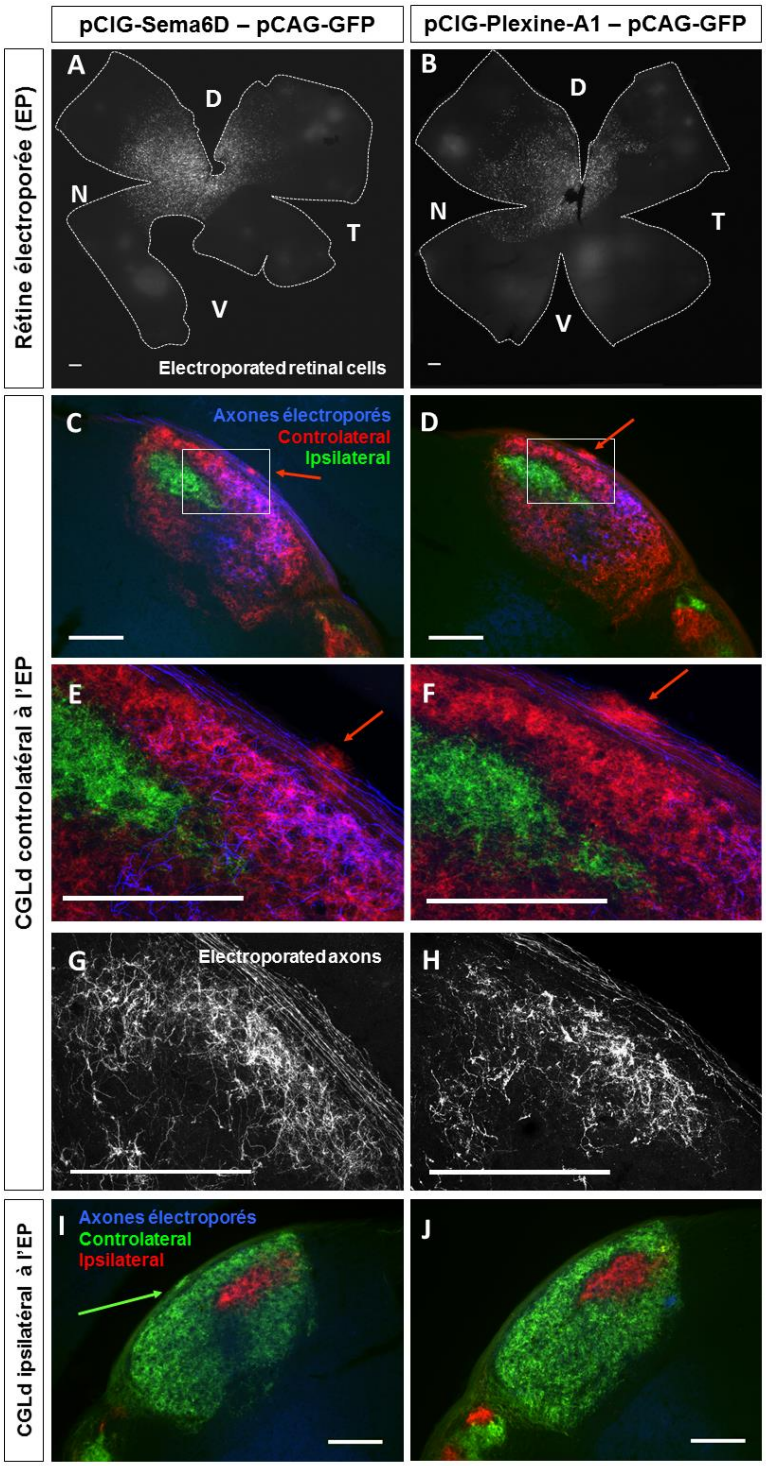


Figure 20 : Effet de la surexpression de Plexine-A1 et de Sema6D dans la rétine sur le ciblage du CGLd.

(A-B) Rétines entières (A-B) et CGLd (C-H) de souris sauvages après électroporation rétinienne in utero à E14.5 pour surexprimer Plexine-A1 ou Sema6D. (C-F, I-J) Projections oeil-spécifiques dans les CGLds. Les projections ipsilatérales et controlatérales ont été marquées par injection oculaire de sous-unité B de la toxine cholérique couplée à des fluorophores. Les axones électroporés sont en bleu (marqués par la GFP). (C-F) CGLd controlatéral à la rétine éléctroporée. Les projections ipsilatérales sont marquées en vert et controlatérales en rouge. Les souris électroporées présentent des projections ectopiques (flèches) controlatérales de l'autre côté du tractus optique. Une grande partie des projections ectopiques ne sont pas marquées à la GFP, confirmant un effet non-cellulaire autonome. (G-H) Axones rétiniens électroporés innervant le CGLd controlatéral à la rétine électroporée. (I-J) Projections œil-spécifiques dans le CGLd ipsilatéral à la rétine éléctroporée. Les projections ipsilatérales sont marquées en rouge et controlatérales en vert. Les souris électroporées présentent des projections ectopiques (flèches) controlatérales de l'autre côté du tractus optique et celles-ci proviennent de l'œil non-électroporé, confirmant l'effet non-cellulaire autonome.

c. Etude du rôle de Plexine-A1 et Sema6D dans le nombre de CGRs ipsilatérales

Plexine-A1 et Sema6D ont récemment été impliquées dans le mécanisme de croisement du chiasma optique par les CGRs controlatérales (Kuwajima *et al.*, 2012). Or, nous avons montré que Sema6D et Plexine-A1 jouaient un rôle important dans le ciblage du CGLd et que seul le défaut de guidage ne pouvait expliquer le phénotype particulier observé chez les souris KO. Néanmoins, nous avons voulu savoir si les projections ipsilatérales ectopiques dans le CGLd pouvaient provenir de cellules ipsilatérales plus nombreuses dans la rétine ou également ectopiques dans la rétine. Pour répondre à cette question, j'ai réalisé une injection stéréotaxique de traceur rétrograde (Fluorogold) dans le CGLd droit de souris Plexine-A1$^{+/-}$, Sema6D$^{+/-}$ (comme contrôle) et Plexine-A1$^{-/-}$ ou Sema6D$^{-/-}$ afin de marquer les CGRs projetant ipsilatéralement dans la rétine droite. Le nombre et la localisation des CGRs ipsilatérales ont ensuite été quantifiés ***(*Figure 21*).***

Le nombre total de CGRs ipsilatérales dans la rétine est similaire entre les souris Plexine-A1$^{+/-}$et Plexine-A1$^{-/-}$, avec la majorité des CGRs marquées dans le quadrant ventrotemporal, où sont normalement regroupées les cellules ipsilatérales (Dräger & Olsen, 1980). Cependant, nous observons 3 fois plus de CGRs marquées "ectopiques" hors du quadrant ventrotemporal dans les souris Plexine-A1$^{-/-}$ comparées aux Plexine-A1$^{+/-}$ **Figure 20,A-B**). Cela indique donc qu'en absence de Plexine-A1, apparaissent des CGRs localisées en dehors de la rétine ventrotemporale, qui ne croisent pas le chiasma optique et projettent ipsilatéralement dans le CGLd. Ces résultats nous indiquent également que ces CGRs hors-VT projetant ipsilatéralement sont conservées jusqu'à l'âge adulte. Ce sont soit (1) des CGRs ayant effectués une erreur de guidage au chiasma comme montré aux âges plus précoces par Kuwajima et al. 2012, soit (2) des CGRs dites early-born (Insausti *et al.*, 1984; Dräger, 1985; Colello & Guillery, 1990; Guillery *et al.*, 1995; Marcus & Mason, 1995; Soares & Mason, 2015) qui seraient gardées jusqu'à l'âge adulte au lieu de disparaître.

Cette augmentation n'est par contre pas visible entre les souris Sema6D$^{+/-}$ et Sema6D$^{-/-}$ **Figure 20,C-D**). Cela suggère deux possibilités : (1) en l'absence de Sema6D, un mécanisme de compensation existerait entre les âges embryonnaires et l'âge adulte concernant les erreurs de guidage au chiasma optique (Kuwajima *et al.*, 2012) ou (2) le mécanisme de survie ou de mort cellulaire des *early-born* CGRs dans lequel interviendrait Plexine-A1, ne dépendrait pas, du moins exclusivement, du ligand Sema6D. Etant donné que le rôle de Plexine-A1 dans le

ciblage du CGLd par les axones rétiniens dépend de son interaction avec Sema6D, ce dernier résultat confirme encore une fois que les défauts de ciblage ne sont pas une conséquence d'un défaut de guidage au chiasma optique mais bien le résultat d'un mécanisme additionnel impliquant Sema6D et Plexine-A1.

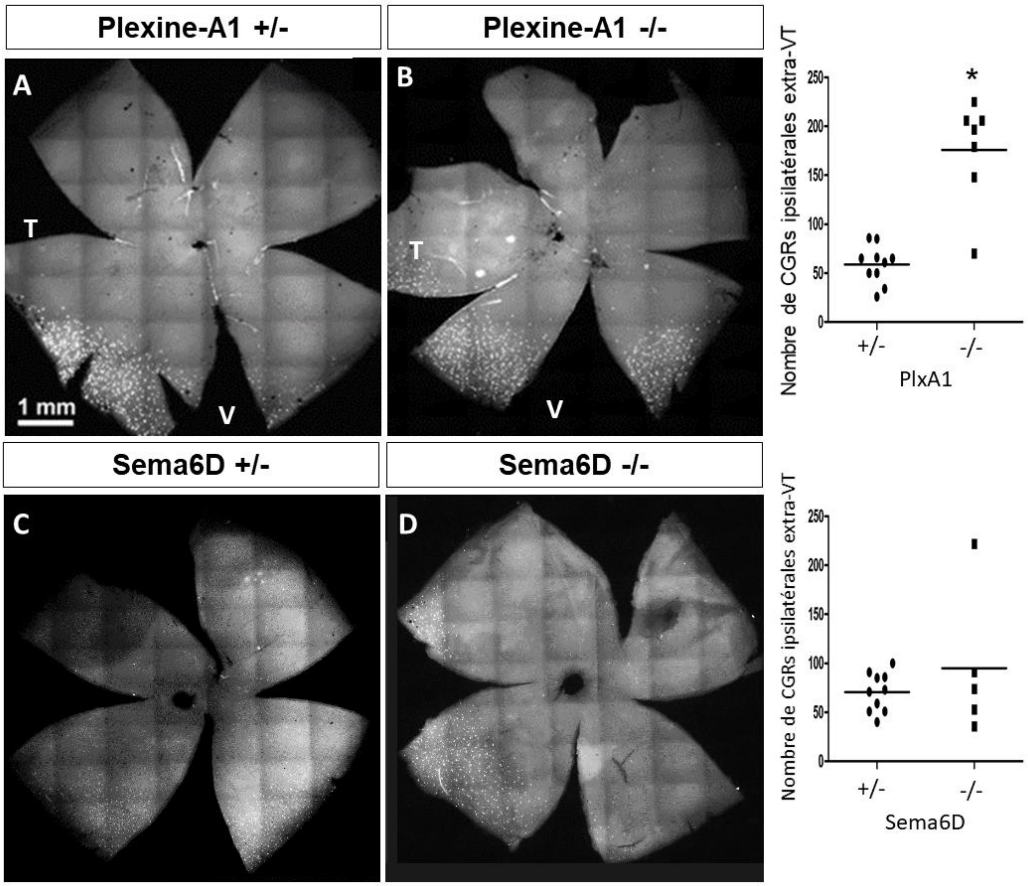


Figure 21: Effet de Plexine-A1 et Sema6D sur le nombre de CGRs projetant ipsilatéralement.

Rétines entières « en whole-mount » de souris adultes Plexine-A1$^{+/-}$, Plexine-A1$^{-/-}$, Sema6D$^{+/-}$ et Sema6D$^{-/-}$. Les CGRs projetant ipsilatéralement ont été marquées par une injection stéréotaxique de Fluorogold dans le CGLd ipsilatéral puis le marquage a été amplifié par immunohistochimie. Quantification des CGRs ipsilatérales localisées hors du quadrant ventrotemporal (VT) de la rétine. Chez les souris Plexine-A1$^{-/-}$, le nombre de CGRs ipsilatérales en dehors du quadrant ventrotemporal de la rétine est augmenté par rapport aux souris Plexine-A1$^{+/-}$.

d. Etude de la lignée de souris transgéniques Sema6D-GFP et sous-populations rétiniennes

Nous avons montré précédemment **(article)** que la Sema6D n'est pas exprimée dans toutes des CGRs mais seulement dans une sous-population. Le rôle de Sema6D dans le ciblage du CGLd étant très précis et ne touchant qu'une petite partie des projections, il serait intéressant de pouvoir suivre spécifiquement les axones des cellules exprimant la Sema6D

afin de savoir si ceux-ci en l'absence de Sema6D sont ceux allant innerver les projections ectopiques dans le CGLd des souris Sema6D $^{-/-}$. Nous avons donc voulu déterminer dans un premier temps si la sous-population de CGRs exprimant Sema6D correspond à une sous-population classifiée de CGRs, pouvant être marquée spécifiquement. Ne disposant pas d'anticorps parfaitement fonctionnel en immunohistochimie pour Sema6D, et l'hybridation *in situ* contre Sema6D étant parfois incompatible avec certains marquages immunohistochimiques de sous-populations rétiniennes, nous avons récemment importé une ligne transgénique Gensat Sema6D-GFP. Ces souris sont censées exprimer la GFP dans toutes les cellules exprimant de la Sema6D. J'ai ainsi pu tester le marquage simultané dans la rétine de cellules Sema6D par cette lignée et de sous-populations connues de CGRs afin d'identifier d'éventuelles colocalisations.

Pour cibler dans un premier temps de grandes sous-populations de CGRs, nous avons décidé de marquer les ON-OFF DS-CGRs par un marquage anti-CART, les alpha-CGRs par un anti-SMI-32 et les ipCGRs par un anti-mélanopsine. A cela nous avons ajouté le marquage de 3 facteurs de transcription (Islet2, Tbr2 et Satb2) qui marquent distinctement 3 populations de CGRs (Sweeney *et al.*, 2017). Aucune de ces sous-populations ne correspond entièrement à celle exprimant la GFP. Etonnamment, on retrouve quelques cellules marquées à la GFP parmi celles marquées pour Islet2, Tbr2, CART et SMI32. Aucune CGRs marquée pour Satb2 ou la mélanopsine ne semble par contre exprimer de GFP.

Si les immuno-marquages contre Satb2, et Islet2 doivent être améliorés prochainement, ces premiers résultats indiqueraient que les CGRs exprimant Sema6D appartiendraient à différents sous-types dont les ON-OFF DS-CGRs et les CGRs alpha (**Figure 22**). L'expression de Sema6D ne serait ainsi peut-être pas liée à une identité cellulaire mais à d'autres facteurs.

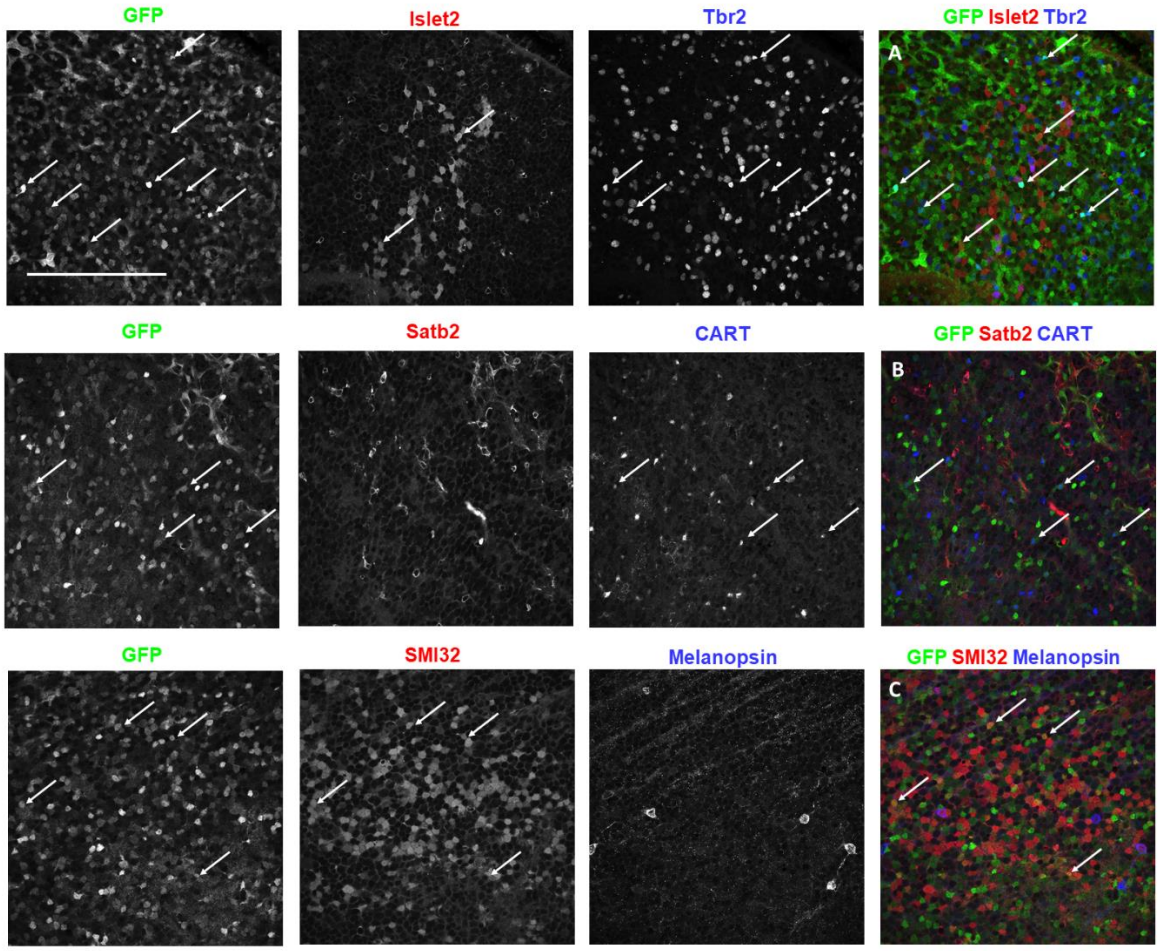


Figure 22 : Identification de CGRs exprimant la Sema6D chez souris Tg-Sema6D-GFP.

Visualisation de sous-types de CGRs par immunomarquage dans des rétines entières à P5 de souris Tg-Sema6D-GFP. Islet 2, Tbr2 et Satb2 sont des marqueurs de populations distinctes de CGRs (Sweeney *et al.*, 2017). *CART est un marqueur des ON-OFF-DS CGRs, la mélanopsine est un marqueur des ipCGRs et SMI32 est plus fortement exprimée dans les CGRs alpha. La Sema6D (révélée par la GFP) ne semble pas exprimée dans un de ces sous-types en particulier. Elle semble être exprimée par certaines CGRs positives pour Islet2, Tbr2, CART et SMI32 (flèches). La barre d'échelle représente 200µm.*

Ces résultats sont toutefois des résultats préliminaires et ce, également car la souris Sema6D GFP n'a pas pu être encore parfaitement caractérisée. Il est donc prévu de faire des hybridations *in situ* de Sema6D sur les coupes de rétine de ces souris couplée à un marquage anti-GFP afin de vérifier que la GFP s'exprime bien spécifiquement dans les cellules rétiniennes exprimant la Sema6D.

e. Matériel et Méthodes complémentaires

i. Souris Tg-Sema6D-GFP

La lignée de souris Tg-Sema6D-GFP a été ressuscitée à partir de la lignée Tg(Sema6d-EGFP)EW185Gsat (projet GENSAT, Rockefeller University). Pour le génotypage sur les lysats de queues de souris (cf article) les amorces suivantes ont été utilisées pour la réaction de PCR :

Lignée	Amorces PCR		Taille de la bande
Tg-Sema6D-GFP	Sens Sema6d (14088) F1	5'-CCACAGCGTAAAGGTCTTTCCATAA-3'	Tg-GFP : 360 pb
	Anti-sens GFP R2	5'-TAGCGGCTGAAGCACTGCA-3'	

ii. Marquage rétrograde des projections retinogéniculées

Les souris adultes ont été anesthésiées et perfusées tel que décrit dans l'article. Après anesthésie les souris adultes ont été fixées sur un appareil stéréotaxique afin de guider l'injection dans le CGLd droit en utilisant les coordonnées suivantes : 2,5mm en caudal à partir du bregma, 2,2 mm en latéral à partir de la ligne médiane et 2,5 mm en profondeur à partir de la surface du cerveau. A cet endroit précis, 150nL de Fluorogold 2,5% (Molecular probes) dilué dans une solution saline à 0,9% ont été injectés à l'aide d'un nanoinjecteur (Narishige) et d'un capillaire (Drummond). Après l'injection, le capillaire a été laissé en place 5 minutes avant son retrait pour minimiser les fuites de marqueur. La peau de la tête a ensuite été refermée avec de la colle chirurgicale (Vetbond) et 16mg/kg de Flunixine ont été injectés à la souris avant son réveil.

iii. Plasmides pour la surexpression de Sema6D et Plexine-A1

Les plasmides ont été obtenus par clonage en utilisant les plasmides et enzymes de restrictions suivants.

Plasmides finaux	Plasmides originaux	Origine	Digestion par
pCIG-Sema6D	pCIG-IRES-EGFP	(Megason & McMahon, 2002)	EcoRI et SmaI
	pcDNA3.1 Sema6D-V5	(Kuwajima *et al.*, 2012)	EcoRI et Pme1
pCIG Plexine-A1	pCIG-IRES-EGFP	(Megason & McMahon, 2002)	EcoRI et SmaI
	pBK-CMV-Plexin-A1-vsv	(Rohm *et al.*, 2000)	EcoRI et XbaI

iv. Tests de shARN par transfection de COS et Western-blot

Les cellules COS ont été transfectées à l'aide de Gene Juice transfection reagent avec des combinaisons de pCIG-Sema6D ou pCIG-Plexine-A1 pour l'expression de ces protéines et de pCAG dsred2, pCAG shRNA – Sema6D, Sema6D scramble, Plexine-A1 ou Plexine-A1 scramble pour tester leur effet sur l'expression de celles-ci. Après 72h de culture, les cellules COS ont été lysées avec du tampon RIPA (Radio-immunoprecipitationassay) (Tris HCl 50mM ph=7,4, NaCl 150mM, NP40 0.1%, acide Deoxycholique (DOC) 0,5%, EDTA 5mM) additionné d'anti-protéases (Roche) durant 2 sonications de 40sec. Après purification des protéines par centrifugation, la concentration a été mesurée à l'aide d'un kit Micro BCA Protein Assay (pierce) afin de déposer sur le gel d'électrophorèse SDS-PAGE la même quantité totale de protéines pour chaque échantillon. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel NuPAGE™ 4-12% puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les Membranes ont été bloquées pendant 45min à température ambiante dans du TBS (10mM Trizma base, 150mM NaCl, pH ajusté à 7,6) additionné de 0,1% de tween, 5% de lait en poudre et 0,01% d'azide sodium. L'incubation avec les anticorps primaires a été effectuée à 4°C durant une nuit, puis celle avec les anticorps secondaires durant 2h à température ambiante, en utilisant les anticorps suivants. Entre ces incubations, les membranes ont été intensivement lavées dans du TBS, 0,1% tween. Les bandes de protéines ont ensuite été visualisées à l'aide d'un scanner infrarouge (Odyssey).

Anticorps primaires				
Anti-…	espèce	Mono/polyclonal	Dilution	origine
GAPDH	lapin	polyclonal	1/1000ème	Bethyl
V5	souris	monoclonal	1/2000ème	Life
Plexine-A1	chèvre	polyclonal	1/1000ème	R&D system
Anticorps secondaires				
Anti-…	espèce	fluorophore	Dilution	origine
Anti-lapin	âne	800	1/10 000ème	Li-cor
Anti-souris	chèvre	800	1/10 000ème	Advansta
Anti-chèvre	âne	700	1/10 000ème	Li-cor
Anti-lapin	chèvre	700	1/10 000ème	Advansta

v. Electroporation de rétines *in utéro* pour la surexpression de Plexine-A1 et Sema6D

L'électroporation *in utéro* de rétines de souris sauvages a été effectuée tel que décrit dans l'article. Dans l'œil gauche a été injecté un mix de pCAG-GFP (0,6µg/µL) avec soit du pCIG-vide (2µg/µL), du pCIG-Plexine-A1 (2µg/µL) ou du pCIG-Sema6D de manière à obtenir un ratio molaire identique de 1.5 mole of pCIG for 1 mole of pCAG.

vi. Immunohistochimie:

Cerveaux et rétines pour les électroporations et marquages au Fluorogold. (Protocole de l'article)				
Anticorps primaires				
Anti-…	espèce	Mono/polyclonal	Dilution	origine
Fluorogold	lapin	polyclonal	1/4000	Merckmillipore
GFP	poulet	polyclonal	1/1000	Aves Labs
Anticorps secondaires				
Anti…	espèce	fluorophore	Dilution	origine
Anti-lapin	âne	AlexaFluor 488	1/2000	Jackson
Anti-poulet	âne	AlexaFluor 488	1/2000	Jackson

Pour le marquage des sous-populations de CGRs dans les rétines de souris Tg-Sema6D-GFP, les rétines ont été bloquées dans du PBS, 0,4% Triton, 5% Normal Donkey sérum (NDS), 0,01% azide sodium durant une nuit à température ambiante. Les incubations avec les anticorps ont été effectuées dans du PBS, 0,4% Triton, 5% NDS, 20% DMSO à température ambiante durant 3 jours pour les anticorps primaires et 2 jours pour les anticorps secondaires. Entre ces incubations, les rétines ont été intensivement lavées 4 fois une nuit dans du PBS, 0,4% triton. Après l'incubation avec les anticorps secondaires, elles ont été lavées 4 fois 20 min dans du PBS, Tween 0,1%.

Rétines entières des souris Tg Sema6D GFP				
Anticorps primaires				
Anti-…	espèce	Mono/polyclonal	Dilution	origine
GFP	poulet	polyclonal	1/1000	Aves Labs
Tbr2	lapin	polyclonal	1/1000	Abcam AB23345
Islet2	souris	monoclonal	1/50	DSHB 51.4H9-s
Satb2	souris	monoclonal	1/1000	Abcam 51502
CART	lapin	polyclonal	1/1000	Phoenix
SMI32	souris	monoclonal	1/1000	Sternberger
Melanopsin	lapin	polyclonal	1/1000	(AB-N38) ATS
Anticorps secondaires				
Anti-…	espèce	fluorophore	Dilution	origine
Anti-lapin	âne	AlexaFluor 647	1/500	Jackson
Anti-poulet	âne	AlexaFluor 488	1/500	Jackson
Anti-souris	âne	Cy3	1/500	Jackson

vii. Imagerie

Les rétines entières électroporées ou marquées au Fluorogold ont été imagées à l'aide d'un microscope à fluorescence DM-6000 et d'un objectif 10X puis l'image complète de la rétine entière a été reconstruite à l'aide du logiciel Metamorph. Les rétines entières de souris Tg-Sema6D GFP ont été imagées avec un microscope confocal Leica SP5 et un objectif 40X. Les cerveaux électroporés ont été imagés avec un microscope à fluorescence DM-6000 à l'aide d'un objectif 10X. Les images en plus haute résolution des patchs ectopiques et des axones electroporés ont été obtenues par projection en z des images prises au microscope confocal Leica SP5 et un objectif 40X.

viii. Analyses

Les CGRs ipsilatérales, visualisées par un marquage rétrograde avec du Fluorogold, ont été comptées manuellement à l'aide du logiciel ImageJ. La barre représente la moyenne et chaque valeur individuelle est représentée par un point. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism, en utilisant le test de Student non paramétrique Mann-Whitney. Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p < 0.05$.

CONCLUSION / DISCUSSION

Durant ma thèse j'ai caractérisé un nouveau type de défaut de ciblage via l'étude des souris déficientes en Sema6D et Plexine-A1. Je discuterai dans un premier temps des caractéristiques intéressantes de ce phénotype et des limitations techniques qui sont liées à son étude. Cette caractérisation m'a permis de mettre en évidence un nouveau rôle de ciblage pour le couple Plexine-A1 et Sema6D. Ce rôle comporte deux spécificités intéressantes : des effets dose-dépendants et non-cellulaires autonomes, qui soulèvent de nombreuses questions quant aux modes de signalisation qui sont mis en jeu. Je présenterai ici quelques hypothèses probables de mécanismes pouvant expliquer ces différents effets et discuterai des expérimentations que nous pourrions mener pour les confirmer ou les infirmer. Concernant le développement général des projections rétiniennes, j'aborderai l'intérêt d'interactions entre axones durant leur développement ainsi que le possible rôle de Sema6D et Plexine-A1 dans la formation de branches collatérales et le choix des cibles. Enfin, étant donné l'expression limitée de Sema6D à certaines CGRs, je discuterai du rôle de ces CGRs dans le guidage des axones rétiniens.

1. Le CGLd des souris Sema6D -/- et Plexine-A1 -/- : modèle d'étude des mécanismes de ciblage axonal ?

a. Un nouveau type de phénotype.

Nos résultats ont révélé des défauts de projections rétiniennes dans le CGLd, via l'analyse de la carte œil-spécifique chez les souris Sema6D$^{-/-}$ et Plexine-A1$^{-/-}$. En effet, chez ces souris, nous observons des projections rétiniennes ectopiques de l'autre côté du tractus optique, ce que nous n'observons pas chez les souris sauvages. Ce phénotype n'a jamais été observé jusqu'à présent et ce malgré les différentes études sur la mise en place des connexions rétinothalamiques. En effet, les défauts jusqu'ici décrits dans le ciblage des axones rétiniens étaient par exemple des défauts de carte rétinotopique comme des décalages de zones de terminaison (ZT) (Feldheim *et al.*, 2004; Suetterlin & Drescher, 2014), la formation de ZT supplémentaires (Suetterlin & Drescher, 2014), ou des défauts de ségrégation et de raffinement des connexions (Rossi *et al.*, 2001; Muir-Robinson *et al.*, 2002; Pfeiffenberger *et al.*, 2006; Rebsam *et al.*, 2009). Notre phénotype à l'inverse ne semble présenter aucun défaut majeur que ce soit dans la carte rétinotopique (vérifié par Alexandra Rebsam chez les souris Plexine-A1$^{-/-}$, données non montrées) ou concernant la ségrégation des territoires œil-spécifiques (vérifié par Cédric Francius, données non montrées). Au sein du CGLd, les

connexions ne semblent pas perturbées et seules des projections ectopiques à l'extérieur de celui-ci de l'autre côté du tractus optique apparaissent. De plus, nous avons observé que ces défauts apparaissent dès P3, indiquant qu'ils ne sont pas dus à un défaut de raffinement des projections rétiniennes (qui intervient entre P3 et P15) mais bien à un défaut de ciblage apparaissant dès l'innervation des cibles. Ce phénotype pourrait donc être un très bon outil de visualisation de défauts fins de ciblage axonal et en particulier de mécanismes précis du ciblage tels que l'organisation des axones en un faisceau guidé jusqu'aux cibles, le déclenchement de l'arborisation de l'axone et l'établissement des connexions.

b. Un mécanisme indépendant de celui de guidage au chiasma optique

Le fait que Plexine-A1 et Sema6D soient impliquées dans le guidage des axones rétiniens au niveau du chiasma optique et donc en amont de leur arrivée au CGLd peut laisser penser que le défaut observé dans le CGLd serait une conséquence de celui de guidage au chiasma. Au chiasma optique, Plexine-A1 et Sema6D interagissent également avec Nr-CAM dans un complexe tripartite afin de permettre le croisement du chiasma par les axones controlatéraux (Kuwajima *et al.*, 2012). En effet, si des axones censés projeter du côté controlatéral ne croisent plus le chiasma en absence de Plexine-A1 ou Sema6D, ils pourraient ne pas trouver leur place dans le CGLd ipsilatéral et se retrouver repoussés en périphérie du CGLd où ils innerveraient cette région ectopique. Néanmoins, même si ce défaut pourrait avoir un lien avec celui observé dans le CGLd, cela ne suffit pas à expliquer pourquoi ces CGRs iraient innerver une région de l'autre côté du tractus optique.

Nous avons tout de même souhaité comparer le nombre de CGRs ipsilatérales chez les souris Plexine-A1$^{-/-}$ et Plexine-A1$^{+/-}$. J'ai ainsi pu mettre en évidence une augmentation du nombre de CGRs ipsilatérales en dehors du quadrant VT chez les souris Plexine-A1$^{-/-}$ comparées aux Plexine-A1$^{+/-}$. Ce résultat peut être expliqué par différentes hypothèses. D'une part, il peut signifier qu'il existe bien un défaut de guidage des CGRs controlatérales au niveau du chiasma optique tel qu'il a été décrit précédemment (Kuwajima *et al.*, 2012) chez les Plexine-A1$^{-/-}$ à P0. S'il s'agit de CGRs ectopiques mal guidées au chiasma optique, nous avons montré qu'elles ne sont apparemment pas éliminées en post-natal. D'autre part, il se pourrait également que ces CGRs ipsilatérales ectopiques soient dues à un défaut de mort ou de migration cellulaire développementale. En effet, il existe à un stade très précoce du développement des CGRs ipsilatérales localisées dans la rétine dorso-centrale qui disparaissent au cours du développement soit parce qu'elles meurent, soit parce qu'elles

migrent vers le quadrant VT (Insausti *et al.*, 1984; Dräger, 1985; Colello & Guillery, 1990; Guillery *et al.*, 1995; Marcus & Mason, 1995; Soares & Mason, 2015). Le fait que ce défaut ne soit pas retrouvé chez les souris Sema6D$^{-/-}$ favoriserait plutôt cette dernière hypothèse car le défaut de guidage au chiasma décrit à P0 implique une interaction entre Sema6D et Plexine-A1. A moins que ce soit bien un défaut de guidage au chiasma mais que le défaut observé à P0 chez les souris Sema6D$^{-/-}$ soit compensé ou réparé à l'âge adulte par un autre mécanisme faisant par contre toujours intervenir Plexine-A1 (expliquant pourquoi celui-ci ne peut avoir lieu dans les souris Plexine-A1$^{-/-}$). Dans les deux cas, étant donné que le phénotype dans le CGLd est présent à la fois chez les souris Plexine-A1$^{-/-}$ et Sema6D$^{-/-}$, cela indique que ces défauts de ciblage au CGLd sont distincts de ceux de guidage au chiasma optique en amont. Cela est également confirmé par le fait que les souris Nr-CAM$^{-/-}$ ne présentent pas ce phénotype de patches ectopiques dans le CGLd et que les souris Nr-CAM$^{-/-}$ Plexine-A1$^{-/-}$ ne présentent pas de phénotype plus fort que les souris seulement Plexine-A1$^{-/-}$ (observé par Alexandra Rebsam, données non montrées), alors qu'au chiasma optique Nr-CAM, Plexine-A1 et Sema6D interagissent ensemble pour le guidage des axones rétiniens controlatéraux (Kuwajima *et al.*, 2012). De plus, le fait que le rôle de Sema6D dans le ciblage du CGLd soit rétino-dépendant confirmerait que le mécanisme de ciblage de Sema6D est différent de celui de guidage au chiasma optique décrit auparavant (Kuwajima *et al.*, 2012). En effet, dans l'étude précédente, il a été montré que les CGRs à E17 n'expriment pas encore la Sema6D. Ils ont également montré que le guidage au chiasma des CGRs controlatérales nécessite qu'elles expriment Plexine-A1 et que les cellules gliales au niveau du chiasma expriment Sema6D. Ainsi toutes ces différences prouvent qu'il existe donc bien un rôle de « ciblage » proprement dit, après le chiasma optique, de Plexine-A1 et Sema6D.

c. Inconvénients et avantages liés à l'étude d'un tel phénotype

Si un tel phénotype est particulièrement intéressant car permettant de visualiser un mécanisme de ciblage très précis et non décrit jusqu'à présent, cela le rend également difficile à étudier car il est extrêmement spécifique et concerne vraisemblablement une faible proportion d'axones. En effet, pour pouvoir étudier les mécanismes à l'échelle cellulaire et moléculaire provoquant un tel défaut de guidage, il est souvent plus simple d'expérimenter *in vitro* sur les axones rétiniens. Des cultures d'explants rétiniens par exemple ou co-cultures avec d'autres tissus permettent de tester sur les axones l'effet de la présence de certaines cellules, ou protéines de guidage sur les axones. On peut ainsi évaluer si ces facteurs sont

plutôt attractifs ou répulsifs, fasciculants ou défasciculants, promoteurs ou inhibiteurs de croissance pour les axones rétiniens sortant de l'explant. De même, l'identification d'un comportement cellulaire qui pourrait être lié au phénotype observé *in vivo* permettrait de décrypter plus facilement les voies de signalisation cellulaires impliquées dans ces axones. Dans notre cas, seul ce phénotype précis *in vivo* reflète ce mécanisme de ciblage spécifique impliquant Sema6D et Plexine-A1.

De plus, seul un nombre succinct d'axones est concerné par ce mécanisme et innerve en l'absence de Sema6D ou Plexine-A1 des régions ectopiques dans le CGLd. Les effets que l'on pourrait observer sur les axones rétiniens provenant de souris Sema6D$^{-/-}$ ou Plexine-A1$^{-/-}$ par exemple seraient « dilués » parmi tous les autres axones non affectés. Il faudrait pouvoir marquer spécifiquement les axones qui projettent dans ces régions ectopiques. Un marquage au préalable rétrograde de ces patchs n'est pas envisageable car pour observer des défauts de développement des axones, ils doivent être mis en culture à des âges embryonnaires (environ E14-E17) avant les étapes d'innervation. Il est également techniquement impossible de faire par exemple une injection de marqueur rétrograde chez l'adulte de ces régions ectopiques exclusivement, même par stéréotaxie, étant donné la taille restreinte de ces patches et leur proximité avec le tractus optique (qui marquerait toutes les CGRs en rétrograde).

Il est donc nécessaire de distinguer ces CGRs projetant dans les régions ectopiques par d'autres marqueurs cellulaires tels que des marqueurs d'identité cellulaire ou facteurs de transcription exprimés spécifiquement par ces cellules. Une première piste est d'identifier quelle sous-population de CGRs exprime Sema6D et si celles-ci sont les CGRs innervant ces régions ectopiques, ce que j'ai commencé à étudier grâce aux souris Tg-Sema6D-GFP. L'identification de ces cellules est primordiale pour l'étude plus approfondie de ce mécanisme même *in vivo* car cela nous permettrait d'attribuer à Sema6D et Plexine-A1 les axones dans lesquelles elles agissent et de préciser les mécanismes de signalisation impliqués dans ces défauts de ciblage, en affectant spécifiquement dans ces CGRs l'expression de Sema6D ou Plexine-A1.

Ce phénotype visible jusqu'à l'âge adulte présente toutefois un avantage intéressant particulièrement dans l'étude du neurodéveloppement, compte tenu de la redondance dans l'utilisation de mêmes protéines à diverses étapes du développement. En effet, certains mécanismes développementaux sont difficilement visualisables à cause de la présence de mécanismes compensatoires, sachant que les Sémaphorines impliquées dans de nombreux

mécanismes développementaux y sont souvent sujettes. Par exemple, les souris Sema6A présentent des défauts de projections thalamocorticales à E16,6 et P0 mais ces défauts sont partiellement corrigés à P4 puis complétement compensés chez les mutants adultes (Leighton *et al.*, 2001; Little *et al.*, 2009). Les axones mal guidés sont apparemment capables de trouver leur voie jusqu'au cortex visuel via des mécanismes alternatifs durant les âges postnataux et rétablissent ainsi une architecture normale des connexions thalamocorticales (Little *et al.*, 2009). Notre phénotype, lui, ne semble pas sujet à de tels mécanismes compensatoires, facilitant ainsi son étude jusqu'à l'âge adulte, âge auquel il est particulièrement bien identifiable en regardant la carte œil-spécifique.

2. Lieux d'action et exclusivités dans le couple Plexine-A1 et Sema6D.

Par l'étude des souris Sema6D$^{+/-}$ Plexine-A1$^{+/-}$ double hétérozygotes, comparées aux souris KO ou simples hétérozygotes, nous avons pu démontrer que Plexine-A1 et Sema6D interagissent pour jouer leur rôle dans ce mécanisme de ciblage du CGLd par les axones rétiniens. S'il ne semble pas y avoir de mécanismes alternatifs pouvant compenser ces défauts durant le développement des souris déficientes en Sema6D ou Plexine-A1, une interaction exclusive n'a cependant pas été démontrée. Nous savons en effet que Plexine-A1 et Sema6D interagissent dans ce mécanisme mais d'autres molécules pourraient également intervenir pendant cette communication entre Plexine-A1 et Sema6D. De plus, la liaison directe entre Sema6D et Plexine-A1 dans ce mécanisme n'ayant pas encore été prouvée, l'interaction entre elles pourraient également être indirecte via un médiateur ou un corécepteur. Cependant, au vu des mécanismes connus d'interaction entre Plexines et Sémaphorines ainsi que des corécepteurs connus de Sema6D ou Plexine-A1 cette hypothèse semble très peu probable. Néanmoins, pour prouver une liaison directe entre les 2 protéines membranaires dans ce mécanisme il faudrait par exemple muter le domaine Sema de la Sema6D au niveau de son site de liaison à la Plexine-A1 et regarder dans des souris comportant cette mutation si le phénotype dans le CGLd est comparable aux souris KO. La possibilité de complexes protéiques autour d'une liaison directe entre Plexine-A1 et Sema6D reste elle plus envisageable. Il serait intéressant de regarder les projections rétiniennes dans le CGLd par un traçage à la CTB chez des souris déficientes par exemple aux Neuropilines.

Concernant la spécificité de Sémaphorines et Plexines impliquées dans ce mécanisme, il s'avère que Sema6C ne semble pas intervenir dans ces mécanismes de ciblage, alors que

c'est l'autre Sémaphorine 6 connue pour interagir avec Plexine-A1 (Burgaya *et al.*, 2006; Svensson *et al.*, 2008). En effet, ces défauts de ciblage visualisés par ce phénotype présentant des projections ectopiques de l'autre côté du tractus optique, n'est pas observé chez les souris Sema6C$^{-/-}$. De même le phénotype observé chez les souris double KO Sema6D$^{-/-}$;Sema6C$^{-/-}$ n'est pas plus important que celui observé chez les souris Sema6D$^{-/-}$ (communication personnelle, par Lu Sun et Alex Kolodkin). Si ce phénotype semble donc être très spécifique de Plexine-A1 et Sema6D et pour lequel aucun mécanisme compensatoire ne semble exister, il n'est pas exclu que ce mécanisme implique d'autres Sémaphorines ou Plexines. Elles pourraient servir de régulateur de l'interaction Sema6D / Plexine-A1 ou leur signalisation être elle-même régulée par celle entre Plexine-A1 et Sema6D. Il serait par exemple intéressant de regarder si une Sémaphorine 3 par exemple serait impliquée. Elle pourrait ainsi constituer un chimio-attracteur ou chimio-répulsif normalement inoffensif sur les axones rétiniens s'ils expriment Sema6D et Plexine-A1, leur interaction bloquant celle avec la Sema3. L'absence de Plexine-A1 ou Sema6D rendraient les axones sensibles à cette molécule de guidage par exemple.

Par électroporation *in utero* de shARN contre Sema6D ou Plexine-A1 dans la rétine, nous avons montré que chacune d'entre elle était indispensable dans la rétine pour la bonne innervation du CGLd par les axones rétiniens. Néanmoins, le fait que l'électroporation *in utero* dans la rétine de souris de shARN ait provoqué des défauts de ciblage dans la carte œil-spécifique comparables à ceux observés chez les souris KO, n'indique pas que leur expression dans la rétine est suffisante à la bonne innervation du CGLd. Pour prouver cela, un sauvetage du phénotype serait nécessaire chez les souris KO grâce à l'expression rétinienne par électroporation de Sema6D ou Plexine-A1. Ainsi il est tout à fait possible que Sema6D et Plexine-A1 soient également nécessaires dans le CGLd. Cela signifierait un mécanisme complexe impliquant par exemple une compétition entre ligands présents sur les axones rétiniens et ceux présents dans le CGLd, les uns pouvant inhiber ou permettre l'interaction avec les autres. Cependant, cette expérience est difficile à réaliser car la surexpression de Sema6D ou Plexine-A1 ayant un phénotype similaire, il serait difficile de contrôler le taux d'expression de Sema6D ou Plexine-A1 dans la rétine chez le mutant correspondant, ce qui induirait probablement un phénotype mutant dans tous les cas.

En dehors du CGLd, d'autres structures pourraient être impliquées dans cette signalisation, comme les vaisseaux sanguins. En effet, Sema6D et Plexine-A1 comme d'autres Sémaphorines et Plexines ont été associées à certains mécanismes d'angiogénèse et en particulier dans le cancer gastrique (Lu *et al.*, 2016). Il a ainsi été mis en évidence que Sema6D et Plexine-A1 sont fortement exprimées dans les cellules épithéliales vasculaires dans le cancer gastrique et que leur interaction favoriserait l'angiogénèse tumorale dans ce cancer via l'activation de VEGFR2 (Lu *et al.*, 2016). Or, d'autres études ont mis en évidence une relation étroite entre le développement du système vasculaire et celui du système nerveux. Concernant les axones rétiniens par exemple, les souris déficientes en Nrp1 ou en VEGF-A pouvant interagir avec Nrp1 présentent des défauts d'organisation des axones au niveau du chiasma et du tractus optique ainsi que des défauts vasculaires dans le cerveau. Si la Nrp1 est importante dans les CGRs pour le croisement du chiasma et leur fasciculation dans le tractus optique, Nrp1 est également importante dans les cellules endothéliales pour l'organisation des axones rétiniens dans le tractus optique (Erskine *et al.*, 2011). En effet, une ablation de Nrp1 uniquement dans les cellules endothéliales induit la formation de zones « d'exclusion » des axones au sein du tractus optique, mais n'affecte pas leur croisement au chiasma. Les mêmes défauts d'organisation des axones sont observés chez les souris mutantes *Vegfa 120/120* ou *Vegfa 188/188* qui présentent des défauts de vascularisation. Dans ce mécanisme impliquant Nrp1 et VEGF-A, il semblerait que les vaisseaux sanguins ne repoussent pas les axones comme observé par des études in vitro, mais ils constitueraient peut-être une barrière physique pour les axones en développement (Erskine *et al.*, 2011).

Dans notre mécanisme de ciblage impliquant Sema6D et Plexine-A1, une interaction avec des vaisseaux sanguins ectopiques ou non, avoisinant les régions ectopiques du CGLd innervées par des projections rétiniennes reste à envisager. En effet, une telle interaction pourrait expliquer cette localisation étrange des projections ectopiques de l'autre côté du tractus optique. Ainsi il se pourrait que des vaisseaux sanguins ectopiques constituent une barrière en bordure du CGLd que ne peuvent franchir certains axones, se retrouvant ainsi en dehors du CGLd. Un effet répulsif ou attractif de vaisseaux sanguins normaux n'est pas non plus à exclure. Dans ce cas, certains axones deviendraient soit sensibles soit insensibles à ces facteurs lorsqu'ils n'expriment plus Sema6D ou Plexine-A1, les attirant ou les repoussant ainsi à la périphérie du CGLd.

3. Effets non-cellulaires autonomes et sens possibles de signalisation

Par ces expériences d'électroporation de shARN Sema6D ou Plexine-A1 dans la rétine, nous avons montré que des CGRs non électroporées projettent dans des régions ectopiques en bordure du CGLd. Ces résultats indiquent un effet non–cellulaire autonome de Sema6D et Plexine-A1 dans l'établissement des connexions rétino-thalamiques. Le tractus optique entier (même les CGRs non électroporées) traverse le CGLd à la place de le contourner. La signalisation axone-axone pourrait être responsable des défauts de projection dans le CGLd ou du guidage de tout le tractus à travers ou en périphérie du CGLd.

Nous ne savons pas si Sema6D et Plexine-A1 sont impliquées dans une signalisation en *cis* et/ou en *trans* mais pour que sa diminution dans certaines CGRs ait un effet aussi sur les autres CGRs voisines, il est fort probable que ce mécanisme non-cellulaire autonome soit lié à un mécanisme de signalisation en *trans* de Sema6D et Plexine-A1 entre les axones des CGR. Le fait que chacune d'entre elle ait le même effet non-cellulaire autonome suggère qu'il existe une signalisation bidirectionnelle de Sema6D et Plexine-A1 : une en signalisation inverse où suite à son interaction avec Plexine-A1, Sema6D transduit un signal de guidage pour les CGRs l'exprimant et une signalisation en sens « classique » où Sema6D aurait un effet sur les cellules voisines en se liant à son récepteur Plexine-A1 présent sur leur membrane. Si une signalisation en *trans* semble indispensable pour permettre cette communication inter-axonale, une signalisation en *cis* n'est toutefois pas à exclure et pourrait compléter cette signalisation en *trans*.

Pour vérifier si une telle signalisation en *cis* pourrait être également impliquée, nous pourrions par exemple diminuer voire supprimer l'expression de Plexine-A1 uniquement dans les CGRs exprimant Sema6D. Si cela n'induit aucun défaut de ciblage, cela signifierait que seule une signalisation en *trans* est importante dans ce mécanisme et ce entre les CGRs exprimant Sema6D et les autres types de CGRs. A l'inverse si cela induisait un défaut de ciblage, nous ne pourrions toujours pas distinguer s'il s'agit d'une signalisation en *trans* ou en *cis* au sein même de la sous-population de CGRs exprimant Sema6D. Par ailleurs le type d'expérimentation à mettre en place pour cela serait très délicat : nous devrions alors par exemple, co-électroporer dans la rétine un plasmide dsred2 codant pour un shARN floxé contre Plexine-A1, avec un plasmide codant pour une Cre-recombinase dépendante de la GFP

(CRE-DOG^{OPT}), et ce dans des souris Sema6D GFP. Les axones jaunes seraient ceux exprimant Sema6D dans lesquels Plexine-A1 serait diminuée.

Le fait que l'effet non cellulaire-autonome ait lieu que ce soit avec le knock-down de Sema6D ou celui de Plexine-A1 dans la rétine suggère que la signalisation en *trans* serait bidirectionnelle, du moins c'est l'hypothèse de loin la plus probable. L'autre possibilité étant qu'une interaction monodirectionnelle permette d'activer une autre signalisation allant dans le sens inverse et impliquant un autre couple de récepteur-ligand entre les 2 mêmes cellules. Une façon de vérifier dans quel(s) sens la signalisation entre Plexine-A1 et Sema6D a lieu aurait été par exemple d'exprimer ou de surexprimer Plexine-A1 ou Sema6D en tronquant leur domaine intracellulaire. Malheureusement, si nos résultats de surexpression de Sema6D et Plexine-A1 fonctionnelles se confirment, cela signifierait qu'il existe un taux d'expression optimal de ces protéines et qu'en dehors de celui-ci, les défauts de ciblage induisant des patches ectopiques apparaissent. De ce fait, ce type d'expériences avec expression de protéines tronquées ne peut nous donner de réponse claire quant au sens de signalisation. En effet, l'apparition d'un phénotype de type KO via la surexpression d'une protéine tronquée pourrait signifier deux mécanismes contraires : (1) soit le domaine intracellulaire n'est pas nécessaire et la surexpression d'une protéine non-fonctionnelle équivaudrait à un knock-down par dominant négatif, (2) soit le domaine intracellulaire est important et la surexpression d'une protéine fonctionnelle équivaudrait à une surexpression avec un taux beaucoup trop élevé de cette protéine fonctionnelle.

Néanmoins, pour pouvoir préciser les sens de signalisation qui sont impliqués en *trans* entre Sema6D et Plexine-A1, il pourrait alors être intéressant de regarder quelles molécules connues en aval de la signalisation de Sema6D ou Plexine-A1 sont importantes dans ce mécanisme. Par exemple nous pourrions regarder si la voie potentiellement activée en aval de Sema6D est en partie commune avec celle impliquée dans la signalisation inverse de Sema6D nécessaire à la migration des cellules myocardiques décrite auparavant (Toyofuku, Zhang, Kumanogoh, Takegahara, Yabuki, *et al.*, 2004). Dans ces cellules myocardiques la liaison de Plexine-A1 à Sema6D recrutait Abl au domaine cytoplasmique de Sema6D, menant à la phosphorylation d'un régulateur du cytosquelette appelé enabled (Toyofuku, Zhang, Kumanogoh, Takegahara, Yabuki, *et al.*, 2004).

4. Interactions inter-axonales et mécanismes de ciblage

Nos expériences de knock-down de Sema6D et Plexine-A1 dans la rétine ont montré un effet non-cellulaire autonome de ces protéines dans le ciblage du CGLd par les axones rétiniens et ce même entre axones provenant d'un œil différent. Cela nous suggère qu'il existe une communication inter-axonale le long du tractus otique, seule portion de trajet partagée par ces types d'axones avant d'innerver le CGLd. Les interactions axone-axone ont souvent été reliées à des phénomènes de fasciculation, permettant un espacement régulier ainsi qu'une disposition parallèle et rapprochée des fibres au sein d'un nerf ou d'un tractus (Tang *et al.*, 1992, 1994; Wang *et al.*, 2011; Jaworski & Tessier-Lavigne, 2012). Cependant chez nos souris Plexine-A1 $^{-/-}$ et Sema6D $^{-/-}$, nous n'avons pu observer de défauts de fasciculation des axones rétiniens dans le tractus optique, avant leur arrivée dans le CGLd (données non montrées). Cela peut s'expliquer de deux manières : (1) le mécanisme d'interaction inter-axonale suggérée entre les axones rétiniens via Plexine-A1 et Sema6D est un mécanisme important pour le ciblage mais n'intervient pas dans celui de la fasciculation, ou (2) ces 2 mécanismes peuvent être liés mais le nombre d'axones étant affectés par ce mécanisme entre Plexine-A1 et Sema6D étant très faible comparé à l'ensemble des axones rétiniens dans le tractus optique, un défaut de fasciculation les concernant n'a pas pu être distingué.

Il semblerait d'après nos résultats que l'interaction inter-axonale entre Plexine-A1 et Sema6D soit indispensable pour un mécanisme de guidage précis de certains axones rétiniens dans le CGLd. Un tel mécanisme fait écho à de récents travaux mettant en avant une fonction de pré-ciblage des interactions entre axones au sein du tractus. Cela a ainsi été montré par exemple dans la mise en place de la topographie dans le CS, qui nécessite l'interaction entre les axones rétiniens via l'éphrine-A5 (Suetterlin & Drescher, 2014). De même dans le développement des neurones olfactifs chez la souris, la signalisation inter-axonale entre Sema3A et Npn1 régule le tri des axones des OSNs le long du nerf olfactif (Imai *et al.*, 2009), et celle entre Sema3F et Npn2 semble elle réguler la topographie des OSNs le long de l'axe dorso-ventral dans le bulbe olfactif (Takeuchi *et al.*, 2010). Ce dernier exemple de signalisation inter-axonale irait de pair avec l'idée que des axones pionniers guident d'autres axones arrivant plus tard via des interactions inter-axonales. En effet, la Sema3F serait sécrétée par les axones arrivant en premier dans le bulbe au niveau antéro-dorsal et repousserait les axones exprimant Nrp2 arrivant plus tard (Takeuchi *et al.*, 2010).

Grâce à nos expériences d'électroporation *in utero* de shARN contre Plexine-A1 ou Sema6D dans la rétine, nous avons remarqué qu'un très petit nombre d'axones perturbés par l'absence de Sema6D ou Plexine-A1 à leur membrane était capable de perturber beaucoup d'axones dans le tractus optique. Cette observation nous suggère que les shARN auraient affecté certains axones pionniers dans l'innervation du CGLd et qu'une interaction via Plexine-A1 et Sema6D entre eux et les autres axones régulerait leur ciblage précis dans le CGLd. Cette idée d'axones pionniers dans l'innervation du CGLd a déjà été évoquée depuis bien longtemps chez le hamster, dans lequel on observe plusieurs « vagues » d'axones allant innerver le CGLd (Jhaveri *et al.*, 1996). Il serait intéressant de regarder chez nos souris Sema6D$^{-/-}$ et Plexine-A1$^{-/-}$ comment se comportent les axones durant ces différentes vagues d'innervation. Nous pourrions ainsi tracer à différents âges embryonnaires (entre E14 et P0) les axones rétiniens par injection de DiI.

De plus, si nos résultats concernant la surexpression de Sema6D et Plexine-A1 dans la rétine se confirment, indiquant qu'un taux optimal de Sema6D et Plexine-A1 dans la rétine est nécessaire pour ces mécanismes de ciblage via des interactions axones-axones, cela pourrait également s'expliquer par cette hypothèse d'axones pionniers. Nous pourrions ainsi imaginer un mécanisme de type « fermeture éclair » entre axones pionniers et les autres axones afin de les guider pour rester en périphérie du CGLd et/ou pour entrer dans celui-ci via des collatérales au lieu d'innerver des régions de l'autre côté du tractus optique. Cette comparaison avec une « fermeture éclair » (présentée en **Figure 23**) illustre bien le fait qu'un taux optimal de Sema6D et Plexine-A1 serait important pour ce guidage inter-axonal. En effet, chaque Sema6D serait complémentaire d'une Plexine-A1 sur l'axone voisin avec un même espacement, formant ainsi une « dent » de fermeture éclair. Si un taux trop important de Sema6D ou de Plexine A1 est exprimé sur l'axone pionnier ou sur les 2 axones, cela gênerait la parfaite interaction tout le long de l'axone entre axone pionnier et axones guidés, menant à des défauts de ciblage. De même si Sema6D ou Plexine-A1 ne sont pas assez exprimées sur l'axone pionnier ou les deux axones, cela gênerait également leur interaction et leur guidage le long des premiers, les laissant innerver des régions anormales du CGLd (**Figure 23**). Il serait intéressant de pouvoir effectuer un marquage immunologique de Plexine-A1 et Sema6D le long des axones rétiniens et d'observer à très forte résolution leur répartition uniforme ou non. Mais pour l'instant nous ne disposons pas d'anticorps permettant de marquer convenablement Sema6D et Plexine-A1 par immunohistochimie.

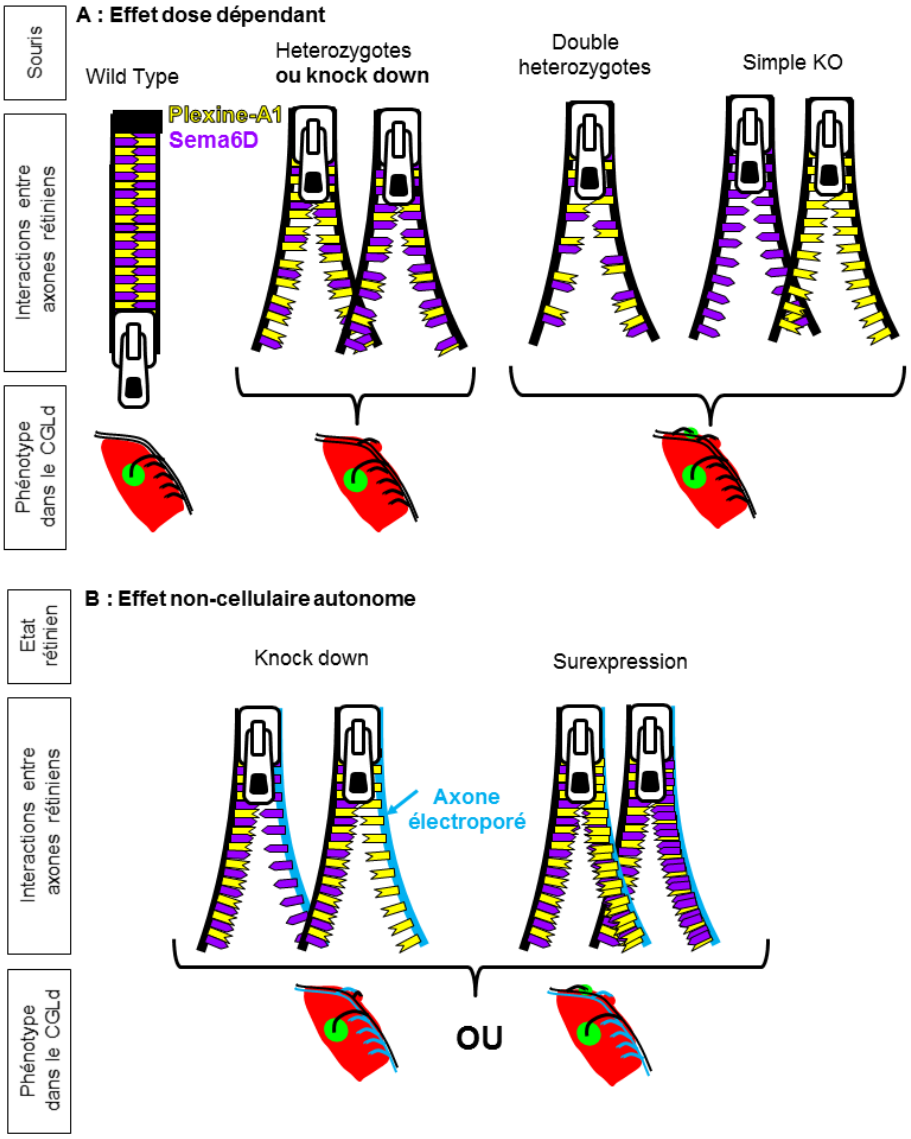


Figure 23 : Modélisation du mécanisme ayant probablement lieu entre Sema6D et Plexine-A1 le long des axones rétiniens pour leur permettre de cibler correctement le CGLd.

Dans ce modèle deux axones rétiniens voisins sont représentés par les brins d'une fermeture éclair. Plexine-A1 et Sema6D correspondent, elles, aux dents complémentaires de la fermeture éclair. Une fermeture éclair fermée indique une interaction parfaite entre les deux axones. Suite à cela, les projections rétiniennes dans le CGLd ne présentent aucun défaut de ciblage, comme observé chez les souris Wild-Type. En interagissant parfaitement ensemble, l'un des deux axones peut ainsi guider l'autre vers sa cible si c'est un axone dit "pionnier", à moins qu'ils se guident mutuellement. (A) Schématisation de l'effet dose dépendant. Dans les différentes souris mutantes pour Sema6D ou Plexine-A1, la diminution de l'expression de ces protéines est associée à un phénotype de plus en plus fort. Ce modèle représente le fait qu'une diminution de l'expression de ces protéines revient à vouloir fermer une fermeture éclair avec des dents manquantes. De ce fait, moins il y a de dents, moins l'interaction est qualitative et plus il y a des projections ectopiques, expliquant ainsi les phénotypes observés dans le CGLd. (B) Schématisation de l'effet non cellulaire autonome. Dans les souris electroporés afin de diminuer ou d'augmenter le taux d'expression de sema6D ou de Plexine-A1 dans certains axones rétiniens, nous retrouvons également ce même phénotype de défaut de ciblage avec des projections ectopiques de l'autre coté du tractus optique. Ce modèle représente là encore le fait que le manque de dents sur l'un des axones de même que la présence de dents supplémentaires empêchent la fermeture parfaite d'une fermeture éclair, conduisant ici à des défauts de ciblage. C'est pourquoi l'altération de l'expression de l'une de ces protéines dans certains axones suffit à perturber les autres axones et mène à des défauts de ciblage dans le CGLd comparables à ceux observés chez les souris KO.

5. Défauts probables de branchements et/ou de choix des cibles

Si une interaction axone-axone est nécessaire dans ce mécanisme de ciblage, nous n'avons toutefois pas exclu la possibilité d'une interaction axone-cible additionnelle, voire avec plusieurs cibles. En effet, nous ne savons toujours pas exactement de quelles CGRs proviennent les projections dans les patchs ectopiques. Elles pourraient provenir (1) de CGRs surnuméraires car non éliminées au cours du développement par exemple, (2) de CGRs qui innervent normalement une autre cible que le CGLd mais qui se retrouvent au niveau du CGLd, (3) de CGRs innervant normalement le CGLd mais dont le ciblage a été affecté, (4) de CGRs innervant normalement le CGLd mais qui forment des collatérales supplémentaires, ces collatérales allant dans les patchs ectopiques tandis que la collatérale normale innerve correctement le CGLd. La première hypothèse semble la moins probable au vu de nos résultats concernant le nombre de CGRs ipsilatérales chez les souris Plexine-A1 -/- et Sema6D -/-. Une interaction inter-axonale pourrait tout à fait induire les divers défauts de branchement et de choix de cible suggérés ci-dessus.

Concernant le choix des cibles, une interaction avec certains axones pionniers pourrait soit (1) « protéger » les axones d'un signal « d'arrêt » ou induisant un début d'arborisation au niveau du CGLd, lorsque ceux-ci sont censés passer à côté et aller arboriser plus loin au niveau du CS par exemple, soit au contraire (2) les rendre sensibles à des signaux « d'arrêt » au niveau de cibles rencontrées avant le CGLd sur leur parcours. Dans le premier cas, dans les souris Sema6D$^{-/-}$ ou Plexine-A1$^{-/-}$, des axones qui normalement iraient innerver le CS, n'ont pas été protégés par une interaction axone-axone des signaux attractifs du CGLd et ont ainsi innervé des régions ectopiques à ce niveau, n'ayant pas les autres caractéristiques leur permettant d'innerver correctement le CGLd. Dans le deuxième cas, chez les souris KO, les axones qui auraient dû innerver une cible avant le CGLd comme les noyaux supra-chiasmatiques par exemple, sont restés insensibles aux signaux de cette cible et l'ont dépassée, arrivant par la suite jusqu'au CGLd où eux aussi n'auraient pas les autres caractéristiques leur permettant de l'innerver correctement. Ce type de défaut de choix de cible illustrerait parfaitement un mécanisme de défasciculation spécifique dépendant d'une interaction inter-axonale, additionné d'un défaut de ciblage au niveau du CGLd. C'est pourquoi il serait intéressant de regarder l'ensemble des cibles du système visuel afin d'identifier si des défauts de ciblage comme des fibres manquantes, sont présents chez les souris Sema6D$^{-/-}$ ou Plexine-A1$^{-/-}$. Dans un premier temps, nous n'avons pas observé de

défaut dans le CS. Néanmoins, il se pourrait que le manque de certaines fibres si elles sont normalement réparties dans le CS ne soit pas détectable.

Un défaut de branchement apparait également comme une explication probable, d'autant plus que ces défauts de ciblage apparaissent dans le CGLd. Cette cible est en effet innervée quasiment exclusivement par des branches collatérales issues d'axones rétiniens allant innerver le CS. Le manque d'interaction avec un axone « guide » pourrait tout à fait induire des branchements surnuméraires, qui faute de guidage spécifique au sein du CGLd se retrouvent à innerver une région en bordure de celui-ci. Nous avons tenté d'observer chez les souris Sema6D$^{-/-}$ ou Plexine-A1$^{-/-}$ un nombre restreint d'axones afin de les individualiser et de déterminer si ceux innervant les patchs ectopiques présentent des branches collatérales supplémentaires. Pour cela nous avons électroporé une faible quantité de plasmide pCAG-dsred2 dans la rétine VT de souris Sema6D$^{-/-}$ ou Plexine-A1$^{-/-}$ mais la survie des souriceaux mutants et électroporés est trop faible pour avoir pu observer les branchements des axones. C'est pourquoi, pouvoir identifier la sous-population de CGRs innervant ces patchs est également important. Cela nous permettrait de les marquer spécifiquement et de mieux les analyser, sans passer par des techniques de marquage pouvant les marquer de façon aléatoire.

6. Sous population de CGRs exprimant Sema6D et hypothèses les concernant

Le fait que seules certaines CGRs expriment Sema6D est également un argument en faveur d'un mécanisme dans lequel des axones pionniers guident d'autres axones dans le tractus optique pour leur permettre d'innerver précisément leur cible. En effet cette sous-population de CGRs exprimant Sema6D pourrait constituer la population des axones pionniers dans notre mécanisme impliquant Sema6D et Plexine-A1. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous souhaitions identifier si cette sous-population correspond à un sous-type de CGRs déjà défini, nous permettant ensuite de les marquer pour suivre leur comportement le long de leur cheminement dans le système visuel. Malheureusement, nos résultats préliminaires sur les souris Tg-Sema6D GFP n'ont pas révélé une telle corrélation mais au contraire une répartition des CGRs exprimant Sema6D dans différentes sous-populations de CGRs connues, dont les ON-OFF DS-CGRs et les alpha-CGRs.

De récents travaux ont montré par séquençage d'ARN de cellules uniques que Sema6D serait plus fortement exprimée dans un groupe de CGRs (groupe 6) (Rhéaume et al. 2018). Néanmoins la relation directe entre un sous-type connu, pour lequel nous connaissons les marqueurs n'est pas encore claire. En réalité, cette étude a montré que Sema6D était exprimée dans différents sous-groupes de CGRs mais à des taux très différents. Il ne semblerait donc pas y avoir un seul sous-type de CGRs qui exprimerait Sema6D. L'expression de Sema6D pourrait alors être due à d'autres facteurs comme des molécules sécrétées ou exprimées par des CGRs voisines. Sema6D ne serait alors pas un marqueur d'une identité cellulaire mais une protéine exprimée par certaines CGRs pour jouer leur rôle (peut-être d'axones pionniers). Un exemple d'un tel mécanisme serait que certains axones non définis auparavant, font partie de la première vague d'innervation du CGLd et le fait d'arriver en premier dans la cible induirait leur expression spécifique de Sema6D à cet âge, afin de guider certains axones arrivants ensuite. Nous espérons pouvoir prochainement mieux caractériser la souris Tg-Sema6D GFP afin de confirmer ces résultats préliminaires. Néanmoins cette souris ne nous permet pas de distinguer où projettent les axones censés exprimer la Sema6D (car GFP), et ce car ils sont indiscernables au sein de la multitude de cellules GFP-positives dans le cerveau. Un marquage spécifique combiné de Sema6D uniquement dans les cellules rétiniennes semble indispensable pour cela, et pourra être envisagé en fonction de nouveaux outils génétiques dont nous pourrions disposer dans le futur concernant l'expression de Sema6D.

Enfin il se pourrait également que seules quelques CGRs de cette sous-population soient réellement impliquées comme axones pionniers dans ce mécanisme de ciblage du CGLd. La Sema6D serait alors une molécule importante pour cette fonction mais pas un critère en soi pour que l'axone effectue ce rôle, celui-ci étant soumis à d'autres facteurs.

BIBLIOGRAPHIE

Abrahamson, E.E. & Moore, R.Y. (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain research*, **916**, 172–191.

Ackman, J.B., Burbridge, T.J., & Crair, M.C. (2012) Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. *Nature*, **490**, 219–225.

Ackman, J.B. & Crair, M.C. (2014) Role of emergent neural activity in visual map development. *Current Opinion in Neurobiology*, **24**, 166–175.

Adams, R.H. & Eichmann, A. (2010) Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2**, a001875.

Ahmadlou, M. & Heimel, J.A. (2015) Preference for concentric orientations in the mouse superior colliculus. *Nature communications*, **6**, 6773.

Allen, A.E., Storchi, R., Martial, F.P., Petersen, R.S., Montemurro, M.A., Brown, T.M., & Lucas, R.J. (2014) Melanopsin-driven light adaptation in mouse vision. *Current biology : CB*, **24**, 2481–2490.

Alto, L.T. & Terman, J.R. (2017) Semaphorins and their Signaling Mechanisms. *Methods in molecular biology*, **1493**, 1–25.

Arcelli, P., Frassoni, C., Regondi, M.C., De Biasi, S., & Spreafico, R. (1997) GABAergic neurons in mammalian thalamus: a marker of thalamic complexity? *Brain research bulletin*, **42**, 27–37.

Assali, A., Gaspar, P., & Rebsam, A. (2014) Activity dependent mechanisms of visual map formation : from retinal waves to molecular regulators. *Seminars in cell & developmental biology*, **35**, 136–146.

Assali, A., Le Magueresse, C., Bennis, M., Nicol, X., Gaspar, P., & Rebsam, A. (2017) RIM1/2 in retinal ganglion cells are required for the refinement of ipsilateral axons and eye-specific segregation. *Scientific reports*, **7**, 3236.

Bachelder, R.E., Lipscomb, E.A., Lin, X., Wendt, M.A., Chadborn, N.H., Eickholt, B.J., & Mercurio, A.M. (2003) Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer research*, **63**, 5230–5233.

Badea, T.C., Cahill, H., Ecker, J., Hattar, S., & Nathans, J. (2009) Distinct Roles of Transcription Factors Brn3a and Brn3b in Controlling the Development, Morphology, and Function of Retinal Ganglion Cells. *Neuron*, **61**, 852–864.

Baden, T., Berens, P., Franke, K., Román Rosón, M., Bethge, M., & Euler, T. (2016) The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature*, **529**.

Bagri, A., Cheng, H.-J., Yaron, A., Pleasure, S.J., & Tessier-Lavigne, M. (2003) Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell*, **113**, 285–299.

Balkema, G.W. & Dräger, U.C. (1990) Origins of uncrossed retinofugal projections in normal and hypopigmented mice. *Visual neuroscience*, **4**, 595–604.

Barnstable, C.J. & Dräger, U.C. (1984) Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience*, **11**, 847–855.

Basile, J.R., Barac, A., Zhu, T., Guan, K.-L., & Gutkind, J.S. (2004) Class IV Semaphorins Promote Angiogenesis by Stimulating Rho-Initiated Pathways through Plexin-B. *Cancer Research*, **64**, 5212–5224.

Basile, J.R., Castilho, R.M., Williams, V.P., & Gutkind, J.S. (2006) Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 9017–9022.

Bastos, E.F., Marcelino, J.L., Amaral, A.R., & Serfaty, C.A. (1999) Fluoxetine-induced plasticity in the rodent visual system. *Brain research*, **824**, 28–35.

Battistini, C. & Tamagnone, L. (2016) Transmembrane semaphorins, forward and reverse signaling: Have a look both ways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **73**, 1609–1622.

Baver, S.B., Pickard, G.E., Sollars, P.J., & Pickard, G.E. (2008) Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *The European journal of neuroscience*, **27**, 1763–1770.

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

Belle, M., Parray, A., Belle, M., Chédotal, A., & Nguyen-Ba-Charvet, K.T. (2016) PlexinA2 and Sema6A are required for retinal progenitor cell migration. *Development, growth & differentiation*, **58**, 492–502.

Benjumeda, I., Escalante, A., Law, C., Morales, D., Chauvin, G., Muca, G., Coca, Y., Marquez, J., Lopez-Bendito, G., Kania, A., Martinez, L., & Herrera, E. (2013) Uncoupling of EphA/ephrinA Signaling and Spontaneous Activity in Neural Circuit Wiring. *Journal of Neuroscience*, **33**, 18208–18218.

Berson, D.M., Dunn, F.A., & Takao, M. (2002) Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, **295**, 1070–1073.

Bertuzzi, S., Hindges, R., Mui, S.H., O'Leary, D.D., & Lemke, G. (1999) The homeodomain protein vax1 is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain. *Genes & development*, **13**, 3092–3105.

Bickford, M.E., Zhou, N., Krahe, T.E., Govindaiah, G., & Guido, W. (2015) Retinal and Tectal "Driver-Like" Inputs Converge in the Shell of the Mouse Dorsal Lateral Geniculate Nucleus. *Journal of Neuroscience*, **35**, 10523–10534.

Bielenberg, D.R., Hida, Y., Shimizu, A., Kaipainen, A., Kreuter, M., Kim, C.C., & Klagsbrun, M. (2004) Semaphorin 3F, a chemorepulsant for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *The Journal of clinical investigation*, **114**, 1260–1271.

Birgbauer, E., Cowan, C.A., Sretavan, D.W., & Henkemeyer, M. (2000) Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development*, **127**, 1231–1241.

Bos, J.L. & Pannekoek, W.-J. (2012) Semaphorin signaling meets rap. *Science signaling*, **5**, pe6.

Bougeret, C., Mansur, I.G., Dastot, H., Schmid, M., Mahouy, G., Bensussan, A., & Boumsell, L. (1992) Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. *Journal of immunology*, **148**, 318–323.

Brittis, P.A., Canning, D.R., & Silver, J. (1992) Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science*, **255**, 733–736.

Brittis, P.A., Silver, J., Walsh, F.S., & Doherty, P. (1996) Fibroblast Growth Factor Receptor Function Is Required for the Orderly Projection of Ganglion Cell Axons in the Developing Mammalian Retina. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **8**, 120–128.

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

Brown, T.M., Gias, C., Hatori, M., Keding, S.R., Semo, M., Coffey, P.J., Gigg, J., Piggins, H.D., Panda, S., & Lucas, R.J. (2010) Melanopsin Contributions to Irradiance Coding in the Thalamo-Cortical Visual System. *PLoS Biology*, **8**, e1000558.

Bruce, F.M., Brown, S., Smith, J.N., Fuerst, P.G., & Erskine, L. (2017) DSCAM promotes axon fasciculation and growth in the developing optic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, 1702–1707.

Buhusi, M., Demyanenko, G.P., Jannie, K.M., Dalal, J., Darnell, E.P.B., Weiner, J.A., & Maness, P.F. (2009) ALCAM regulates mediolateral retinotopic mapping in the superior colliculus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 15630–15641.

Burgaya, F., Fontana, X., Martínez, A., Montolio, M., Mingorance, A., Simó, S., del Río, J.A., & Soriano, E. (2006) Semaphorin 6C leads to GSK-3-dependent growth cone collapse and redistributes after entorhino-hippocampal axotomy. *Molecular and cellular neurosciences*, **33**, 321–334.

Cafferty, P., Yu, L., Long, H., & Rao, Y. (2006) Semaphorin-1a functions as a guidance receptor in the Drosophila visual system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 3999–4003.

Cagnoni, G. & Tamagnone, L. (2014) Semaphorin receptors meet receptor tyrosine kinases on the way of tumor progression. *Oncogene*, **33**, 4795–4802.

Campbell, F.W. & Gregory, A.H. (1960) Effect of Size of Pupil on Visual Acuity. *Nature*, **187**, 1121–1123.

Cang, J. & Feldheim, D.A. (2013) Developmental Mechanisms of Topographic Map Formation and Alignment. *Annual Review of Neuroscience*, **36**, 51–77.

Cang, J., Rentería, R.C., Kaneko, M., Liu, X., Copenhagen, D.R., & Stryker, M.P. (2005) Development of Precise Maps in Visual Cortex Requires Patterned Spontaneous Activity in the Retina. *Neuron*, **48**, 797–809.

Carreres, M.I., Escalante, A., Murillo, B., Chauvin, G., Gaspar, P., Vegar, C., & Herrera, E. (2011) Transcription Factor Foxd1 Is Required for the Specification of the Temporal Retina in Mammals. *Journal of Neuroscience*, **31**, 5673–5681.

Castellani, V., De Angelis, E., Kenwrick, S., & Rougon, G. (2002) Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *The EMBO journal*, **21**, 6348–6357.

Catalano, A., Lazzarini, R., Di Nuzzo, S., Orciari, S., & Procopio, A. (2009) The plexin-A1 receptor activates vascular endothelial growth factor-receptor 2 and nuclear factor-kappaB to mediate survival and anchorage-independent growth of malignant mesothelioma cells. *Cancer research*, **69**, 1485–1493.

Chauvet, S., Burk, K., & Mann, F. (2013) Navigation rules for vessels and neurons: cooperative signaling between VEGF and neural guidance cues. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **70**, 1685–1703.

Chen, G., Sima, J., Jin, M., Wang, K., Xue, X., Zheng, W., Ding, Y., & Yuan, X. (2008) Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development. *Nature Neuroscience*, **11**, 36–44.

Chen, S.-K., Badea, T.C., & Hattar, S. (2011) Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature*, **476**, 92–95.

Chung, K.Y., Taylor, J.S., Shum, D.K., & Chan, S.O. (2000) Axon routing at the optic chiasm after enzymatic removal of chondroitin sulfate in mouse embryos. *Development*, **127**, 2673–2683.

Cleland, B.G., Levick, W.R., & Wässle, H. (1975) Physiological identification of a morphological class of cat retinal ganglion cells. *The Journal of physiology*, **248**, 151–171.

Cohen-Cory, S. (1999) BDNF modulates, but does not mediate, activity-dependent branching and remodeling of optic axon arbors in vivo. *The Journal of Neuroscience*, **19**, 9996–10003.

Colello, R.J. & Guillery, R.W. (1990) The early development of retinal ganglion cells with uncrossed axons in the mouse: retinal position and axonal course. *Development*, **108**, 515–523.

Conway, C.D., Price, D.J., Pratt, T., & Mason, J.O. (2011) Analysis of axon guidance defects at the optic chiasm in heparan sulphate sulphotransferase compound mutant mice. *Journal of Anatomy*, **219**, 734–742.

Correa, R.G., Sasahara, R.M., Bengtson, M.H., Katayama, M.L., Salim, A.C., Brentani, M.M., Sogayar, M.C., de Souza, S.J., & Simpson, A.J. (2001) Human semaphorin 6B [(HSA)SEMA6B], a novel human class 6 semaphorin gene: alternative splicing and all-trans-retinoic acid-dependent downregulation in glioblastoma cell lines. *Genomics*, **73**, 343–348.

Dai, J., Dalal, J.S., Thakar, S., Henkemeyer, M., Lemmon, V.P., Harunaga, J.S., Schlatter, M.C., Buhusi, M., & Maness, P.F. (2012) EphB regulates L1 phosphorylation during retinocollicular mapping. *Molecular and cellular neurosciences*, **50**, 201–210.

Dean, P., Mitchell, I.J., & Redgrave, P. (1988) Responses resembling defensive behaviour produced by microinjection of glutamate into superior colliculus of rats. *Neuroscience*, **24**, 501–510.

Dean, P., Redgrave, P., & Westby, G.W.M. (1989) Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends in Neurosciences*, **12**, 137–147.

Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., & Sretavan, D.W. (1997) Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron*, **19**, 575–589.

Delaire, S., Elhabazi, A., Bensussan, A., & Boumsell, L. (1998) CD100 is a leukocyte semaphorin. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, **54**, 1265–1276.

Dhande, O.S., Estevez, M.E., Quattrochi, L.E., El-Danaf, R.N., Nguyen, P.L., Berson, D.M., & Huberman, A.D. (2013) Genetic Dissection of Retinal Inputs to Brainstem Nuclei Controlling Image Stabilization. *Journal of Neuroscience*, **33**, 17797–17813.

Dhande, O.S., Hua, E.W., Guh, E., Yeh, J., Bhatt, S., Zhang, Y., Ruthazer, E.S., Feller, M.B., & Crair, M.C. (2011) Development of Single Retinofugal Axon Arbors in Normal and 2 Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience*, **31**, 3384–3399.

Dhande, O.S. & Huberman, A.D. (2014) Retinal ganglion cell maps in the brain: implications for visual processing. *Current Opinion in Neurobiology*, **24**, 133–142.

Dhande, O.S., Stafford, B.K., Lim, J.-H.A., & Huberman, A.D. (2015) Contributions of Retinal Ganglion Cells to Subcortical Visual Processing and Behaviors. *Annual Review of Vision Science*, **1**, 291–328.

Dharmaratne, N., Glendining, K.A., Young, T.R., Tran, H., Sawatari, A., & Leamey, C.A. (2012) Ten-m3 Is Required for the Development of Topography in the Ipsilateral Retinocollicular Pathway. *PLoS ONE*, **7**, e43083.

Dick, G., Tan, C.L., Alves, J.N., Ehlert, E.M.E., Miller, G.M., Hsieh-Wilson, L.C., Sugahara, K., Oosterhof, A., van Kuppevelt, T.H., Verhaagen, J., Fawcett, J.W., & Kwok, J.C.F. (2013) Semaphorin 3A Binds to the Perineuronal Nets via Chondroitin Sulfate Type E Motifs in Rodent Brains. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 27384–27395.

Distler, C. & Hoffmann, K.-P. (2011) The optokinetic reflex. In Liversedge, S.P., Gilchrist, I.D., & Everling, S. (eds), *The Oxford Handbook of Eye Movements*, Oxford lib. edn. Oxford University Press, New York, NY, US, pp. 65–83.

Distler, C. & Hoffmann, K.P. (1989a) The pupillary light reflex in normal and innate microstrabismic cats, I: Behavior and receptive-field analysis in the nucleus praetectalis olivaris. *Visual neuroscience*, **3**, 127–138.

Distler, C. & Hoffmann, K.P. (1989b) The pupillary light reflex in normal and innate microstrabismic cats, II: Retinal and cortical input to the nucleus praetectalis olivaris. *Visual neuroscience*, **3**, 139–153.

Dräger, U. & Olsen, J. (1980) Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol.*, **191**, 383–412.

Dräger, U.C. (1985) Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **224**, 57–77.

Drager, U.C. & Hubel, D.H. (1975a) Responses to visual stimulation and relationship between visual, auditory, and somatosensory inputs in mouse superior colliculus. *Journal of Neurophysiology*, **38**, 690–713.

Drager, U.C. & Hubel, D.H. (1975b) Physiology of visual cells in mouse superior colliculus and correlation with somatosensory and auditory input. *Nature*, **253**, 203–204.

Dräger, U.C. & Hubel, D.H. (1976) Topography of visual and somatosensory projections to mouse superior colliculus. *Journal of neurophysiology*, **39**, 91–101.

Dräger, U.C. & Olsen, J.F. (1981) Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*, **20**, 285–293.

Ecker, J.L., Dumitrescu, O.N., Wong, K.Y., Alam, N.M., Chen, S.-K., LeGates, T., Renna, J.M., Prusky, G.T., Berson, D.M., & Hattar, S. (2010) Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion-Cell Photoreceptors: Cellular Diversity and Role in Pattern Vision. *Neuron*, **67**, 49–60.

El-Danaf, R.N., Krahe, T.E., Dilger, E.K., Bickford, M.E., Fox, M.A., & Guido, W. (2015) Developmental remodeling of relay cells in the dorsal lateral geniculate nucleus in the absence of retinal input. *Neural Development*, **10**, 19.

Ellard, C.G. & Goodale, M.A. (1988) A functional analysis of the collicular output pathways: a dissociation of deficits following lesions of the dorsal tegmental decussation and the ipsilateral collicular efferent bundle in the Mongolian gerbil. *Experimental brain research*, **71**, 307–319.

Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J.M., Alakakone, B., Shewan, D., & Ruhrberg, C. (2011) VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. *Neuron*, **70**, 951–965.

Erskine, L., Williams, S.E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R.A., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., & Mason, C.A. (2000) Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robos and slits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**, 4975–4982.

Estevez, M.E., Fogerson, P.M., Ilardi, M.C., Borghuis, B.G., Chan, E., Weng, S., Auferkorte, O.N., Demb, J.B., & Berson, D.M. (2012) Form and function of the M4 cell, an intrinsically photosensitive retinal ganglion cell type contributing to geniculocortical vision. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 13608–13620.

Etienne-Manneville, S. & Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629–635.

Famiglietti, E. & Kolb, H. (1976) Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science*, **194**, 193–195.

Famiglietti, E. V, Kaneko, A., & Tachibana, M. (1977) Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina. *Science*, **198**, 1267–1269.

Faulkner, R.L., Low, L.K., Liu, X.-B., Coble, J., Jones, E.G., & Cheng, H.-J. (2008) Dorsal turning of motor corticospinal axons at the pyramidal decussation requires plexin signaling. *Neural Development*, **3**, 21.

Favier, B., Alam, A., Barron, P., Bonnin, J., Laboudie, P., Fons, P., Mandron, M., Herault, J.-P., Neufeld, G., Savi, P., Herbert, J.-M., & Bono, F. (2006) Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood*, **108**, 1243–1250.

Feinberg, E.H. & Meister, M. (2015) Orientation columns in the mouse superior colliculus. *Nature*, **519**, 229–232.

Feldheim, D.A., Nakamoto, M., Osterfield, M., Gale, N.W., DeChiara, T.M., Rohatgi, R., Yancopoulos, G.D., & Flanagan, J.G. (2004) Loss-of-Function Analysis of EphA Receptors in Retinotectal Mapping. *Journal of Neuroscience*, **24**, 2542–2550.

Feldheim, D.A. & O'Leary, D.D.M. (2010) Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*,.

Feller, M.B., Wellis, D.P., Stellwagen, D., Werblin, F.S., & Shatz, C.J. (1996) Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science (New York, N.Y.)*, **272**, 1182–1187.

Fenstermaker, V., Chen, Y., Ghosh, A., & Yuste, R. (2004) Regulation of dendritic length and branching by semaphorin 3A. *Journal of neurobiology*, **58**, 403–412.

Fernandez, D.C., Chang, Y.-T., Hattar, S., & Chen, S.-K. (2016) Architecture of retinal projections to the central circadian pacemaker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 6047–6052.

Friedel, R.H., Kerjan, G., Rayburn, H., Schuller, U., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M., & Chedotal, A. (2007) Plexin-B2 Controls the Development of Cerebellar Granule Cells. *Journal of Neuroscience*, **27**, 3921–3932.

Friedlander, M.J., Lin, C.S., Stanford, L.R., & Sherman, S.M. (1981) Morphology of functionally identified neurons in lateral geniculate nucleus of the cat. *Journal of Neurophysiology*, **46**, 80–129.

Frisén, J., Yates, P.A., McLaughlin, T., Friedman, G.C., O'Leary, D.D., & Barbacid, M. (1998) Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, **20**, 235–243.

Fujisawa, H. (2004) Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *Journal of Neurobiology*, **59**, 24–33.

Fukuda, T., Takeda, S., Xu, R., Ochi, H., Sunamura, S., Sato, T., Shibata, S., Yoshida, Y., Gu, Z., Kimura, A., Ma, C., Xu, C., Bando, W., Fujita, K., Shinomiya, K., Hirai, T., Asou, Y., Enomoto, M., Okano, H., Okawa, A., & Itoh, H. (2013) Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations. *Nature*, **497**, 490–493.

Gale, S.D. & Murphy, G.J. (2014) Distinct Representation and Distribution of Visual Information by Specific Cell Types in Mouse Superficial Superior Colliculus. *Journal of Neuroscience*, **34**, 13458–13471.

Galli, L. & Maffei, L. (1988) Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. *Science*, **242**, 90–91.

Gamlin, P.D. & Clarke, R.J. (1995) The pupillary light reflex pathway of the primate. *Journal of the American Optometric Association*, **66**, 415–418.

Gamlin, P.D., Zhang, H., & Clarke, R.J. (1995) Luminance neurons in the pretectal olivary nucleus mediate the pupillary light reflex in the rhesus monkey. *Experimental brain research*, **106**, 169–176.

Gamlin, P.D.R. (2006) The pretectum: connections and oculomotor-related roles. *Progress in brain research*, **151**, 379–405.

Gandhi, N.J. & Katnani, H.A. (2011) Motor Functions of the Superior Colliculus. *Annual Review of Neuroscience*, **34**, 205–231.

Garcia-Frigola, C., Carreres, M.I., Vegar, C., Mason, C., & Herrera, E. (2008) Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. *Development*, **135**, 1833–1841.

García-Frigola, C. & Herrera, E. (2010) Zic2 regulates the expression of Sert to modulate eye-specific refinement at the visual targets. *The EMBO journal*, **29**, 3170–3183.

Garcia, F., Lepelletier, Y., Smaniotto, S., Hadj-Slimane, R., Dardenne, M., Hermine, O., & Savino, W. (2012) Inhibitory effect of semaphorin-3A, a known axon guidance molecule, in the human thymocyte migration induced by CXCL12. *Journal of leukocyte biology*, **91**, 7–13.

Giacobini, P. & Prevot, V. (2013) Semaphorins in the development, homeostasis and disease of hormone systems. *Seminars in cell & developmental biology*, **24**, 190–198.

Giolli, R.A., Blanks, R.H.I., & Lui, F. (2006) The accessory optic system: basic organization with an update on connectivity, neurochemistry, and function. *Progress in brain research*, **151**, 407–440.

Gitay-Goren, H., Cohen, T., Tessler, S., Soker, S., Gengrinovitch, S., Rockwell, P., Klagsbrun, M., Levi, B.Z., & Neufeld, G. (1996) Selective binding of VEGF121 to one of the three vascular endothelial growth factor receptors of vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 5519–5523.

Gitler, A.D., Lu, M.M., & Epstein, J.A. (2004) PlexinD1 and Semaphorin Signaling Are Required in Endothelial Cells for Cardiovascular Development. *Developmental Cell*, **7**, 107–116.

Glinka, Y. & Prud'homme, G.J. (2008) Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor β-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *Journal of Leukocyte Biology*, **84**, 302–310.

Godement, P., Salaün, J., & Imbert, M. (1984) Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, **230**, 552–575.

Godenschwege, T.A., Hu, H., Shan-Crofts, X., Goodman, C.S., & Murphey, R.K. (2002) Bi-directional signaling by Semaphorin 1a during central synapse formation in Drosophila. *Nature Neuroscience*, **5**, 1294–1301.

Gooley, J.J., Lu, J., Chou, T.C., Scammell, T.E., & Saper, C.B. (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nature neuroscience*, **4**, 1165.

Göz, D., Studholme, K., Lappi, D.A., Rollag, M.D., Provencio, I., & Morin, L.P. (2008) Targeted Destruction of Photosensitive Retinal Ganglion Cells with a Saporin Conjugate Alters the Effects of Light on Mouse Circadian Rhythms. *PLoS ONE*, **3**, e3153.

Grubb, M.S. & Thompson, I.D. (2003) Quantitative Characterization of Visual Response Properties in the Mouse Dorsal Lateral Geniculate Nucleus. *Journal of Neurophysiology*, **90**, 3594–3607.

Gu, C. & Giraudo, E. (2013) The role of semaphorins and their receptors in vascular development and cancer. *Experimental cell research*, **319**, 1306–1316.

Gu, C., Yoshida, Y., Livet, J., Reimert, D. V, Mann, F., Merte, J., Henderson, C.E., Jessell, T.M., Kolodkin, A.L., & Ginty, D.D. (2005) Semaphorin 3E and Plexin-D1 Control Vascular Pattern Independently of Neuropilins. *Science*, **307**, 265–268.

Guillery, R.W., Mason, C.A., & Taylor, J.S. (1995) Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *The Journal of Neuroscience*, **15**, 4727–4737.

Güler, A.D., Ecker, J.L., Lall, G.S., Haq, S., Altimus, C.M., Liao, H.-W., Barnard, A.R., Cahill, H., Badea, T.C., Zhao, H., Hankins, M.W., Berson, D.M., Lucas, R.J., Yau, K.-W., & Hattar, S. (2008) Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature*, **453**, 102–105.

Guttmann-Raviv, N., Shraga-Heled, N., Varshavsky, A., Guimaraes-Sternberg, C., Kessler, O., & Neufeld, G. (2007) Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 26294–26305.

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

Hall, A. & Lalli, G. (2010) Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2**, a001818.

Hatori, M., Le, H., Vollmers, C., Keding, S.R., Tanaka, N., Schmedt, C., Jegla, T., & Panda, S. (2008) Inducible Ablation of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells Reveals Their Central Role in Non-Image Forming Visual Responses. *PLoS ONE*, **3**, e2451.

Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K.-W., & Berson, D.M. (2006) Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, **497**, 326–349.

Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., & Yau, K.W. (2002) Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. *Science*, **295**, 1065–1070.

Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A., & Takayanagi, H. (2012) Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature*, **485**, 69–74.

He, H., Yang, T., Terman, J.R., & Zhang, X. (2009) Crystal structure of the plexin A3 intracellular region reveals an autoinhibited conformation through active site sequestration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 15610–15615.

Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R.A., Dolen, G., Mikoshiba, K., Brown, S., & Mason, C.A. (2003) Zic2 Patterns Binocular Vision by Specifying the Uncrossed Retinal Projection. *Cell*, **114**, 545–557.

Herrera, E. & Erskine, L. (2017) Guidance of retinal axons in mammals. *Seminars in Cell and Developmental Biology*,.

Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M., & O'Leary, D.D.M. (2002) EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron*, **35**, 475–487.

Hofbauer, A. & Dräger, U.C. (1985) Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *Journal of Comparative Neurology*, **234**, 465–474.

Hota, P.K. & Buck, M. (2012) Plexin structures are coming: opportunities for multilevel investigations of semaphorin guidance receptors, their cell signaling mechanisms, and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **69**, 3765–3805.

Howarth, M., Walmsley, L., & Brown, T.M. (2014) Binocular Integration in the Mouse Lateral Geniculate Nuclei. *Current Biology*, **24**, 1241–1247.

Hsieh, H.-H., Chang, W.-T., Yu, L., & Rao, Y. (2014) Control of axon-axon attraction by Semaphorin reverse signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 11383–11388.

Hu, H. (2001) Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nature Neuroscience*, **4**, 695–701.

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

Huberman, A.D., Feller, M.B., & Chapman, B. (2008) Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annual review of neuroscience*,.

Huberman, A.D., Manu, M., Koch, S.M., Susman, M.W., Lutz, A.B., Ullian, E.M., Baccus, S.A., & Barres, B.A. (2008) Architecture and activity-mediated refinement of axonal projections from a mosaic of genetically identified retinal ganglion cells. *Neuron*, **59**, 425–438.

Huberman, A.D., Wei, W., Elstrott, J., Stafford, B.K., Feller, M.B., & Barres, B.A. (2009) Genetic Identification of an On-Off Direction- Selective Retinal Ganglion Cell Subtype Reveals a Layer-Specific Subcortical Map of Posterior Motion. *Neuron*, **62**, 327–334.

Huettl, R.-E., Soellner, H., Bianchi, E., Novitch, B.G., & Huber, A.B. (2011) Npn-1 Contributes to Axon-Axon Interactions That Differentially Control Sensory and Motor Innervation of the Limb. *PLoS Biology*, **9**, e1001020.

Hufnagel, R.B., Le, T.T., Riesenberg, A.L., & Brown, N.L. (2010) Neurog2 controls the leading edge of neurogenesis in the mammalian retina. *Developmental biology*, **340**, 490–503.

Hung, R.-J., Spaeth, C.S., Yesilyurt, H.G., & Terman, J.R. (2013) SelR reverses Mical-mediated oxidation of actin to regulate F-actin dynamics. *Nature cell biology*, **15**, 1445–1454.

Hung, R.-J. & Terman, J.R. (2011) Extracellular inhibitors, repellents, and semaphorin/plexin/MICAL-mediated actin filament disassembly. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, **68**, 415–433.

Hung, R.-J., Yazdani, U., Yoon, J., Wu, H., Yang, T., Gupta, N., Huang, Z., van Berkel, W.J.H., & Terman, J.R. (2010) Mical links semaphorins to F-actin disassembly. *Nature*, **463**, 823–827.

Hussain, S.-A., Piper, M., Fukuhara, N., Strochlic, L., Cho, G., Howitt, J.A., Ahmed, Y., Powell, A.K., Turnbull, J.E., Holt, C.E., & Hohenester, E. (2006) A molecular mechanism for the heparan sulfate dependence of slit-robo signaling. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 39693–39698.

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

Ingle, D. (1973) Two visual systems in the frog. *Science*, **181**, 1053–1055.

Insausti, R., Blakemore, C., & Cowan, W.M. (1984) Ganglion cell death during development of ipsilateral retino-collicular projection in golden hamster. *Nature*, **308**, 362–365.

Ivanova, E., Lee, P., & Pan, Z.-H. (2013) Characterization of multiple bistratified retinal ganglion cells in a purkinje cell protein 2-Cre transgenic mouse line. *Journal of Comparative Neurology*, **521**, 2165–2180.

Jaitin, D.A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Elefant, N., Paul, F., Zaretsky, I., Mildner, A., Cohen, N., Jung, S., Tanay, A., & Amit, I. (2014) Massively Parallel Single-Cell RNA-Seq for Marker-Free Decomposition of Tissues into Cell Types. *Science*, **343**, 776–779.

Janssen, B.J.C., Malinauskas, T., Weir, G.A., Cader, M.Z., Siebold, C., & Jones, E.Y. (2012) Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nature structural & molecular biology*, **19**, 1293–1299.

Janssen, B.J.C., Robinson, R.A., Pérez-Brangulí, F., Bell, C.H., Mitchell, K.J., Siebold, C., & Jones, E.Y. (2010) Structural basis of semaphorin-plexin signalling. *Nature*, **467**, 1118–1122.

Jaubert-Miazza, L., Green, E., Lo, F.-S., Bui, K., Mills, J., & Guido, W. (2005) Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. *Visual neuroscience*, **22**, 661–676.

Jaworski, A. & Tessier-Lavigne, M. (2012) Autocrine/juxtaparacrine regulation of axon fasciculation by Slit-Robo signaling. *Nature Neuroscience*, **15**, 367–369.

Jeong, S., Juhaszova, K., & Kolodkin, A.L. (2012) The Control of semaphorin-1a-mediated reverse signaling by opposing pebble and RhoGAPp190 functions in drosophila. *Neuron*, **76**, 721–734.

Jeong, S., Yang, D.-S., Hong, Y.G., Mitchell, S.P., Brown, M.P., & Kolodkin, A.L. (2017) Varicose and cheerio collaborate with pebble to mediate semaphorin-1a reverse signaling in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, E8254–E8263.

Jhaveri, S., Erzurumlu, R.S., & Schneider, G.E. (1996) The optic tract in embryonic hamsters: Fasciculation, defasciculation, and other rearrangements of retinal axons. *Visual Neuroscience*, **13**, 359–374.

Jongbloets, B.C. & Pasterkamp, R.J. (2014) Semaphorin signalling during development. *Development*, **141**, 3292–3297.

Julien, F., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., Püschel, A.W., Sanes, J.R., Castellani, V., & Castellani, V. (2005) Dual Functional Activity of Semaphorin 3B Is Required for Positioning the Anterior Commissure. *Neuron*, **48**, 63–75.

Kang, S. & Kumanogoh, A. (2013) Semaphorins in bone development, homeostasis, and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **24**, 163–171.

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

Kärpänen, T., Heckman, C.A., Keskitalo, S., Jeltsch, M., Ollila, H., Neufeld, G., Tamagnone, L., & Alitalo, K. (2006) Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *The FASEB Journal*, **20**, 1462–1472.

Karten, H.J. & Brecha, N. (1983) Localization of neuroactive substances in the vertebrate retina: evidence for lamination in the inner plexiform layer. *Vision research*, **23**, 1197–1205.

Kay, J.N., Chu, M.W., & Sanes, J.R. (2012) MEGF10 and MEGF11 mediate homotypic interactions required for mosaic spacing of retinal neurons. *Nature*, **483**, 465–469.

Kay, J.N., De la Huerta, I., Kim, I.-J., Zhang, Y., Yamagata, M., Chu, M.W., Meister, M., & Sanes, J.R. (2011) Retinal Ganglion Cells with Distinct Directional Preferences Differ in Molecular Identity, Structure, and Central Projections. *Journal of Neuroscience*, **31**, 7753–7762.

Kerjan, G., Dolan, J., Haumaitre, C., Schneider-Maunoury, S., Fujisawa, H., Mitchell, K.J., & Chédotal, A. (2005) The transmembrane semaphorin Sema6A controls cerebellar granule cell migration. *Nature Neuroscience*, **8**, 1516–1524.

Kerschensteiner, D. & Guido, W. (2017) Organization of the dorsal lateral geniculate nucleus in the mouse. *Visual neuroscience*,.

Kigel, B., Rabinowicz, N., Varshavsky, A., Kessler, O., & Neufeld, G. (2011) Plexin-A4 promotes tumor progression and tumor angiogenesis by enhancement of VEGF and bFGF signaling. *Blood*, **118**, 4285–4296.

Kikuchi, K., Chédotal, A., Hanafusa, H., Ujimasa, Y., de Castro, F., Goodman, C.S., & Kimura, T. (1999) Cloning and Characterization of a Novel Class VI Semaphorin, Semaphorin Y. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **13**, 9–23.

Kim, I.-J., Zhang, Y., Meister, M., & Sanes, J.R. (2010) *Laminar Restriction of Retinal Ganglion Cell Dendrites and Axons: Subtype-Specific Developmental Patterns Revealed with Transgenic Markers.*, The Journal of neuroscience.

Kim, I.-J., Zhang, Y., Yamagata, M., Meister, M., & Sanes, J.R. (2008) Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion. *Nature*, **452**, 478–482.

Kim, N., Min, K.W., Kang, K.H., Lee, E.J., Kim, H.-T., Moon, K., Choi, J., Le, D., Lee, S.-H., & Kim, J.W. (2014) Regulation of retinal axon growth by secreted Vax1 homeodomain protein. *eLife*, **3**, e02671.

Kinbara, K., Goldfinger, L.E., Hansen, M., Chou, F.-L., & Ginsberg, M.H. (2003) Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**, 767–777.

Kirkby, L.A., Sack, G.S., Firl, A., & Feller, M.B. (2013) A Role for Correlated Spontaneous Activity in the Assembly of Neural Circuits. *Neuron*, **80**, 1129–1144.

Klein, A.M., Mazutis, L., Akartuna, I., Tallapragada, N., Veres, A., Li, V., Peshkin, L., Weitz, D.A., & Kirschner, M.W. (2015) Droplet Barcoding for Single-Cell Transcriptomics Applied to Embryonic Stem Cells. *Cell*, **161**, 1187–1201.

Klostermann, A., Lutz, B., Gertler, F., & Behl, C. (2000) The orthologous human and murine semaphorin 6A-1 proteins (SEMA6A-1/Sema6A-1) bind to the enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein (EVL) via a novel carboxyl-terminal zyxin-like domain. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 39647–39653.

Koch, S. & Claesson-Welsh, L. (2012) Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, **2**, a006502.

Koch, S.M., Dela Cruz, C.G., Hnasko, T.S., Edwards, R.H., Huberman, A.D., & Ullian, E.M. (2011) Pathway-Specific Genetic Attenuation of Glutamate Release Alters Select Features of Competition-Based Visual Circuit Refinement. *Neuron*, **71**, 235–242.

Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., O'Connor, T.P., Patel, N.H., Admon, A., Bentley, D., & Goodman, C.S. (1992) Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron*, **9**, 831–845.

Komiyama, T., Sweeney, L.B., Schuldiner, O., Garcia, K.C., & Luo, L. (2007) Graded Expression of Semaphorin-1a Cell-Autonomously Directs Dendritic Targeting of Olfactory Projection Neurons. *Cell*, **128**, 399–410.

Krahe, T.E., El-Danaf, R.N., Dilger, E.K., Henderson, S.C., & Guido, W. (2011) Morphologically Distinct Classes of Relay Cells Exhibit Regional Preferences in the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus of the Mouse. *Journal of Neuroscience*, **31**, 17437–17448.

Kuffler, S.W. (1953) Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *Journal of Neurophysiology*, **16**, 37–68.

Kumanogoh, A. & Kikutani, H. (2013) Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. *Nature reviews. Immunology*, **13**, 802–814.

Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Ch'ng, E., Ishida, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Yoshida, K., & Kikutani, H. (2002) Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature*, **419**, 629–633.

Kumanogoh, A., Watanabe, C., Lee, I., Wang, X., Shi, W., Araki, H., Hirata, H., Iwahori, K., Uchida, J., Yasui, T., Matsumoto, M., Yoshida, K., Yakura, H., Pan, C., Parnes, J.R., & Kikutani, H. (2000) Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity*, **13**, 621–631.

Kuwajima, T., Soares, C.A., Sitko, A.A., Lefebvre, V., & Mason, C. (2017) SoxC Transcription Factors Promote Contralateral Retinal Ganglion Cell Differentiation and Axon Guidance in the Mouse Visual System. *Neuron*, **93**, 1110–1125.e5.

Kuwajima, T., Yoshida, Y., Takegahara, N., Petros, T.J., Kumanogoh, A., Jessell, T.M., Sakurai, T., & Mason, C. (2012) Optic Chiasm Presentation of Semaphorin6D in the Context of Plexin-A1 and Nr-CAM Promotes Retinal Axon Midline Crossing. *Neuron*, **74**, 676–690.

Leamey, C.A., Merlin, S., Lattouf, P., Sawatari, A., Zhou, X., Demel, N., Glendining, K.A., Oohashi, T., Sur, M., & Fässler, R. (2007) Ten_m3 Regulates Eye-Specific Patterning in the Mammalian Visual Pathway and Is Required for Binocular Vision. *PLoS Biology*, **5**, e241.

Lee, B.C., Péterfi, Z., Hoffmann, F.W., Moore, R.E., Kaya, A., Avanesov, A., Tarrago, L., Zhou, Y., Weerapana, E., Fomenko, D.E., Hoffmann, P.R., & Gladyshev, V.N. (2013) MsrB1 and MICALs regulate actin assembly and macrophage function via reversible stereoselective methionine oxidation. *Molecular cell*, **51**, 397–404.

LeGates, T.A., Fernandez, D.C., & Hattar, S. (2014) Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nature Reviews Neuroscience*, **15**, 443–454.

Leighton, P.A., Mitchell, K.J., Goodrich, L. V, Lu, X., Pinson, K., Scherz, P., Skarnes, W.C., & Tessier-Lavigne, M. (2001) Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature*, **410**, 174–179.

Lepelletier, Y., Smaniotto, S., Hadj-Slimane, R., Villa-Verde, D.M.S., Nogueira, A.C., Dardenne, M., Hermine, O., & Savino, W. (2007) Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 5545–5550.

Leslie, J.R., Imai, F., Fukuhara, K., Takegahara, N., Rizvi, T.A., Friedel, R.H., Wang, F., Kumanogoh, A., & Yoshida, Y. (2011) Ectopic myelinating oligodendrocytes in the dorsal spinal cord as a consequence of altered semaphorin 6D signaling inhibit synapse formation. *Development*, **138**, 4085–4095.

Linden, R. & Perry, V.H. (1983) Massive retinotectal projection in rats. *Brain research*, **272**, 145–149.

Little, G.E., López-Bendito, G., Rünker, A.E., García, N., Piñon, M.C., Chédotal, A., Molnár, Z., & Mitchell, K.J. (2009) Specificity and Plasticity of Thalamocortical Connections in Sema6A Mutant Mice. *PLoS Biology*, **7**, e1000098.

Liu, H., Juo, Z.S., Shim, A.H.-R., Focia, P.J., Chen, X., Garcia, K.C., & He, X. (2010) Structural Basis of Semaphorin-Plexin Recognition and Viral Mimicry from Sema7A and A39R Complexes with PlexinC1. *Cell*, **142**, 749–761.

Liu, J., Wilson, S., & Reh, T. (2003) BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina. *Developmental biology*, **256**, 34–48.

Low, L.K., Liu, X.-B., Faulkner, R.L., Coble, J., & Cheng, H.-J. (2008) Plexin signaling selectively regulates the stereotyped pruning of corticospinal axons from visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 8136–8141.

Lu, Y., Xu, Q., Chen, L., Zuo, Y., Liu, S., Hu, Y., Li, X., Li, Y., & Zhao, X. (2016) Expression of semaphorin 6D and its receptor plexin-A1 in gastric cancer and their association with tumor angiogenesis. *Oncology Letters*, **12**, 3967–3974.

Lucas, R.J., Lall, G.S., Allen, A.E., & Brown, T.M. (2012) How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock. In *Progress in Brain Research*. pp. 1–18.

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

Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., Trombetta, J.J., Weitz, D.A., Sanes, J.R., Shalek, A.K., Regev, A., & McCarroll, S.A. (2015) Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell*, **161**, 1202–1214.

Maier, V., Jolicoeur, C., Rayburn, H., Takegahara, N., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Tessier-Lavigne, M., Wurst, W., & Friedel, R.H. (2011) Semaphorin 4C and 4G are ligands of Plexin-B2 required in cerebellar development. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **46**, 419–431.

Maione, F., Molla, F., Meda, C., Latini, R., Zentilin, L., Giacca, M., Seano, G., Serini, G., Bussolino, F., & Giraudo, E. (2009) Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *Journal of Clinical Investigation*, **119**, 3356–3372.

Makinen, T., Olofsson, B., Karpanen, T., Hellman, U., Soker, S., Klagsbrun, M., Eriksson, U., & Alitalo, K. (1999) Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 21217–21222.

Mao, C.-A., Li, H., Zhang, Z., Kiyama, T., Panda, S., Hattar, S., Ribelayga, C.P., Mills, S.L., & Wang, S.W. (2014) T-box transcription regulator Tbr2 is essential for the formation and maintenance of Opn4/melanopsin-expressing intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **34**, 13083–13095.

Marcos, S., Nieto-Lopez, F., Sandonìs, A., Cardozo, M.J., Di Marco, F., Esteve, P., & Bovolenta, P. (2015) Secreted frizzled related proteins modulate pathfinding and fasciculation of mouse retina ganglion cell axons by direct and indirect mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **35**, 4729–4740.

Marcus, R.C. & Mason, C.A. (1995) The first retinal axon growth in the mouse optic chiasm: axon patterning and the cellular environment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **15**, 6389–6402.

Marín, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., & Rubenstein, J.L. (2001) Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science (New York, N.Y.)*, **293**, 872–875.

Marquardt, T. & Gruss, P. (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends in Neurosciences*, **25**, 32–38.

Matsuoka, R.L., Chivatakarn, O., Badea, T.C., Samuels, I.S., Cahill, H., Katayama, K.-I., Kumar, S.R., Suto, F., Chédotal, A., Peachey, N.S., Nathans, J., Yoshida, Y., Giger, R.J., & Kolodkin, A.L. (2011) Class 5 transmembrane semaphorins control selective Mammalian retinal lamination and function. *Neuron*, **71**, 460–473.

Matsuoka, R.L., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Parray, A., Badea, T.C., Chédotal, A., & Kolodkin, A.L. (2011) Transmembrane semaphorin signalling controls laminar stratification in the mammalian retina. *Nature*, **470**, 259–263.

Matsuoka, R.L., Sun, L.O., Katayama, K., Yoshida, Y., & Kolodkin, A.L. (2013) Sema6B, Sema6C, and Sema6D Expression and Function during Mammalian Retinal Development. *PLoS ONE*, **8**, e63207.

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

McLaughlin, T., Lim, Y.-S., Santiago, A., & O'Leary, D.D.M. (2014) Multiple EphB receptors mediate dorsal–ventral retinotopic mapping via similar bi-functional responses to ephrin-B1. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **63**, 24–30.

McLaughlin, T. & O'Leary, D.D.M. (2005) Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annual Review of Neuroscience*, **28**, 327–355.

McNeill, D.S., Sheely, C.J., Ecker, J.L., Badea, T.C., Morhardt, D., Guido, W., & Hattar, S. (2011) Development of melanopsin-based irradiance detecting circuitry. *Neural Development*, **6**, 8.

Megason, S.G. & McMahon, A.P. (2002) A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 2087–2098.

Mendes-da-Cruz, D.A., Stimamiglio, M.A., Muñoz, J.J., Alfaro, D., Terra-Granado, E., Garcia-Ceca, J., Alonso-Colmenar, L.M., Savino, W., & Zapata, A.G. (2012) Developing T-cell migration: role of semaphorins and ephrins. *The FASEB Journal*, **26**, 4390–4399.

Michos, O. (2009) Kidney development: from ureteric bud formation to branching morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, **19**, 484–490.

Migdal, M., Huppertz, B., Tessler, S., Comforti, A., Shibuya, M., Reich, R., Baumann, H., & Neufeld, G. (1998) Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 22272–22278.

Mizumoto, K. & Shen, K. (2013) Interaxonal Interaction Defines Tiled Presynaptic Innervation in C. elegans. *Neuron*, **77**, 655–666.

Mombaerts, P. (2006) Axonal Wiring in the Mouse Olfactory System. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **22**, 713–737.

Morgan Josh & Wong Rachel (n.d.) Development of cell types and Synaptic connections in the retina. *The Organization of the Retina and Visual System*,.

Mori, K. & Sakano, H. (2011) How Is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain? *Annual Review of Neuroscience*, **34**, 467–499.

Morin, L.P. (2013) Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental Neurology*, **243**, 4–20.

Morin, L.P. & Studholme, K.M. (2014) Retinofugal projections in the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, **522**, 3733–3753.

Movassagh, H., Khadem, F., & Gounni, A.S. (2018) Semaphorins and their roles in airway biology: Potential as therapeutic targets. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*,.

Muir-Robinson, G., Hwang, B.J., & Feller, M.B. (2002) Retinogeniculate axons undergo eye-specific segregation in the absence of eye-specific layers. *The Journal of Neuroscience*, **22**, 5259–5264.

Mumblat, Y., Kessler, O., Ilan, N., & Neufeld, G. (2015) Full-Length Semaphorin-3C Is an Inhibitor of Tumor Lymphangiogenesis and Metastasis. *Cancer research*, **75**, 2177–2186.

Münch, M. & Kawasaki, A. (2013) Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Current Opinion in Neurology*, **26**, 45–51.

Murphy, G.J. & Rieke, F. (2006) Network Variability Limits Stimulus-Evoked Spike Timing Precision in Retinal Ganglion Cells. *Neuron*, **52**, 511–524.

Nawabi, H., Briancon-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 & Development*, **24**, 396–410.

Neufeld, G. & Kessler, O. (2008) The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer*, **8**, 632–645.

Neufeld, G., Sabag, A.D., Rabinovicz, N., & Kessler, O. (2012) Semaphorins in Angiogenesis and Tumor Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2**, a006718–a006718.

Niclou, S.P., Jia, L., & Raper, J.A. (2000) Slit2 is a repellent for retinal ganglion cell axons. *The Journal of Neuroscience*, **20**, 4962–4974.

Nicol, X., Voyatzis, S., Muzerelle, A., Narboux-Nême, N., Südhof, T.C., Miles, R., & Gaspar, P. (2007) cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. *Nature neuroscience*, **10**, 340–347.

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

Nogi, T., Yasui, N., Mihara, E., Matsunaga, Y., Noda, M., Yamashita, N., Toyofuku, T., Uchiyama, S., Goshima, Y., Kumanogoh, A., & Takagi, J. (2010) Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor. *Nature*, **467**, 1123–1127.

Northmore, D.P., Levine, E.S., & Schneider, G.E. (1988) Behavior evoked by electrical stimulation of the hamster superior colliculus. *Experimental brain research*, **73**, 595–605.

Ogata-Iwao, M., Inatani, M., Iwao, K., Takihara, Y., Nakaishi-Fukuchi, Y., Irie, F., Sato, S., Furukawa, T., Yamaguchi, Y., & Tanihara, H. (2011) Heparan Sulfate Regulates Intraretinal Axon Pathfinding by Retinal Ganglion Cells. *Investigative Opthalmology & Visual Science*, **52**, 6671.

Oh, W.-J. & Gu, C. (2013) The role and mechanism-of-action of Sema3E and Plexin-D1 in vascular and neural development. *Seminars in cell & developmental biology*, **24**, 156–162.

Oinuma, I., Katoh, H., & Negishi, M. (2004) Molecular dissection of the semaphorin 4D receptor plexin-B1-stimulated R-Ras GTPase-activating protein activity and neurite remodeling in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, **24**, 11473–11480.

Oinuma, I., Katoh, H., & Negishi, M. (2006) Semaphorin 4D/Plexin-B1–mediated R-Ras GAP activity inhibits cell migration by regulating β_1 integrin activity. *The Journal of Cell Biology*, **173**, 601–613.

Oster, S.F., Bodeker, M.O., He, F., & Sretavan, D.W. (2003) Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development. *Development*, **130**, 775–784.

Osterhout, J.A., El-Danaf, R.N., Nguyen, P.L., & Huberman, A.D. (2014) Birthdate and outgrowth timing predict cellular mechanisms of axon target matching in the developing visual pathway. *Cell Reports*, **8**, 1006–1017.

Osterhout, J.A., Josten, N., Yamada, J., Pan, F., Wu, S., Nguyen, P.L., Panagiotakos, G., Inoue, Y.U., Egusa, S.F., Volgyi, B., Inoue, T., Bloomfield, S.A., Barres, B.A., Berson, D.M., Feldheim, D.A., & Huberman, A.D. (2011) Cadherin-6 Mediates Axon-Target Matching in a Non-Image-Forming Visual Circuit. *Neuron*, **71**, 632–639.

Osterhout, J.A., Stafford, B.K., Nguyen, P.L., Yoshihara, Y., & Huberman, A.D. (2015) Contactin-4 mediates axon-target specificity and functional development of the accessory optic system. *Neuron*, **86**, 985–999.

Pak, W., Hindges, R., Lim, Y.-S., Pfaff, S.L., & O'Leary, D.D.M. (2004) Magnitude of Binocular Vision Controlled by Islet-2 Repression of a Genetic Program that Specifies Laterality of Retinal Axon Pathfinding. *Cell*, **119**, 567–578.

Pan, H. & Bachelder, R.E. (2010) Autocrine Semaphorin3A stimulates eukaryotic initiation factor 4E-dependent RhoA translation in breast tumor cells. *Experimental Cell Research*, **316**, 2825–2832.

Pan, H., Wanami, L.S., Dissanayake, T.R., & Bachelder, R.E. (2009) Autocrine semaphorin3A stimulates alpha2 beta1 integrin expression/function in breast tumor cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, **118**, 197–205.

Panza, P., Sitko, A.A., Maischein, H.M., Koch, I., Flötenmeyer, M., Wright, G.J., Mandai, K., Mason, C.A., & Söllner, C. (2015) The LRR receptor Islr2 is required for retinal axon routing at the vertebrate optic chiasm. *Neural Development*, **10**, 23.

Parnavelas, J.G., Mounty, E.J., Bradford, R., & Lieberman, A.R. (1977) The postnatal development of neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat: A Golgi study. *The Journal of Comparative Neurology*, **171**, 481–499.

Parra, L.M. & Zou, Y. (2010) Sonic hedgehog induces response of commissural axons to Semaphorin repulsion during midline crossing. *Nature Neuroscience*, **13**, 29–35.

Pasterkamp, R.J. (2005) R-Ras fills another GAP in semaphorin signalling. *Trends in cell biology*, **15**, 61–64.

Pasterkamp, R.J. (2012) Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nature reviews. Neuroscience*, **13**, 605–618.

Pecho-Vrieseling, E., Sigrist, M., Yoshida, Y., Jessell, T.M., & Arber, S. (2009) Specificity of sensory–motor connections encoded by Sema3e–Plxnd1 recognition. *Nature*, **459**, 842–846.

Perälä, N., Sariola, H., & Immonen, T. (2012) More than nervous: The emerging roles of plexins. *Differentiation*, **83**, 77–91.

Petros, T.J., Rebsam, A., & Mason, C.A. (2008) Retinal Axon Growth at the Optic Chiasm: To Cross or Not to Cross. *Annual Review of Neuroscience*, **31**, 295–315.

Pfeiffenberger, C., Yamada, J., & Feldheim, D.A. (2006) Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 12873–12884.

Piper, M., Anderson, R., Dwivedy, A., Weinl, C., van Horck, F., Leung, K.M., Cogill, E., & Holt, C. (2006) Signaling Mechanisms Underlying Slit2-Induced Collapse of Xenopus Retinal Growth Cones. *Neuron*, **49**, 215–228.

Piscopo, D.M., El-Danaf, R.N., Huberman, A.D., & Niell, C.M. (2013) Diverse Visual Features Encoded in Mouse Lateral Geniculate Nucleus. *Journal of Neuroscience*, **33**, 4642–4656.

Pittman, A.J., Law, M.-Y., & Chien, C.-B. (2008) Pathfinding in a large vertebrate axon tract: isotypic interactions guide retinotectal axons at multiple choice points. *Development*, **135**, 2865–2871.

Plachez, C., Andrews, W., Liapi, A., Knoell, B., Drescher, U., Mankoo, B., Zhe, L., Mambetisaeva, E., Annan, A., Bannister, L., Parnavelas, J.G., Richards, L.J., & Sundaresan, V. (2008) Robos are required for the correct targeting of retinal ganglion cell axons in the visual pathway of the brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **37**, 719–730.

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

Polleux, F., Morrow, T., & Ghosh, A. (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature*, **404**, 567–573.

Prieur, D.S. & Rebsam, A. (2017) Retinal axon guidance at the midline: Chiasmatic misrouting and consequences. *Developmental Neurobiology*,.

Püschel, A.W. (2007) GTPases in semaphorin signaling. *Advances in experimental medicine and biology*, **600**, 12–23.

Quina, L.A., Pak, W., Lanier, J., Banwait, P., Gratwick, K., Liu, Y., Velasquez, T., O'Leary, D.D.M., Goulding, M., & Turner, E.E. (2005) Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 11595–11604.

Rafols, J.A. & Valverde, F. (1973) The structure of the dorsal lateral geniculate nucleus in the mouse. A Golgi and electron microscopic study. *The Journal of comparative neurology*, **150**, 303–332.

Rakic, P. (1976) Prenatal genesis of connections subserving ocular dominance in the rhesus monkey. *Nature*, **261**, 467–471.

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

Reese, B. (2008) Mosaics, tiling and coverage by retinal neurons. In Masland, R.H. & Albright, T. (eds), *The Senses: Vision*, Elsevier. edn. Oxford, pp. 436–56.

Reese, B.E. (1988) “Hidden lamination” in the dorsal lateral geniculate nucleus: the functional organization of this thalamic region in the rat. *Brain research*, **472**, 119–137.

Reidy, K. & Tufro, A. (2011) Semaphorins in kidney development and disease: modulators of ureteric bud branching, vascular morphogenesis, and podocyte-endothelial crosstalk. *Pediatric Nephrology*, **26**, 1407–1412.

Renaud, J., Kerjan, G., Sumita, I., Zagar, Y., Georget, V., Kim, D., Fouquet, C., Suda, K., Sanbo, M., Suto, F., Ackerman, S.L., Mitchell, K.J., Fujisawa, H., & Chédotal, A. (2008) Plexin-A2 and its ligand, Sema6A, control nucleus-centrosome coupling in migrating granule cells. *Nature Neuroscience*, **11**, 440–449.

Rheaume, B.A., Jereen, A., Bolisetty, M., Sajid, M.S., Yang, Y., Renna, K., Sun, L., Robson, P., & Trakhtenberg, E.F. (2018) Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes. *Nature Communications*, **9**.

Ringstedt, T., Braisted, J., Brose, K., Kidd, T., Goodman, C., Tessier-Lavigne, M., & O’Leary, D. (2000) Slit inhibition of retinal axon growth and its role in retinal axon pathfinding and innervation patterns in the diencephalon. *The Journal of Neuroscience*, **20**, 4983–4991.

Rivlin-Etzion, M., Zhou, K., Wei, W., Elstrott, J., Nguyen, P.L., Barres, B.A., Huberman, A.D., & Feller, M.B. (2011) Transgenic Mice Reveal Unexpected Diversity of On-Off Direction-Selective Retinal Ganglion Cell Subtypes and Brain Structures Involved in Motion Processing. *Journal of Neuroscience*, **31**, 8760–8769.

Rockhill, R.L., Euler, T., & Masland, R.H. (2000) Spatial order within but not between types of retinal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 2303–2307.

Rodriguez, A.R., de Sevilla Müller, L.P., & Brecha, N.C. (2014) The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *The Journal of comparative neurology*, **522**, 1411–1443.

Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M., & Püschel, A.W. (2000) Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mechanisms of development*, **93**, 95–104.

Roney, K., Holl, E., & Ting, J. (2013) Immune plexins and semaphorins: old proteins, new immune functions. *Protein & cell*, **4**, 17–26.

Roska, B. & Meister, M. (2014) The retina dissects the visual scene into distinct features. *MIT Press Cambridge*,.

Rossi, F.M., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Marubio, L.M., Maffei, L., & Changeux, J.-P. (2001) Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 6453–6458.

Ruhrberg, C. & Schwarz, Q. (2010) In the beginning : Generating neural crest cell diversity. *Cell Adhesion & Migration*, **4**, 622–630.

Rünker, A.E., Little, G.E., Suto, F., Fujisawa, H., & Mitchell, K.J. (2008) Semaphorin-6A controls guidance of corticospinal tract axons at multiple choice points. *Neural development*, **3**, 34.

Sabag, A.D., Smolkin, T., Mumblat, Y., Ueffing, M., Kessler, O., Gloeckner, C.J., & Neufeld, G. (2014) The role of the plexin-A2 receptor in Sema3A and Sema3B signal transduction. *Journal of cell science*, **127**, 5240–5252.

Sahibzada, N., Dean, P., & Redgrave, P. (1986) Movements resembling orientation or avoidance elicited by electrical stimulation of the superior colliculus in rats. *Journal of Neuroscience*, **6**, 723–733.

Sakurai, A., Gavard, J., Annas-Linhares, Y., Basile, J.R., Amornphimoltham, P., Palmby, T.R., Yagi, H., Zhang, F., Randazzo, P.A., Li, X., Weigert, R., & Gutkind, J.S. (2010) Semaphorin 3E Initiates Antiangiogenic Signaling through Plexin D1 by Regulating Arf6 and R-Ras. *Molecular and Cellular Biology*, **30**, 3086–3098.

Sánchez-Camacho, C. & Bovolenta, P. (2008) Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development (Cambridge, England)*, **135**, 3531–3541.

Sanes, J.R. & Masland, R.H. (2015) The Types of Retinal Ganglion Cells: Current Status and Implications for Neuronal Classification.

Sanes, J.R. & Zipursky, S.L. (2010) Design Principles of Insect and Vertebrate Visual Systems. *Neuron*, **66**, 15–36.

Santiago Rompani, A.B., M, F.E., Wanner, A., Zhang, C., Roth, C.N., Yonehara, K., & Roska Correspondence, B. (2017) Different Modes of Visual Integration in the Lateral Geniculate Nucleus Revealed by Single-Cell-Initiated Transsynaptic Tracing. *Neuron*, **93**, 767–776.

Schmidt, T.M., Alam, N.M., Chen, S., Kofuji, P., Li, W., Prusky, G.T., & Hattar, S. (2014) A Role for Melanopsin in Alpha Retinal Ganglion Cells and Contrast Detection. *Neuron*, **82**, 781–788.

Schmidt, T.M., Do, M.T.H., Dacey, D., Lucas, R., Hattar, S., & Matynia, A. (2011) Melanopsin-Positive Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: From Form to Function. *Journal of Neuroscience*, **31**, 16094–16101.

Schmitt, A.M., Shi, J., Wolf, A.M., Lu, C.-C., King, L.A., & Zou, Y. (2006) Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature*, **439**, 31–37.

Schwarz, Q., Waimey, K.E., Golding, M., Takamatsu, H., Kumanogoh, A., Fujisawa, H., Cheng, H.-J., & Ruhrberg, C. (2008) Plexin A3 and plexin A4 convey semaphorin signals during facial nerve development. *Developmental Biology*, **324**, 1–9.

Seabrook, T.A., Krahe, T.E., Govindaiah, G., & Guido, W. (2013) Interneurons in the mouse visual thalamus maintain a high degree of retinal convergence throughout postnatal development. *Neural Development*, **8**, 24.

Semaphorin Nomenclature Committee (1999) Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell*, **97**, 551–552.

Shelly, M., Cancedda, L., Lim, B.K., Popescu, A.T., Cheng, P., Gao, H., & Poo, M. (2011) Semaphorin3A Regulates Neuronal Polarization by Suppressing Axon Formation and Promoting Dendrite Growth. *Neuron*, **71**, 433–446.

Shigeoka, T., Jung, H., Jung, J., Turner-Bridger, B., Ohk, J., Lin, J.Q., Amieux, P.S., & Holt, C.E. (2016) Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits. *Cell*, **166**, 181–192.

Siebold, C. & Jones, E.Y. (2013) Structural insights into semaphorins and their receptors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **24**, 139–145.

Sierra, J.R., Corso, S., Caione, L., Cepero, V., Conrotto, P., Cignetti, A., Piacibello, W., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Comoglio, P.M., Tamagnone, L., & Giordano, S. (2008) Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *The Journal of experimental medicine*, **205**, 1673–1685.

Simpson, J.I. (1984) The Accessory Optic System. *Annual Review of Neuroscience*, **7**, 13–41.

Soares, C.A. & Mason, C.A. (2015) Transient ipsilateral retinal ganglion cell projections to the brain: Extent, targeting, and disappearance. *Developmental neurobiology*,.

Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., & Klagsbrun, M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, **92**, 735–745.

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

Sparks, D.L. (2002) The brainstem control of saccadic eye movements. *Nature Reviews Neuroscience*, **3**, 952–964.

Squadrito, M.L. & De Palma, M. (2011) Macrophage regulation of tumor angiogenesis: Implications for cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine*, **32**, 123–145.

Sretavan, D.W. & Kruger, K. (1998) Randomized retinal ganglion cell axon routing at the optic chiasm of GAP-43-deficient mice: association with midline recrossing and lack of normal ipsilateral axon turning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **18**, 10502–10513.

Sretavan, D.W., Puré, E., Siegel, M.W., & Reichardt, L.F. (1995) Disruption of retinal axon ingrowth by ablation of embryonic mouse optic chiasm neurons. *Science (New York, N.Y.)*, **269**, 98–101.

Stanford, L.R., Friedlander, M.J., & Sherman, S.M. (1981) Morphology of physiologically identified W-cells in the C laminae of the cat's lateral geniculate nucleus. *The Journal of Neuroscience*, **1**, 578–584.

Stanford, L.R., Friedlander, M.J., & Sherman, S.M. (1983) Morphological and physiological properties of geniculate W-cells of the cat: a comparison with X- and Y-cells. *Journal of Neurophysiology*, **50**, 582–608.

Su, J., Haner, C. V., Imbery, T.E., Brooks, J.M., Morhardt, D.R., Gorse, K., Guido, W., & Fox, M.A. (2011) Reelin Is Required for Class-Specific Retinogeniculate Targeting. *Journal of Neuroscience*, **31**, 575–586.

Suetterlin, P. & Drescher, U. (2014) Target-independent ephrina/EphA-mediated axon-axon repulsion as a novel element in retinocollicular mapping. *Neuron*, **84**, 740–752.

Sulpice, E., Plouët, J., Bergé, M., Allanic, D., Tobelem, G., & Merkulova-Rainon, T. (2008) Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood*, **111**, 2036–2045.

Sun, C., Speer, C.M., Wang, G.-Y., Chapman, B., & Chalupa, L.M. (2008) Epibatidine Application In Vitro Blocks Retinal Waves Without Silencing All Retinal Ganglion Cell Action Potentials in Developing Retina of the Mouse and Ferret. *Journal of Neurophysiology*, **100**, 3253–3263.

Sun, C., Warland, D.K., Ballesteros, J.M., van der List, D., & Chalupa, L.M. (2008) Retinal waves in mice lacking the 2 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 13638–13643.

Sun, L.O., Brady, C.M., Cahill, H., Al-Khindi, T., Sakuta, H., Dhande, O.S., Noda, M., Huberman, A.D., Nathans, J., & Kolodkin, A.L. (2015) Functional Assembly of Accessory Optic System Circuitry Critical for Compensatory Eye Movements. *Neuron*, **86**, 971–984.

Sun, L.O., Jiang, Z., Rivlin-Etzion, M., Hand, R., Brady, C.M., Matsuoka, R.L., Yau, K.-W., Feller, M.B., & Kolodkin, A.L. (2013) On and off retinal circuit assembly by divergent molecular mechanisms. *Science*, **342**, 1241974.

Suto, F., Ito, K., Uemura, M., Shimizu, M., Shinkawa, Y., Sanbo, M., Shinoda, T., Tsuboi, M., Takashima, S., Yagi, T., & Fujisawa, H. (2005) Plexin-A4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 3628–3637.

Suto, F., Tsuboi, M., Kamiya, H., Mizuno, H., Kiyama, Y., Komai, S., Shimizu, M., Sanbo, M., Yagi, T., Hiromi, Y., Chédotal, A., Mitchell, K.J., Manabe, T., & Fujisawa, H. (2007) Interactions between Plexin-A2, Plexin-A4, and Semaphorin 6A Control Lamina-Restricted Projection of Hippocampal Mossy Fibers. *Neuron*, **53**, 535–547.

Suzuki, K., Kumanogoh, A., & Kikutani, H. (2008) Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nature Immunology*, **9**, 17–23.

Suzuki, K., Okuno, T., Yamamoto, M., Pasterkamp, R.J., Takegahara, N., Takamatsu, H., Kitao, T., Takagi, J., Rennert, P.D., Kolodkin, A.L., Kumanogoh, A., & Kikutani, H. (2007) Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through α1β1 integrin. *Nature*, **446**, 680–684.

Svensson, A., Libelius, R., & Tågerud, S. (2008) Semaphorin 6C expression in innervated and denervated skeletal muscle. *Journal of Molecular Histology*, **39**, 5–13.

Sweeney, L.B., Chou, Y.-H., Wu, Z., Joo, W., Komiyama, T., Potter, C.J., Kolodkin, A.L., Garcia, K.C., & Luo, L. (2011) Secreted Semaphorins from Degenerating Larval ORN Axons Direct Adult Projection Neuron Dendrite Targeting. *Neuron*, **72**, 734–747.

Sweeney, N.T., James, K.N., Nistorica, A., Lorig-Roach, R.M., & Feldheim, D.A. (2017) Expression of transcription factors divides retinal ganglion cells into distinct classes. *Journal of Comparative Neurology*,.

Sweeney, N.T., Tierney, H., & Feldheim, D.A. (2014) Tbr2 is required to generate a neural circuit mediating the pupillary light reflex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **34**, 5447–5453.

Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb, R.G., Fujisawa, H., & Strittmatter, S.M. (1999) Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell*, **99**, 59–69.

Takahashi, T. & Strittmatter, S.M. (2001) Plexina1 autoinhibition by the plexin sema domain. *Neuron*, **29**, 429–439.

Takamatsu, H. & Kumanogoh, A. (2012) Diverse roles for semaphorin−plexin signaling in the immune system. *Trends in Immunology*, **33**, 127–135.

Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D.V.R., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., & Kikutani, H. (2006) Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nature Cell Biology*, **8**, 615–622.

Takeuchi, H., Inokuchi, K., Aoki, M., Suto, F., Tsuboi, A., Matsuda, I., Suzuki, M., Aiba, A., Serizawa, S., Yoshihara, Y., Fujisawa, H., & Sakano, H. (2010) Sequential Arrival and Graded Secretion of Sema3F by Olfactory Neuron Axons Specify Map Topography at the Bulb. *Cell*, **141**, 1056–1067.

Tamagnone, L. (2012) Emerging Role of Semaphorins as Major Regulatory Signals and Potential Therapeutic Targets in Cancer. *Cancer Cell*, **22**, 145–152.

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

Tamagnone, L. & Mazzone, M. (2011) Semaphorin Signals on the Road of Endothelial Tip Cells. *Developmental Cell*, **21**, 189–190.

Tang, J., Landmesser, L., & Rutishauser, U. (1992) Polysialic acid influences specific pathfinding by avian motoneurons. *Neuron*, **8**, 1031–1044.

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

Taniguchi, M. & Shimizu, T. (2004) Characterization of a novel member of murine semaphorin family. *Biochemical and biophysical research communications*, **314**, 242–248.

Tawarayama, H., Yoshida, Y., Suto, F., Mitchell, K.J., & Fujisawa, H. (2010) Roles of Semaphorin-6B and Plexin-A2 in Lamina-Restricted Projection of Hippocampal Mossy Fibers. *Journal of Neuroscience*, **30**, 7049–7060.

Thacker, B.E., Seamen, E., Lawrence, R., Parker, M.W., Xu, Y., Liu, J., Vander Kooi, C.W., & Esko, J.D. (2016) Expanding the 3- *O* -Sulfate Proteome—Enhanced Binding of Neuropilin-1 to 3- *O* -Sulfated Heparan Sulfate Modulates Its Activity. *ACS Chemical Biology*, **11**, 971–980.

Thompson, H., Andrews, W., Parnavelas, J.G., & Erskine, L. (2009) Robo2 is required for Slit-mediated intraretinal axon guidance. *Developmental biology*, **335**, 418–426.

Thompson, H., Barker, D., Camand, O., & Erskine, L. (2006) Slits contribute to the guidance of retinal ganglion cell axons in the mammalian optic tract. *Developmental Biology*, **296**, 476–484.

Thompson, H., Camand, O., Barker, D., & Erskine, L. (2006) Slit Proteins Regulate Distinct Aspects of Retinal Ganglion Cell Axon Guidance within Dorsal and Ventral Retina. *Journal of Neuroscience*, **26**, 8082–8091.

Tillo, M., Erskine, L., Cariboni, A., Fantin, A., Joyce, A., Denti, L., & Ruhrberg, C. (2015) VEGF189 binds NRP1 and is sufficient for VEGF/NRP1-dependent neuronal patterning in the developing brain. *Development*, **142**, 314–319.

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

Tomizawa, Y., Sekido, Y., Kondo, M., Gao, B., Yokota, J., Roche, J., Drabkin, H., Lerman, M.I., Gazdar, A.F., & Minna, J.D. (2001) Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 13954–13959.

Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Hori, M., & Kikutani, H. (2005) FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nature neuroscience*, **8**, 1712–1719.

Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Suto, F., Kamei, J., Aoki, K., Yabuki, M., Hori, M., Fujisawa, H., & Kikutani, H. (2004) Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes & Development*, **18**, 435–447.

Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Yabuki, M., Harada, K., Hori, M., & Kikutani, H. (2004) Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Sema6D reverse signalling. *Nature cell biology*, **6**, 1204–1211.

Tran, T.S., Kolodkin, A.L., & Bharadwaj, R. (2007) Semaphorin Regulation of Cellular Morphology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **23**, 263–292.

Tran, T.S., Rubio, M.E., Clem, R.L., Johnson, D., Case, L., Tessier-Lavigne, M., Huganir, R.L., Ginty, D.D., & Kolodkin, A.L. (2009) Secreted semaphorins control spine distribution and morphogenesis in the postnatal CNS. *Nature*,.

Trejo, L.J. & Cicerone, C.M. (1984) Cells in the pretectal olivary nucleus are in the pathway for the direct light reflex of the pupil in the rat. *Brain research*, **300**, 49–62.

Triplett, J.W. (2014) Molecular guidance of retinotopic map development in the midbrain. *Current Opinion in Neurobiology*, **24**, 7–12.

Triplett, J.W., Wei, W., Gonzalez, C., Sweeney, N.T., Huberman, A.D., Feller, M.B., & Feldheim, D.A. (2014) Dendritic and axonal targeting patterns of a genetically-specified class of retinal ganglion cells that participate in image-forming circuits. *Neural Development*, **9**, 2.

Upton, A.L., Salichon, N., Lebrand, C., Ravary, A., Blakely, R., Seif, I., & Gaspar, P. (1999) Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ispilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **19**, 7007–7024.

Usrey, W.M. & Alitto, H.J. (2015) Visual Functions of the Thalamus. *Annual Review of Vision Science*, **1**, 351–371.

Vermeren, M., Maro, G.S., Bron, R., McGonnell, I.M., Charnay, P., Topilko, P., & Cohen, J. (2003) Integrity of developing spinal motor columns is regulated by neural crest derivatives at motor exit points. *Neuron*, **37**, 403–415.

Wang, L., Klein, R., Zheng, B., & Marquardt, T. (2011) Anatomical Coupling of Sensory and Motor Nerve Trajectory via Axon Tracking. *Neuron*, **71**, 263–277.

Wang, L., Rangarajan, K. V., Lawhn-Heath, C.A., Sarnaik, R., Wang, B.-S., Liu, X., & Cang, J. (2009) Direction-Specific Disruption of Subcortical Visual Behavior and Receptive Fields in Mice Lacking the 2 Subunit of Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Journal of Neuroscience*, **29**, 12909–12918.

Wang, L., Sarnaik, R., Rangarajan, K., Liu, X., & Cang, J. (2010) Visual Receptive Field Properties of Neurons in the Superficial Superior Colliculus of the Mouse. *Journal of Neuroscience*, **30**, 16573–16584.

Wang, Q., Marcucci, F., Cerullo, I., & Mason, C. (2016) Ipsilateral and Contralateral Retinal Ganglion Cells Express Distinct Genes during Decussation at the Optic Chiasm. *eNeuro*,.

Wang, Y., He, H., Srivastava, N., Vikarunnessa, S., Chen, Y. -b., Jiang, J., Cowan, C.W., & Zhang, X. (2012) Plexins Are GTPase-Activating Proteins for Rap and Are Activated by Induced Dimerization. *Science Signaling*, **5**, ra6-ra6.

Wässle, H. (2004) Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience*, **5**, 747–757.

Wässle, H. & Riemann, H.J. (1978) The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **200**, 441–461.

Weiner, J.A., Koo, S.J., Nicolas, S., Fraboulet, S., Pfaff, S.L., Pourquié, O., & Sanes, J.R. (2004) Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **27**, 59–69.

Welsh, D.K., Takahashi, J.S., & Kay, S.A. (2010) Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annual Review of Physiology*, **72**, 551–577.

Weng, S., Sun, W., & He, S. (2005) Identification of ON-OFF direction-selective ganglion cells in the mouse retina. *The Journal of Physiology*, **562**, 915–923.

Westby, G.W., Keay, K.A., Redgrave, P., Dean, P., & Bannister, M. (1990) Output pathways from the rat superior colliculus mediating approach and avoidance have different sensory properties. *Experimental brain research*, **81**, 626–638.

Williams, S.E., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D.J., Gale, N.W., Holt, C.E., Mason, C.A., & Henkemeyer, M. (2003) Ephrin-B2 and EphB1 Mediate Retinal Axon Divergence at the Optic Chiasm. *Neuron*, **39**, 919–935.

Worzfeld, T., Swiercz, J.M., Sentürk, A., Genz, B., Korostylev, A., Deng, S., Xia, J., Hoshino, M., Epstein, J.A., Chan, A.M., Vollmar, B., Acker-Palmer, A., Kuner, R., & Offermanns, S. (2014) Genetic dissection of plexin signaling in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 2194–2199.

Wright, K.M., Lyon, K.A., Leung, H., Leahy, D.J., Ma, L., & Ginty, D.D. (2012) Dystroglycan Organizes Axon Guidance Cue Localization and Axonal Pathfinding. *Neuron*, **76**, 931–944.

Wu, Z., Sweeney, L.B., Ayoob, J.C., Chak, K., Andreone, B.J., Ohyama, T., Kerr, R., Luo, L., Zlatic, M., & Kolodkin, A.L. (2011) A combinatorial semaphorin code instructs the initial steps of sensory circuit assembly in the Drosophila CNS. *Neuron*, **70**, 281–298.

Xiang, M., Zhou, L., Macke, J.P., Yoshioka, T., Hendry, S.H.C., Eddy, R.L., Shows, T.B., & Nathans, J. (1995) The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci*, **15**, 4762–4785.

Xiang, R., Davalos, A.R., Hensel, C.H., Zhou, X.-J., Tse, C., & Naylor, S.L. (2002) Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer research*, **62**, 2637–2643.

Xu, Y., Yuan, L., Mak, J., Pardanaud, L., Caunt, M., Kasman, I., Larrivée, B., del Toro, R., Suchting, S., Medvinsky, A., Silva, J., Yang, J., Thomas, J.-L., Koch, A.W., Alitalo, K., Eichmann, A., & Bagri, A. (2010) Neuropilin-2 mediates VEGF-C–induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *The Journal of Cell Biology*, **188**, 115–130.

Yang, T. & Terman, J.R. (2012) 14-3-3ε Couples Protein Kinase A to Semaphorin Signaling and Silences Plexin RasGAP-Mediated Axonal Repulsion. *Neuron*, **74**, 108–121.

Yaron, A., Huang, P.-H., Cheng, H.-J., & Tessier-Lavigne, M. (2005) Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins. *Neuron*, **45**, 513–523.

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

Yonehara, K., Ishikane, H., Sakuta, H., Shintani, T., Nakamura-Yonehara, K., Kamiji, N.L., Usui, S., & Noda, M. (2009) Identification of retinal ganglion cells and their projections involved in central transmission of information about upward and downward image motion. *PloS one*, **4**, e4320.

Yonehara, K., Shintani, T., Suzuki, R., Sakuta, H., Takeuchi, Y., Nakamura-Yonehara, K., & Noda, M. (2008) Expression of SPIG1 reveals development of a retinal ganglion cell subtype projecting to the medial terminal nucleus in the mouse. *PloS one*, **3**, e1533.

Yoshida, Y. (2012) Semaphorin Signaling in Vertebrate Neural Circuit Assembly. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **5**, 71.

Yoshida, Y., Han, B., Mendelsohn, M., & Jessell, T.M. (2006) PlexinA1 Signaling Directs the Segregation of Proprioceptive Sensory Axons in the Developing Spinal Cord. *Neuron*,.

Young, M.J. & Lund, R.D. (1994) The anatomical substrates subserving the pupillary light reflex in rats: origin of the consensual pupillary response. *Neuroscience*, **62**, 481–496.

Yu, L., Zhou, Y., Cheng, S., & Rao, Y. (2010) Plexin a-semaphorin-1a reverse signaling regulates photoreceptor axon guidance in Drosophila. *The Journal of Neuroscience*, **30**, 12151–12156.

Zhang, F., Lu, C., Severin, C., & Sretavan, D.W. (2000) GAP-43 mediates retinal axon interaction with lateral diencephalon cells during optic tract formation. *Development*, **127**, 969–980.

Zhou, L., White, F.A., Lentz, S.I., Wright, D.E., Fisher, D.A., & Snider, W.D. (1997) Cloning and expression of a novel murine semaphorin with structural similarity to insect semaphorin I. *Molecular and cellular neurosciences*, **9**, 26–41.

Zhou, Y., Gunput, R.-A.F., & Pasterkamp, R.J. (2008) Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends in Biochemical Sciences*, **33**, 161–170.

Zhu, Y., Xu, J., Hauswirth, W.W., & DeVries, S.H. (2014) Genetically Targeted Binary Labeling of Retinal Neurons. *Journal of Neuroscience*, **34**, 7845–7861.

Zhuang, B., Su, Y.S., & Sockanathan, S. (2009) FARP1 promotes the dendritic growth of spinal motor neuron subtypes through transmembrane Semaphorin6A and PlexinA4 signaling. *Neuron*, **61**, 359–372.

Zou, Y., Stoeckli, E., Chen, H., & Tessier-Lavigne, M. (2000) Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell*, **102**, 363–375.

ANNEXES

Retinal Axon Guidance at the Midline: Chiasmatic Misrouting and Consequences

Delphine S. Prieur,[1,2,3] Alexandra Rebsam[1,2,3]

[1] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR-S 839, Paris, 75005, France

[2] Université Pierre et Marie Curie, Paris, 75005, France

[3] Institut du Fer à Moulin, Paris, 75005, France

Received 15 June 2016; revised 18 October 2016; accepted 9 November 2016

ABSTRACT: The visual representation of the outside world relies on the appropriate connectivity between the eyes and the brain. Retinal ganglion cells are the sole neurons that send an axon from the retina to the brain, and thus the guidance decisions of retinal axons *en route* to their targets in the brain shape the neural circuitry that forms the basis of vision. Here, we focus on the choice made by retinal axons to cross or avoid the midline at the optic chiasm. This decision allows each brain hemisphere to receive inputs from both eyes corresponding to the same visual hemifield, and is thus crucial for binocular vision. In achiasmatic conditions, all retinal axons from one eye project to the ipsilateral brain hemisphere. In albinism, abnormal guidance of retinal axons at the optic chiasm leads to a change in the ratio of contralateral and ipsilateral projections with the consequence that each brain hemisphere receives inputs primarily from the contralateral eye instead of an almost equal distribution from both eyes in humans. In both cases, this misrouting of retinal axons leads to reduced visual acuity and poor depth perception. While this defect has been known for decades, mouse genetics have led to a better understanding of the molecular mechanisms at play in retinal axon guidance and at the origin of the guidance defect in albinism. In addition, fMRI studies on humans have now confirmed the anatomical and functional consequences of axonal misrouting at the chiasm that were previously only assumed from animal models.

© 2016 Wiley Periodicals, Inc. Develop Neurobiol 77: 844–860, 2017

Keywords: **achiasma; albinism; retina; optic chiasm; nystagmus**

INTRODUCTION TO THE BINOCULAR VISUAL SYSTEM

Visual information is conveyed in the eye from photoreceptors that perceive light changes, through bipolar and other interneurons, and finally to the retinal ganglion cells (RGCs). As RGCs are the only neurons in the retina that project to the brain, the correct connectivity of their axons is crucial for proper vision and all visually-driven behaviors. Retinal axons exit the retina through the optic disk and gather to form the optic nerve. They defasciculate as they reach a major decision point: the optic chiasm. Here, each retinal axon chooses to cross or avoid the midline to innervate one of the two brain hemispheres (Petros et al., 2008; Erskine and Herrera, 2014) (Fig. 1). Ipsilateral RGC axons do not cross the midline and project to the brain hemisphere on the same side, and contralateral RGC axons cross the midline and project to the opposite brain hemisphere. After the optic chiasm, retinal axons from each eye regroup in the optic tract before projecting to their numerous targets in the thalamus and brainstem (Morin and

Correspondence to: A. Rebsam (alexandra.rebsam@inserm.fr).
Contract grant sponsor: ANR #ANR-12-BSV4-0002, the French Albinism Association Genespoir and the Fondation NRJ.
© 2017 Wiley Periodicals, Inc.
Published online 1 December 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI 10.1002/dneu.22473

Studholme, 2014), depending on their RGC subtypes (Dhande et al., 2015). Different classes of RGCs have been described and characterized using morphological, functional and/or molecular criteria (Sanes and Masland, 2015) and their associated networks and functions have begun to be deciphered (Dhande et al., 2015). The guidance mechanisms that lead to the innervation of specific nuclei by subclasses of RGCs have recently been characterized (Osterhout et al., 2011; Su et al., 2011; Osterhout et al., 2014, 2015; Sun et al., 2015) and will continue to be a challenge for the future. In this review, we will not distinguish subclasses of RGCs except for their guidance at the optic chiasm to ipsilateral and contralateral targets, and we will focus on the brain targets that receive the majority of retinal inputs and are the best characterized during development.

The superior colliculus (SC) (also called optic tectum in non-mammalian species) is important for non-image forming visual processing, especially for the control of head, eyes and arms (in primates) to specific locations in visual space. The lateral geniculate nucleus (LGN) is required for image-forming visual processing as it relays visual information to the visual cortex. In both targets, retinal axons organize in a topographic manner and ipsilateral and contralateral axons innervate distinct regions (Fig. 2). Retinotopic organization is necessary for a coherent representation of the external world. The segregation into eye-specific territories and the proper organization of ipsilateral and contralateral axons in the LGN is essential for binocular vision. Initially, both maps are not properly organized, with ipsilateral and contralateral territories overlapping (Godement et al., 1984) and retinal axons overshooting their final topographic zone (Simon and O'Leary, 1992). The eye-specific and topographic maps are refined during development through activity dependent and independent mechanisms (Huberman et al., 2008; Assali et al., 2014). Here, we will focus on the image-forming visual pathway and thus on the organization of projections to the LGN. Visual information is further transmitted to the visual cortex via geniculocortical axons that are organized in certain mammals (cats and primates) into alternating stripes of preferential response to one eye, called ocular dominance columns (Hubel and Wiesel, 1962, 1969). The ocular dominance columns are also organized topographically so that visual information coming from each eye corresponding to the same region of the visual hemifield are next to one other. The integration of this dual visual information corresponding to the same region of the binocular visual field results in depth perception and 3D vision (Fig. 3).

EVOLUTION AND DEVELOPMENT OF THE IPSILATERAL PROJECTION

The proportion of ipsilateral/contralateral axons has changed during evolution, correlating with the position of the eyes (lateral vs. frontal) and the degree of binocularity. Thus, birds and fishes, which have mostly a panoramic vision with laterally placed eyes, have only crossed projections with all retinal axons projecting to the contralateral side. In contrast, all mammals have at least some retinal axons that do not cross the midline and project ipsilaterally. The degree of binocularity is correlated with the ratio of ipsilateral to contralateral projections. In humans, the wide binocular visual field (120°) due to frontally located eyes, is correlated with a 40% ipsilateral projection while in mice, the smaller binocular visual field (30°) due to laterally positioned eyes, is correlated with a 3%–5% ipsilateral projection. In all species with an ipsilateral projection, ipsilaterally projecting RGCs are located in the temporal retina, corresponding anatomically to the region receiving inputs from the binocular visual hemifield. In mice, these ipsilateral RGCs are located in the ventro-temporal (VT) quadrant of the retina while the contralateral RGCs are distributed throughout the retina (Drager and Olsen, 1980). The first retinal axons that reach the chiasm at E12.5 arise from the dorso-central retina and project ipsilaterally (Drager, 1985; Colello and Guillery, 1990). However, they do not approach the midline and turn ipsilaterally before reaching the optic chiasm (Colello and Guillery, 1990; Marcus and Mason, 1995). From E14 to E17, the peak phase of midline guidance, most axons reach the optic chiasm and are guided contralaterally or ipsilaterally. Between E17 and P0, late-born RGCs project mainly to the contralateral side. The extra-VT ipsilateral RGCs observed at early stages (Sretavan, 1990) are progressively eliminated during postnatal development (Godement et al., 1987; Chan and Chung, 1999), and only very few are maintained in the adult (Drager and Olsen, 1980; Lund et al., 1980). Here, we focus on the molecules that affect the peak and late phases of development as little is known about the early dorso-central RGCs that project ipsilaterally and are transient (Soares and Mason, 2015).

DIFFERENTIAL "BEHAVIOR" OF RETINAL AXONS AT THE OPTIC CHIASM

The regionalization of ipsilateral and contralateral RGCs within the retina suggests that this topographic

organization could be maintained in the optic nerve and through the optic chiasm, resulting in VT retinal axons to remain clustered together to project ipsilaterally during the peak phase. However, positional cues in the retina do not seem to be sufficient for axon sorting at the optic chiasm, as ipsilateral and contralateral RGC axons are intermixed once they arrive at the optic chiasm (Colello and Guillery, 1990; Sretavan, 1990). The topographic organization of retinal axons seen at the beginning of the optic nerve is mostly lost as axons approach the optic chiasm (Chan and Chung, 1999) and the glial surrounding is modified: intrafascicular glia in the optic nerve are replaced by radial glia whose endfeet form a substrate for many axons in the optic chiasm (Colello and Guillery, 1992). Interestingly, retinal axons are organized in the optic nerve according to their age, with the youngest axons at the periphery and the oldest ones in the center of the nerve (Colello and Guillery, 1992, 1998), following the idea that new axons follow the lead of pioneer axons at the center. Early ipsilateral axons turn away from the midline before contralateral axons from the other eye reach the optic tract and thus do not rely on interactions with these axons (Marcus and Mason, 1995). However, for later incoming axons, the crossing or avoidance decision at the chiasm could require interactions with the axons from the opposite eye to guide retinal axons toward the optic tract. For ipsilateral axons originating in the VT retina, confounding results were obtained using the same method of embryonic enucleation and retrograde labeling with DiI. In one case, the absence of contralateral axons at the chiasm after enucleation did not change axon routing of the remaining eye (Sretavan and Reichardt, 1993), while in other cases, enucleation results in fewer ipsilateral RGCs retrogradely labeled in the VT retina (Godement et al., 1987; Chan et al., 1999), possibly due to stalling of retinal axons within the chiasm in the absence of axons from the opposite eye (Godement et al., 1990). Although interactions with axons from the opposite eye could facilitate the progression of RGC axons during the guidance decision at the chiasm, retinal growth cones seem to rely on local cues at the optic chiasm for midline guidance as growth cones behave differently as they approach the midline, depending on whether they will later project ipsilaterally or contralaterally. For instance, contralateral fibers go directly toward and cross the optic chiasm midline, while ipsilateral growth cones transform their shape repeatedly, have many more filopodia, bifurcate and are repelled approximately 200 μm before the midline (Godement et al., 1990, 1994) where radial glial cells form a palisade (Marcus and Mason, 1995) (Fig. 1).

The first evidence of discriminating cues expressed by chiasm cells was obtained *in vitro* showing that E14-E15 VT axons avoided clusters of chiasm cells while crossed ones did not. Furthermore, the repulsive cues for ipsilateral axons required cellular interactions among midline cells as individual neurons or glia cells did not elicit differential retinal axon growth (Wang et al., 1995). These experiments suggested that cells in the optic chiasm midline region express cues (secreted or membrane-bound) that are recognized differently by ipsilateral and contralateral axons.

MOLECULAR MECHANISMS FOR AXON GUIDANCE DECISION AT THE OPTIC CHIASM

Molecular Cues for Axon Growth

The existence of growth inhibiting cues on chiasm cells was implicated by live imaging analyses indicating that all growth cones spend more time pausing at the chiasm compared with the optic nerve (Mason and Wang, 1997), and by retina-chiasm co-cultures in which retinal axon growth is inhibited by chiasm explants (Wang et al., 1995, 1996). Retinal axons meet an inverted V-shape array constituted by ventral diencephalon neurons expressing CD44 and L1 (two cell adhesion molecules involved in axonal outgrowth mechanisms) (Sretavan et al., 1994) as well as SSEA-1 (Stage-specific embryonic antigen 1), and follow the pathway bordered by these neurons (Marcus and Mason, 1995). These $CD44^+$/$SSEA\text{-}1^+$ chiasm neurons are required for the guidance decision as their removal induces the stalling of retinal axons at the entry of the predicted chiasm area (Sretavan et al., 1995). The $CD44^+$/$SSEA\text{-}1^+$ chiasm neurons send axons into the lateral diencephalon, at the transition between the chiasm and optic tract, and retinal axons follow these axons (Kruger et al., 1998) (Fig. 1). Both chiasm neurons and retinal axons express GAP-43 (an intracellular protein in the growth cone involved in cytoskeleton remodeling) but only GAP-43 in RGCs is required for proper guidance of retinal axons. In GAP-43 mutant mice, the optic chiasm is expanded, retinal axons are randomly guided in the optic chiasm, and they are not able to form an optic tract due to abnormal interactions with the lateral diencephalon (Kruger et al., 1998; Sretavan and Kruger, 1998; Zhang et al., 2000). Thus, GAP-43 seems to be involved in the exit of retinal axons from the optic chiasm and in optic tract formation rather than in the optic chiasm crossing decision (Fig. 1).

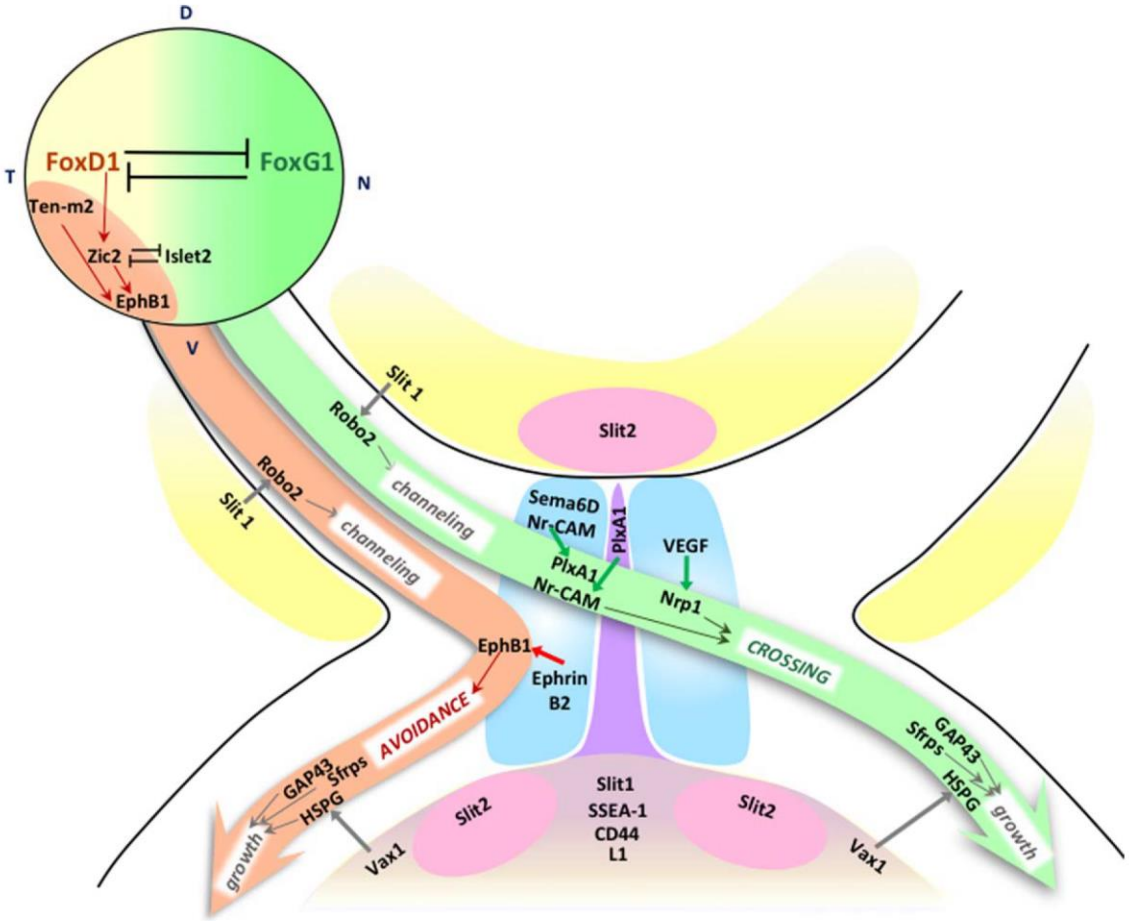


Figure 1 Molecular regulators of retinal axon guidance and growth at the optic chiasm. Retinal axons meet an inverted V-shape array constituted by ventral diencephalon neurons expressing CD44 and L1 as well as SSEA-1, and follow the pathway bordered by these neurons. These neurons express also Slit1, Slit2 and Vax1, which are important for retinal axon guidance and growth. Vax1 binds to a heparan sulfate proteoglycan (HSPG) expressed on retinal axons and is internalized into retinal growth cones where it activates local protein synthesis to promote axonal growth. Robo2 expressed by RGCs recognizes Slit1 and 2 allowing a correct axonal positioning and chiasm formation. GAP-43 and Sfrps in RGCs are also required for proper guidance of retinal axons. At the midline, on one hand, ipsilateral retinal axons that express the receptor EphB1 are repelled by ephrin-B2 expressed on chiasmatic radial glial cells leading to chiasm avoidance by these retinal axons. Boc in RGCs is also necessary for proper ipsilateral axon development potentially via a role in ipsilateral RGC specification and/or in midline avoidance in response to Shh. On the other hand, Nrp1 expressed in contralateral RGCs requires its ligand VEGF164 and VEGF188 on chiasm cells to promote contralateral RGC outgrowth. Contralateral RGCs express also Nr-CAM and Plexin-A1, chiasm midline glial cells express Nr-CAM and Sema6D, and SSEA-1 positive cells express Plexin-A1. Nr-CAM acts in a complex with Sema6D and Plexin-A1 to promote midline crossing and proper RGC fasciculation at the optic chiasm. In the retina, the transcription factor FoxD1 is expressed in VT retina and repress the expression of FoxG1 (normally expressed in the nasal retina) while FoxG1 represses the expression of FoxD1. FoxD1 is required for the expression of the transcription factor Zic2 that determines the ipsilateral program. Zic2 as well as Ten-m2 (maybe by interacting together) induces the expression of EphB1 necessary for midline avoidance. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Several other proteins act as growth promoting factors for retinal axons. Vax1, a member of the well-known homeobox transcription factor family, is an intriguing factor. Loss of function of *Vax1* in humans and mice leads to reduced optic nerves (Bertuzzi et al., 1999; Hallonet et al., 1999; Slavotinek et al., 2012). Retinal axons in *Vax1*-deficient mice fail to form an optic chiasm and very few axons penetrate the brain (Bertuzzi et al., 1999; Hallonet et al., 1999). *Vax1* is not expressed in RGCs but is expressed by midline cells (Bertuzzi et al., 1999). At the time, it was hypothesized that Vax1 regulates the expression of axon guidance cues that are important for retinal axons to cross the optic chiasm and invade the brain. This classical role of homeodomain transcription factors has been challenged by the fact that homeoproteins can also act non-cell-autonomously by a mechanism involving secretion and intracellular transfer into neighboring cells (Prochiantz and Di Nardo, 2015). Recently, these disparate results were confirmed: Vax1 is secreted by ventral hypothalamic cells and binds to a heparan sulfate proteoglycan (HSPG) expressed on retinal axons and is internalized into retinal growth cones where it activates locally protein synthesis to promote axonal growth (Kim et al., 2014) (Fig. 1). Another family of secreted proteins acting to promote axonal growth is the Secreted Frizzled-Related Proteins (Sfrps) known as Wnt antagonists. Sfrp1 and 2 are expressed by RGCs and Sfrp2 protein can be found on retinal axons (Marcos et al., 2015). Sfrps promote RGC axon growth by modulating ADAM10 metalloprotease activity, on substrates such as L1 and N-cadherin. As L1 is expressed by SSEA-1/CD44 positive cells at the chiasm, sfrp1/2 double-mutant mice show guidance errors at the optic chiasm. Sfrps are also involved in constraining retinal axons at different points along the visual pathway, such as the optic disc, nerve or tract, as sfrp1/2 double-mutant mice have fasciculation defects at these different levels (Marcos et al., 2015).

The molecules described so far are not the key factors for ipsilateral/contralateral guidance differences. Although they may affect the ratio of ipsilateral/contralateral axons, they similarly affect both types of retinal axons. For a differential effect on guidance at the optic chiasm, Slits and their Robo receptors were initially considered as the ideal candidates as they are decisive for midline guidance of commissural and ipsilateral axons in vertebrates and invertebrates (Dickson and Gilestro, 2006). Indeed, Slit1 and 2 are expressed in complementary territories in the ventral diencephalon around the optic chiasm forming a "corridor" around growing retinal axon pathway, while Robo2 is expressed by RGCs during chiasm formation (Fig. 1). Slit1 and Slit2 also have an inhibitory effect on retinal axon outgrowth, *in vitro* (Erskine et al., 2000). However, Slit/Robo signaling does not seem to be directly involved in the guidance decision of ipsilateral axons as retinal axons still project ipsilaterally in Slit1 and Slit2 double mutant mice (Plump et al., 2002) and in Robo1 and Robo2 single KO mice (Plachez et al., 2008). As ectopic bundles are observed at the chiasm in these Slit and Robo mutants, Slit/Robo signaling is nonetheless important for the positioning and formation of the optic chiasm by repulsing retinal axons in their pathway channel (Plump et al., 2002; Plachez et al., 2008).

Guidance Cues for Ipsilateral Axons

The first molecule identified to be involved in the repulsion of retinal axons at the optic chiasm was ephrin-B (transmembrane guidance protein from the ephrin family), which regulates the guidance of an ipsilateral projection that develops at metamorphosis in Xenopus tadpole (Nakagawa et al., 2000). Subsequently, EphB1, a tyrosine kinase receptor to ephrin-Bs was identified as the key receptor inducing midline avoidance of ipsilateral RGCs at the optic chiasm in mice (Williams et al., 2003). Ipsilateral retinal axons express EphB1 and are repelled by ephrin-B2 expressed on radial glial cells at the chiasm midline, leading to a turn away from the midline and projection into the ipsilateral optic tract (Fig. 1). EphB1 is necessary for midline avoidance of VT retinal axons (Williams et al., 2003) and is also sufficient, as EphB1 gain of function by retinal in utero electroporation into contralateral retina leads to an increased ipsilateral projection (Petros et al., 2009). EphB1 is expressed in human embryonic retina (Lambot et al., 2005), but whether EphB1 is also important for midline axon guidance in humans is unknown. Sonic Hedgehog (Shh), a secreted morphogen regulating various aspects of body development, is involved in the development of ipsilateral projection. Boc, a high affinity Shh receptor, is expressed specifically in VT retina by ipsilateral RGCs, while Shh is expressed by contralateral RGCs and by midline cells at the chiasm borders (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008; Fabre et al., 2010). Different responses of RGCs to Shh *in vitro* have been reported: Shh can promote or inhibit axonal outgrowth from VT or DN retinal explants, respectively (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008), and Shh specifically induces the retraction of retinal axons with high Boc expression, a response lost in $Boc^{-/-}$ explants (Fabre et al., 2010).

Although these *in vitro* results are seemingly opposite, Boc is clearly necessary for the development of the ipsilateral projection *in vivo* as $Boc^{-/-}$ mice have a smaller ipsilateral projection (Fabre et al., 2010; Sanchez-Arrones et al., 2013). However, it is not clear whether Boc is directly involved in the guidance decision at the optic chiasm *in vivo* through the retraction of Boc-positive axons by Shh as shown *in vitro* (Fabre et al., 2010) or instead regulates the specification of ipsilateral RGCs as suggested by modification of ipsilateral and contralateral markers in $Boc^{-/-}$ mice (Sanchez-Arrones et al., 2013). Furthermore, several proteins involved in cellular signaling pathway not necessarily linked to specific axon guidance factors are important for decussation of RGCs at the chiasm midline. For instance, members of the protein kinase C family such as PKCα, β2, and ε, were detected at the optic chiasm and PKCε is expressed by the SSEA-1^{+} neurons that form the midline. Inhibiting PKCα and β pharmacologically induces a reduction of ipsilateral projections, suggesting that PKC proteins are indeed involved in midline avoidance of ipsilateral RGCs (Wang et al., 2014).

Guidance Cues for Contralateral Axons

It has been long believed that crossing the midline was the "default" program as in lower vertebrates all RGCs cross the chiasm, and axons simply grow straight. However, a large body of evidence now shows that midline crossing by contralateral axons is an active process also requiring guidance or growth promoting cues, and even factors that overcome inhibitory cues.

Nr-CAM was the first cell-adhesion molecule discovered to be involved in this process. Nr-CAM is expressed in the radial glia of the optic chiasm and by all contralateral RGCs, but is only required for the midline crossing of the late born contralaterally-fated RGCs located in the VT retina resulting in an increase of ipsilateral projection in Nr-CAM knockout mice (Williams et al., 2006). Co-cultures of retinal explants with chiasm cells suggested a cell-autonomous effect of Nr-CAM on RGC axon growth. Interestingly, $NrCAM^{-/-}$ $EphB1^{-/-}$ double-mutants lead to a decrease in ipsilateral RGCs at early stage (similarly to $EphB1^{-/-}$) and an increase in ipsilateral RGCs at later stages (similarly to $NrCAM^{-/-}$), suggesting that EphB1/Ephrin-B2 repulsion and Nr-CAM attraction are two independent molecular programs that contribute to binocular pathway formation (Williams et al., 2006). More recently, it was shown that Nr-CAM acts in a complex with Semaphorin 6D (Sema6D) and Plexin-A1 to promote midline crossing and proper RGC fasciculation at the optic chiasm (Kuwajima et al., 2012). Contralateral RGCs express Nr-CAM and Plexin-A1, chiasm midline glial cells express Nr-CAM and Sema6D, and SSEA-1 positive cells express Plexin-A1. *In vitro* experiments show that Sema6D alone on chiasm cells inhibits the growth of late-born contralateral RGCs, in agreement with its usual role as a repulsive factor. However, when Plexin-A1 and Nr-CAM are present with Sema6D on chiasm cells, the growth of the same axons is promoted instead. Thus, the interactions between Sema6D, Plexin-A1, and Nr-CAM promote the growth of retinal axons to cross the midline barrier. Another known semaphorin receptor involved in midline crossing is neuropilin 1 (Nrp1), expressed in central (contralateral) retina. Indeed, Nrp1 mutant mice show axon fasciculation defects and an increased ipsilateral projection (Erskine et al., 2011). However, the Nrp1 ligand required to promote contralateral RGC outgrowth is not its well-known ligand Semaphorin 3A but instead VEGF164, one of the isoforms of VEGF/VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor), expressed on chiasm cells. $Vegfa^{120/120}$ mice lacking VEGF164 and VEGF188 isoforms, have defects of retinal axons similar to Nrp1 mutants (Erskine et al., 2011). The ligand VEGF189 (the human homolog of the mouse VEGF188 isoform) can bind to Nrp1 and $Vegfa^{188/188}$ mice that express only VEGF188 isoform have normal retinal axon guidance and optic chiasm (Tillo et al., 2015). Moreover, expression of one allele of VEGF188 in $Vegfa^{120/188}$ mice is able to rescue the phenotype of increased ipsilateral projection originating from the nasal retina seen in $Vegfa^{120/120}$ mice, indicating that VEGF188 is sufficient to guide retinal axon crossing at the optic chiasm (Tillo et al., 2015).

Transcriptional Control of Ipsilateral/ Contralateral Identity

As mentioned above, ipsilateral and contralateral retinal axons have different behaviors at the midline due to their differential sensitivity to guidance cues. This difference in behavior is controlled by subtype-specific transcriptional programs that control the specification of contralateral versus ipsilateral RGCs and direct expression of guidance receptors.

Zic2 is the key transcription factor that determines the ipsilateral program. Zic2 is specifically expressed by ipsilateral RGCs during a narrow time window from E14.5 to E18.5 (Herrera et al., 2003). Indeed, Zic2 knock-down mice have a dramatically reduced ipsilateral projection, indicating that Zic2 is necessary for programming VT retinal axon for midline

avoidance. Furthermore, Zic2 expression in retinal explants is sufficient to inhibit the growth of retinal axons *in vitro* (Herrera et al., 2003) and EphB1 expression is also required for this repulsive effect (Lee et al., 2008). Indeed, Zic2 induces the expression of EphB1 both *in vitro* (Lee et al., 2008) and *in vivo* (Garcia-Frigola et al., 2008) (Fig. 1). Notably, Zic2 overexpression in EphB1 mutant mice can induce some retinal axons to avoid the midline, suggesting that molecules other than EphB1 are regulated by Zic2 and important for midline avoidance of retinal axons (Garcia-Frigola et al., 2008). Thus, Zic2 is a "master gene" for the ipsilateral program. Indeed, Zic2 directly regulates the expression of other ipsilateral specific molecules such as the serotonin transporter (SERT) (Garcia-Frigola and Herrera, 2010). While SERT is not involved in midline avoidance, it is important for further refinement of ipsilateral axons in their targets (Upton et al., 2002). This highlights the fact that Zic2 regulates many aspects of ipsilateral RGC development: midline avoidance as well as refinement.

Zic2 expression is regulated in turn by transcription factors that pattern the retina. The transcription factor FoxD1 (previously named BF-2, Brain factor 2) is expressed in VT retina and ventral diencephalon during optic chiasm formation (Herrera et al., 2004). FoxD1 represses the expression of FoxG1 (normally expressed in nasal retina) (Fig. 1), thus in FoxD1 mutants, FoxG1 expression extends to the VT quadrant of the retina. Furthermore, in FoxD1 mutant mice, expressions of the ipsilateral markers Zic2 and EphB1 are lost, pointing to a role of FoxD1 in retinal patterning upstream of ipsilateral RGC specification (Herrera et al., 2004). Surprisingly, in FoxD1 mutant mice, while the ipsilateral program is downregulated in the retina, more axons project ipsilaterally, probably due to the changes occurring as well in the ventral diencephalon (Herrera et al., 2004). Moreover, FoxG1 acts as a counter gradient to FoxD1 and regulates retinal axon pathfinding by repressing the ipsilateral program controlled by FoxD1 in nasal retina (Tian et al., 2008).

Recently, another family of molecules has been implicated in the regulation of ipsilateral markers: the transmembrane protein from the teneurin/odz family, Ten-m2. Teneurins are translocated to the nucleus and regulate transcriptional activity as well as interact with cytoskeleton proteins, which suggests additional roles in guidance or cell signaling. Ten-m2 is expressed in the retina and a decreased ipsilateral projection was observed in Ten-m2 mutant mice, that was correlated with a downregulation of EphB1 expression in VT retina (Young et al., 2013). No change in Zic2 expression was observed, suggesting that Ten-m2 may act upstream of EphB1 but not upstream of Zic2, perhaps interacting with Zic2 to promote EphB1 expression (Young et al., 2013).

Less is known about the transcriptional programs controlling the contralateral RGCs. The transcription factor Islet2 is expressed in post-mitotic contralateral RGCs, and appears to repress the ipsilateral program as Islet2 knock-out mice show an increased number of Zic2$^+$ and EphB1$^+$ RGCs in the VT retina that correlates with an increased ipsilateral projection (Pak et al., 2004). Interestingly, the RGCs that become ipsilateral in islet2-KO are specifically located in VT retina, suggesting that Islet2 represses the ipsilateral program by controlling the expression of Zic2 and thus EphB1, but only in VT retina (Pak et al., 2004).

In conclusion, the transcription factors FoxG1 and FoxD1 pattern the nasotemporal identity of the mammalian retina. FoxD1 is required for the expression of Zic2, which specifies ipsilateral RGCs. Zic2 then regulates several molecules important for the guidance and targeting of ipsilateral RGCs, among them, the guidance receptor EphB1 that is crucial for ephrin-B2 mediated axonal repulsion at the midline.

DISORDERS ASSOCIATED WITH MISROUTED RETINAL AXONS

The importance of ipsilateral/contralateral specification is well illustrated in the context of two human congenital conditions: albinism and achiasma, both characterized by defects in retinal axon guidance at the midline. Although the guidance defect in these two conditions is opposite, as most retinal axons are crossed in albinism while no axon crosses the midline in achiasma, the functional consequences for vision are similar, with reduced or lack of stereopsis (depth perception) and nystagmus (involuntary eye movement) in albinism and achiasma (Apkarian, 1996). The increasing knowledge of the genetic and molecular basis of these diseases, especially albinism, opens new avenues for understanding the determination of ipsilateral and contralateral RGC fate.

Achiasma

In human achiasmatic cases, the optic chiasm is absent and retinal axons do not cross the midline to target the contralateral brain hemisphere but remain on the ipsilateral side (Apkarian et al., 1994, 1995). Mutations have not been identified in human achiasma. However, as a colony of achiasmatic

Belgian sheepdogs was previously described and studied, this condition is likely genetic (Williams et al., 1994). A similar condition has been described in the Zebrafish mutant belladonna, in which the transcription factor Lhx2 is mutated. Belladonna mutants have defects in ventral diencephalon patterning (Seth et al., 2006) and nystagmus. A patient with VACTERL association, a congenital syndrome that includes vertebral defects, anal atresia, cardiac defects, tracheoesophageal fistula, renal defects, and limb defects, was diagnosed with nystagmus and achiasma (Prakash et al., 2010) but the gene involved is unknown. Mouse mutants of Shh signaling pathway (Shh and gli mutants) have similar phenotypes to the VACTERL (Kim et al., 2001), suggesting that common pathophysiological mechanisms could be involved. Pax2 mutant mice, noi mutant zebrafish (pax mutant), and fgf8/Ace zebrafish mutant that have a reduced Pax2 expression, are often achiasmatic (Torres et al., 1996; Macdonald et al., 1997; Shanmugalingam et al., 2000). In these mutants, Shh is ectopically expressed at the midline (Torres et al., 1996; Macdonald et al., 1997) and could inhibit retinal axon growth across the midline. However, whether the achiasmatic phenotype described in humans might be linked to these mutations or to the Shh signaling pathway is unknown. The limited number of human achiasmatic cases identified hampers the discovery of new genes.

Thus, the absence of an optic chiasm could result from (1) a fate change of all RGCs toward the ipsilateral phenotype and thus avoidance of the midline or (2) a molecular or structural change in the ventral diencephalon that renders the midline of this region non-permissive for retinal axons. The latter is more likely, especially as achiasmatic mutants display changes in ventral diencephalon organization and gene expression (Karlstrom et al., 1996; Torres et al., 1996; Macdonald et al., 1997; Shanmugalingam et al., 2000; Seth et al., 2006).

The absence of crossing fibers in achiasma results in one brain hemisphere receiving visual inputs only from the ipsilateral eye in both the LGN and the visual cortex (Fig. 3). Therefore, integration of visual information from the same visual hemifield through both eyes is not possible, and thus stereopsis is absent (Apkarian, 1996). In addition, instead of each brain hemisphere encoding one visual hemifield, in achiasmatic conditions, each LGN receives inputs corresponding to different visual hemifields. Tracing experiments and receptive field recordings in achiasmatic belgian sheepdogs showed that the retinal axons from the nasal retina that are misrouted ipsilaterally project in the appropriate layer of the LGN as if they had successfully crossed the midline, thus innervating the layer that normally receives inputs from the contralateral eye (Williams et al., 1994). Consequently, the LGN contains non-congruent maps of visual space in adjacent layers, corresponding to different visual hemifields (Fig. 3). While the mapping of visual inputs in the LGN has not been studied to date in humans, a few studies in the visual cortex (V1) have revealed the consequences of achiasma for visual mapping. Visually evoked potentials (VEPs) consist of light-stimulation in one eye followed by occipital electroencephalogram (EEG) recording on both sides. In control human subjects, most light stimulation induces VEPs on both sides. In contrast, in achiasmatic humans, an ipsilateral asymmetry is detected with most visually evoked responses in the ipsilateral hemisphere (Apkarian et al., 1994, 1995), consistent with the absence of crossing fibers. Using fMRI, an overlap of inputs corresponding to the two visual hemifields was detected in V1 in achiasmatic humans (Victor et al., 2000). More recently, precise retinotopic mapping using fMRI determined that maps corresponding to the two visual hemifields overlap in V1 in achiasmatic conditions (Hoffmann et al., 2012).

Albinism

Albinism is characterized by hypopigmentation, affecting skin, hair and eyes (in oculocutaneous albinism, OCA) or mainly the eyes (in ocular albinism, OA), and by a profound visual impairment (Oetting, 1999; Montoliu et al., 2014). In addition to the very low visual acuity, nystagmus and reduced stereopsis, people with albinism are also photophobic due to hypopigmentation in the eye, and also have severe foveal hypoplasia (Oetting, 1999). Several genetic mutations linked to albinism have been isolated and most of them affect melanin synthesis or melanosome packaging (Montoliu et al., 2014) (Table 1). For example, OCA1 is linked to a mutation in the tyrosinase (TYR), a critical enzyme for melanin synthesis. For ocular albinism, OA1 is mutated, coding for GPR143 (Bassi et al., 1995), a L-Dopa receptor (Lopez et al., 2008). The genetic mutations found in syndromic forms of albinism, such as the Hermansky–Pudlak syndrome (HPS) and Chediak–Higashi syndrome (CHS) affect proteins that are important for vesicle trafficking to lysosome related organelles such as melanosomes (Palmisano et al., 2008). How these proteins result in a reduced melanogenesis is unclear but an emerging concept suggests that at least some of these proteins regulate pH homeostasis in melanosomes in association with a downregulation of

Table 1 List of Genes Currently Associated With Albinism

Type of Albinism	Mutated Gene	Protein	Full Name of Protein	Known Function
OCA1	*TYR*	TYR	Tyrosinase	Rate-limiting enzyme for the first two steps of melanin synthesis
OCA2	*OCA2 or P gene*	P-protein	P-protein	Melanocyte-specific transporter for tyrosine
OCA3	*TYRP1*	TYRP1	Tyrosinase-related protein 1	Melanosomal enzyme, role in melanin synthesis
OCA4	*SLC45A2*	NCKX2	Sodium/Potassium/ Calcium exchanger 2	Potassium-dependent sodium calcium exchanger
OCA5	Unknown			
OCA6	*SLC24A5*	NCKX5	Sodium/Potassium/ Calcium exchanger 5	Potassium-dependent sodium calcium exchanger
OCA7	*c10orf11*	c10orf11	Leucine-rich repeat-containing protein C10orf11	unknown (predicted to have a role in melanocyte differentiation)
OA1	*GPR143*	GPR143	G Protein-Coupled Receptor 143	Receptor for tyrosin/L-DOPA and dopamine, involved in phosphoinositide pathway and in melanosome biogenesis and organization.
CHS1	*LYST*	LYST	Lysosomal Trafficking Regulator	Regulates intracellular protein trafficking in endosome
HPS1, 3, 4, 5, and 6	*HSP1*	HSP1	Hermansky–Pudlak syndrome (1, 3, 4, 5, or 6) protein	Components of BLOC complexes, important for the formation of melanosomes
HPS2	*AP3B1*	AP3B1	AP-3 complex subunit beta-1	Component of AP3 complex, important for the formation of melanosomes
HPS7	*DTNBP1*	Dysbindin 1	Dystrobrevin Binding Protein 1	Component of BLOC1 complex, important for the formation of melanosomes
HPS8and 9	*BLOC1S (3 or 6)*	BLOC1S (3 or 6)	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit (3 or 6)	Component of BLOC1 complex, important for the formation of melanosomes

tyrosinase activity and thus melanogenesis (Watabe et al., 2004; Bellono et al., 2014; Bin et al., 2015).

In contrast to achiasmatic cases, in albino cases, more retinal axons cross the midline and fewer project to the ipsilateral side. This phenotype has been verified in several albino animals with an ipsilateral projection such as ferrets, cats, tigers, monkeys (Guillery, 1971; Guillery and Kaas, 1973; Creel et al., 1982; Cucchiaro and Guillery, 1984; Guillery et al., 1984), and in humans (Guillery et al., 1975; Apkarian, 1996), highlighting the universal and pleiotropic effect of albino mutations on pigmentation and visual system development. The elucidation of the molecular mechanisms at play in retinal specification and axon guidance at the optic chiasm in pigmented animals is contributing to our understanding of the albino visual system phenotype (Petros et al., 2008; Erskine and Herrera, 2014). *In vitro* experiments clearly demonstrated that the axon guidance defect in albino mice arises from the retina as pigmented retinal explants grow similarly in the presence of control or albino midline cells but albino VT retinal explants show differential growth compared with control VT retinal explants (Marcus et al., 1996). The guidance receptor EphB1 is expressed in fewer RGCs in albino mice, leading to a decrease in the number of retinal axons avoiding the midline (Rebsam et al., 2012). However, the targeting defects in albino mice (Rebsam et al., 2012) are not identical to those observed in EphB1-KO mice (Rebsam et al., 2009), suggesting that additional mechanisms are dysregulated. Misrouted retinal axons in albino mice target

the contralateral region of the main target, the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN), instead of the ipsilateral recipient zone (Rebsam et al., 2012). This suggests that the molecular identity of misrouted axons is not that of ipsilateral RGCs but rather that of contralateral RGCs. Indeed, the albino retina shows a decrease in Zic2$^+$ RGCs (Herrera et al., 2003; Rebsam et al., 2012) and a corresponding increase in Islet2$^+$ RGCs in the VT retina (Bhansali et al., 2014), suggesting a decrease of ipsilaterally specified RGCs and a concomitant increase in contralaterally specified RGCs. Thus, RGC specification is altered in albino retina. Moreover, converging evidence suggests that a temporal shift in retinal neurogenesis could be the cause of this specification defect (Ilia and Jeffery, 1996; Rachel et al., 2002; Bhansali et al., 2014). Different subtypes of RGCs are generated at different time points: ipsilateral RGCs are generated earlier and for a restricted period compared with most contralateral RGCs (Drager, 1985). Thus, the observed delay in the peak of neurogenesis could explain why some RGC subtypes are decreased (ipsilateral RGCs) while others are increased (contralateral RGCs) (Ilia and Jeffery, 1996; Bhansali et al., 2014). As the specification of different retinal cell types also depends on the time of genesis (Cepko et al., 1996), other retinal cell types are potentially affected. Indeed, fewer photoreceptors are present in albino mouse retina (Ilia and Jeffery, 2000) which could result from delayed neurogenesis. This suggests that in the albino visual system, the misrouting of retinal axons is not the result of a pure guidance defect but is rather a consequence of an abnormal RGC specification linked to a delay in neurogenesis.

While many genes mutated in albinism have been identified (Table 1), the link between these genes and the visual deficits is still mysterious. For many years, it was not even clear how the two types of albinism, OCA and OA, were related. The finding that OA1, the gene mutated in ocular albinism is a receptor for L-Dopa (Lopez et al., 2008), a product of tyrosinase in melanogenesis, drew the attention to L-Dopa as a potential molecular link between melanogenesis and retinal defects. Indeed, transgenic mice expressing tyrosine hydroxylase (TH), an enzyme producing L-Dopa, rescued the visual phenotype (ipsilateral projection and visual acuity) of the tyrosinase mutant mice although it did not rescue the pigmentation defect (Lavado et al., 2006) understandably, as TH is not able to synthesize the components necessary for melanogenesis. As L-Dopa is known to regulate cell proliferation in retina (Ilia and Jeffery, 1999) and is downregulated in albino retina (Roffler-Tarlov et al., 2013), it is therefore a likely candidate linking pigmentation deficits in the retinal pigmented epithelium (RPE) and altered neurogenesis in the neural retina. Further experiments will be needed to determine how L-Dopa produced by RPE cells affects retinal neurogenesis. Finally, albino embryonic mouse retina has perturbed RPE cell integrity and altered gap junctions (Iwai-Takekoshi et al., 2016), but whether these RPE deficits potentially impairing cell-cell communications impact RGC neurogenesis remain to be determined. An interesting candidate downstream of the melanogenesis pathway is the glutamine transporter slc38a8 (SNAT8) (Poulter et al., 2013), as mutations in this gene cause the FHONDA syndrome, described as foveal hypoplasia and optic nerve decussation defects that are similar to those found in albinism but without any pigmentation defect (Al-Araimi et al., 2013).

In albinism, most retinal axons project contralaterally, but a few ipsilaterally projecting axons are maintained. Similar to achiasma, each brain hemisphere in albinos receives very few inputs coming from both eyes corresponding to the same visual hemifield (Fig. 3), thus explaining reduced or lack of stereopsis. The organization of projections and the mapping of visual inputs have been extensively studied in albino animal models (Kaas, 2005). The most famous model is the Siamese cat, in which a temperature sensitive mutation of tyrosinase affects pigmentation and development of the visual system. Retinal axons misrouted contralaterally project to the same region albeit on the wrong side, thus in the "ipsilateral" axon-recipient region in both Siamese and true albino cats (Guillery, 1969; Hubel and Wiesel, 1971; Creel et al., 1982) (Fig. 2). This phenotype is similar to that of EphB1-KO mice, where only the axon guidance of RGC axons at the chiasm is modified (Fig. 2) (Rebsam et al., 2009). Surprisingly, albino mice do not display the same phenotype, as contralaterally misrouted retinal axons project to a part of the contralateral recipient region corresponding to the VT retina (Rebsam et al., 2012) (Fig. 2), in accordance with the change in ipsilateral/contralateral markers, and suggesting a switch in fate from ipsilateral VT RGCs to contralateral VT RGCs during retinal neurogenesis (Bhansali et al., 2014). This discrepancy between cat and mice could be explained by the difference in the organization of the visual system in rodents and cats. Indeed, most rodent LGN neurons respond to both eyes when they respond to the ipsilateral eye (Grieve, 2005; Howarth et al., 2014) while LGN neurons in cats respond preferentially to only one eye (Hubel and Wiesel, 1971; Schmolesky et al., 2000). These results suggest that a form of binocular integration might already occur at

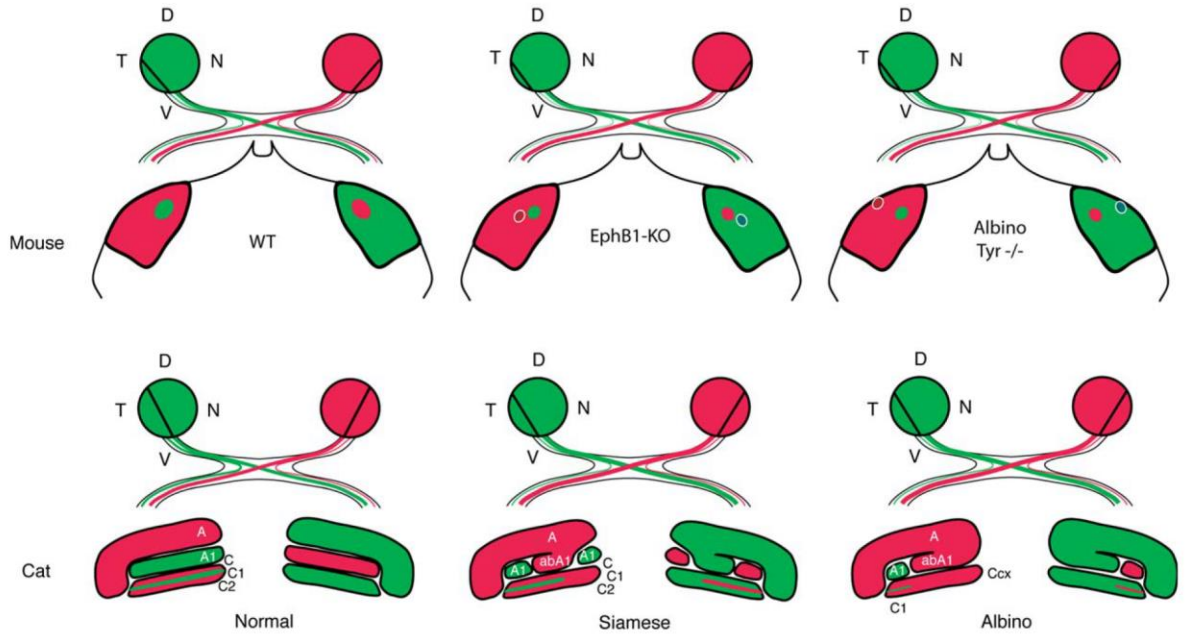


Figure 2 Comparison of eye-specific projections in the lateral geniculate nucleus (LGN) of mouse and cat after misrouting of retinal axons at the optic chiasm. Retinal projections from each eye are represented in green and red. In WT mouse, projections from the ipsilateral side form a patch that is segregated from the rest of the contralateral projections. In EphB1-KO mice, fewer retinal axons project ipsilaterally, but these contralaterally-misrouted axons still project to the region next to the ipsilateral patch, suggesting that laterality is affected but not targeting, and the misrouted retinal axons retain an ipsilateral identity and target where they normally would have, but on the opposite side. In albino mice, the axons that are misrouted to the contralateral side project to a contralateral zone, suggesting a change in the targeting, and, potentially, in the identity/fate of these misrouted axons. In normal cat, the LGN is organized into eye-specific laminas, with lamina A, C, and C2 receiving contralateral inputs and lamina A1 and C1 receiving ipsilateral inputs. In Siamese cat, retinal axons that are misrouted contralaterally now project to the same layer but on the wrong side. Thus, part of A1 now receives contralateral inputs (AbA1) and similarly for part of C1. In albino cat, more retinal axons are contralaterally misrouted compared with the Siamese cat and the phenotype is enhanced, with more misrouted axons targeting the ipsilateral laminas. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

the level of the LGN in rodents, while this integration occurs only at the cortical level in cats. The organizational rules in the LGN of rodent and cats might thus be different and could contribute to the discrepancy of targeting defects observed in albino cats and mice. Interestingly, as in achiasma, one LGN receives information corresponding to different visual hemifields instead of the same hemifield coming from both eyes (Guillery and Kaas, 1971) (Fig. 3). While the LGN organization has not been studied in humans, high-resolution fMRI in the visual cortex showed that the two visual hemifield maps in albino humans overlap and are organized in a topographic manner (Kaule et al., 2014). This organization suggests that in albino primates, there is no rearrangement of the geniculocortical projection as this type of projection results from a simple transfer of the mapping occurring at the LGN level combined with the ocular dominance columnar organization of geniculocortical axons (Hoffmann and Dumoulin, 2015).

Interestingly, despite the overlap of hemifield maps, achiasmatic and albino humans see in a properly ordered fashion and do not mix left and right visual hemifields, suggesting that plasticity mechanisms allow segregation of visual informations (Fig. 3), most likely through experience-dependent mechanisms.

Nystagmus in Achiasma and Albinism

The most logical consequence of misrouting at the optic chiasm is altered stereopsis (Fig. 3). However, another consequence almost always associated with achiasma and albinism is nystagmus, which is an involuntary oscillation of one or both eyes around

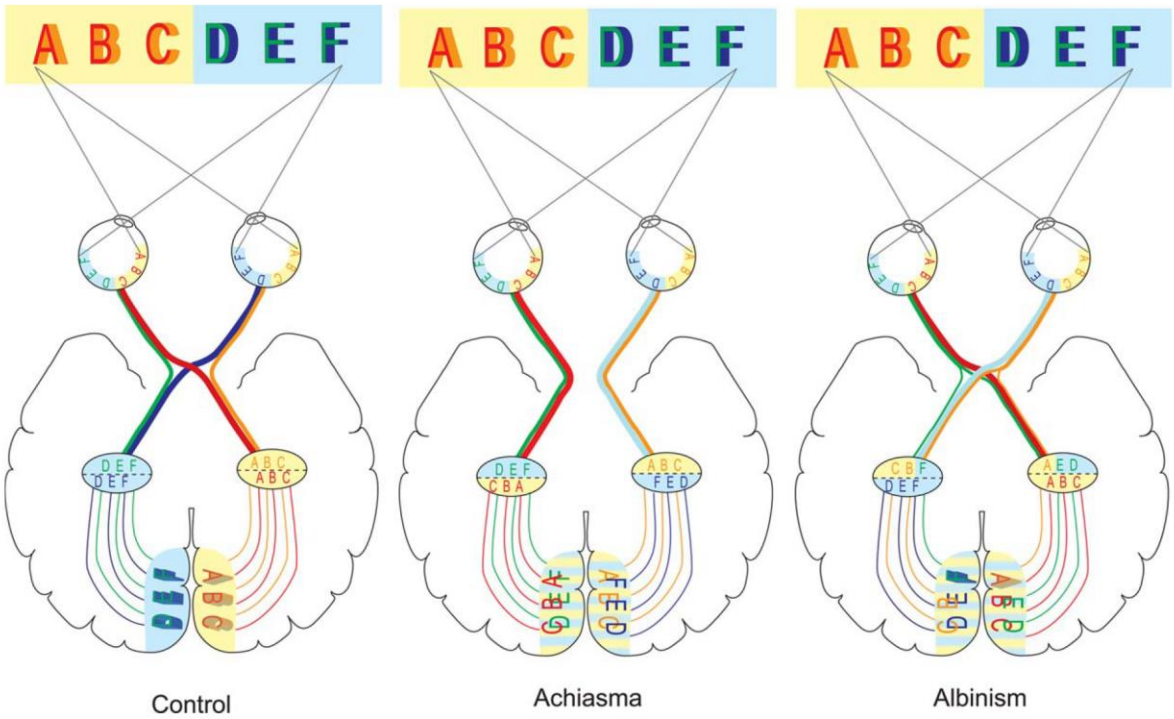


Figure 3 Visual field representations in achiasmatic and albino humans. In control subjects, each binocular hemifield (yellow and blue) is represented into different parts of the retina. Retinal ganglion cells (RGCs) in the nasal retina project to the contralateral side (red and dark blue), while RGCs in the temporal retina project to the ipsilateral side (orange and green). This ensures that each LGN receives inputs corresponding to the same visual hemifield from both eyes. The LGN is divided into eye-specific laminas but contralateral and ipsilateral inputs corresponding to the same region of the binocular hemifield are mapped to adjacent regions of the LGN albeit in different laminas. The LGN representation has not been directly assessed in humans, and this representation is based on data from animal models. Visual inputs corresponding to this hemifield are then transmitted to the visual cortex via the geniculocortical axons. Interestingly, geniculocortical axons transmitting information from each eye are interspaced, forming alternate stripes of inputs coming from the contralateral or ipsilateral eye called ocular dominance columns (red and orange, or blue and green alternating axons). This allows for neighboring regions within the cortex to receive inputs corresponding to one hemifield seen from both eyes. The integration of the information coming from both eyes corresponding to the same hemifield is thought to be the basis for stereopsis and depth perception. In achiasma, all retinal axons corresponding to one eye project to the same side (ipsilateral), hence the LGN receives information corresponding to different hemifields into different laminas, instead of the same "image" viewed from different eyes. In achiasma, as geniculocortical axons do not seem to re-arrange, there is no ocular dominance column as all the visual inputs come from the same eye, but instead, two maps corresponding to each visual hemifield overlap in V1. In albinism, retinal axons that are misrouted contralaterally still project to the same target region but on the opposite side, thus part of the LGN received inputs corresponding to a different visual hemifield than the remainder of the contralateral projections. Thus, in albino humans, two maps corresponding to each visual hemifield overlap in V1.

one or more axes. Interestingly, albinism is often clinically diagnosed by nystagmus and lack of stereopsis (in addition to foveal hypoplasia and iris transillumination), especially in cases without obvious skin hypopigmentation (OA1) or in light skinned populations. The mechanisms leading to nystagmus during development are not clear and several mechanisms have been suggested (Gottlob and Proudlock, 2014). Animal models with various alterations in chiasmatic routing such as in belladonna zebrafish mutant (achiasma in a model with normally only crossed projection), Shh mutant mice (achiasma) and albino mice all lead to nystagmus (Huang et al., 2006; Traber et al., 2012), suggesting that the miswiring of

RGCs could be the origin of nystagmus, although no clear mechanism has yet been identified. Another hypothesis is that, in addition to retinal defects, there is an abnormal development of binocular cortical motor system controlling the optokinetic system (Brodsky and Dell'Osso, 2014). However, recent evidence has implicated local circuitry within the retina as mutations in FRMD7 gene have been associated with idiopathic infantile nystagmus (Tarpey et al., 2006). FRMD7, a regulator of neuronal outgrowth (Betts-Henderson et al., 2010; Watkins et al., 2013) is expressed in starburst amacrine cells of the retina, and required in the mouse retina to establish spatially asymmetric inhibitory inputs from starburst amacrine cells onto horizontal direction-selective ganglion cells (Yonehara et al., 2016). Thus, in contrast to what has been previously hypothesized, the origin of congenital nystagmus may lie in the retina rather than in the brain. Whether FRMD7 expression and/or similar retinal circuitry are affected in albinism or achiasma remains to be demonstrated and it is possible that several mechanisms could lead to the same phenotype of nystagmus.

CONCLUSION

Tremendous advances have been made in the last two decades in deciphering the molecular mechanisms leading to retinal axon guidance at the midline, especially using genetic mouse models. Achiasma and albinism are two congenital diseases with misrouting of retinal axons at the optic chiasm. Studies in achiasmatic and albino animal models have allowed characterization of the anatomical and functional consequences of this misrouting and provide insight into the cellular mechanisms for development and plasticity of the visual system. The study of these diseases highlights the importance of the link between developmental mechanisms such as the early specification of defined neuronal populations and the functional consequences of precise neuronal networks and behavioral outputs. Now fMRI studies can determine precisely the mapping of visual inputs in humans and hopefully the link between the genetic mutations involved and the axonal misrouting will be deciphered in the future. This in turn should facilitate the diagnosis and ultimately possible treatments for these conditions.

We thank Michael Hoffmann, Patricia Gaspar, Stéphane Nedelec and Carol Mason for helpful comments. We are members of the Ecole des Neurosciences de Paris training network.

REFERENCES

Al-Araimi M, Pal B, Poulter JA, van Genderen MM, Carr I, Cudrnak T, Brown L, Sheridan E, Mohamed MD, Bradbury J, Ali M, Inglehearn CF, Toomes C. 2013. A new recessively inherited disorder composed of foveal hypoplasia, optic nerve decussation defects and anterior segment dysgenesis maps to chromosome 16q23.3-24.1. Mol Vis 19:2165–2172.

Apkarian P. 1996. Chiasmal crossing defects in disorders of binocular vision. Eye 10: 222–232.

Apkarian P, Bour L, Barth PG. 1994. A unique achiasmatic anomaly detected in non-albinos with misrouted retinal-fugal projections. Eur J Neurosci 6:501–507.

Apkarian P, Bour LJ, Barth PG, Wenniger-Prick L, Verbeeten B. Jr. 1995. Non-decussating retinal-fugal fibre syndrome. An inborn achiasmatic malformation associated with visuotopic misrouting, visual evoked potential ipsilateral asymmetry and nystagmus. Brain: J Neurol 118:1195–1216.

Assali A, Gaspar P, Rebsam A. 2014. Activity dependent mechanisms of visual map formation–from retinal waves to molecular regulators. Semin Cell Dev Biol 35:136–146.

Bassi MT, Schiaffino MV, Renieri A, De Nigris F, Galli L, Bruttini M, Gebbia M, Bergen AA, Lewis RA, Ballabio A. 1995. Cloning of the gene for ocular albinism type 1 from the distal short arm of the X chromosome. Nat Genet 10:13–19.

Bellono NW, Escobar IE, Lefkovith AJ, Marks MS, Oancea E. 2014. An intracellular anion channel critical for pigmentation. eLife 3:e04543.

Bertuzzi S, Hindges R, Mui SH, O'Leary DD, Lemke G. 1999. The homeodomain protein vax1 is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain. Genes Dev 13:3092–3105.

Betts-Henderson J, Bartesaghi S, Crosier M, Lindsay S, Chen HL, Salomoni P, Gottlob I, Nicotera P. 2010. The nystagmus-associated FRMD7 gene regulates neuronal outgrowth and development. Hum Mol Genet 19:342–351.

Bhansali P, Rayport I, Rebsam A, Mason C. 2014. Delayed neurogenesis leads to altered specification of ventrotemporal retinal ganglion cells in albino mice. Neural Dev 9:11.

Bin BH, Bhin J, Yang SH, Shin M, Nam YJ, Choi DH, Shin DW, Lee AY, Hwang D, Cho EG, Lee TR. 2015. Membrane-associated transporter protein (matp) regulates melanosomal ph and influences tyrosinase activity. PloS One 10:e0129273.

Brodsky MC, Dell'Osso LF. 2014. A unifying neurologic mechanism for infantile nystagmus. JAMA Ophthalmol 132:761–768.

Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D. 1996. Cell fate determination in the vertebrate retina. Proc Natl Acad Sci U S A 93:589–595.

Chan SO, Chung KY. 1999. Changes in axon arrangement in the retinofugal [correction of retinofungal] pathway of mouse embryos: Confocal microscopy study using single- and double-dye label. J Comp Neurol 406:251–262.

Chan SO, Chung KY, Taylor JS. 1999. The effects of early prenatal monocular enucleation on the routing of uncrossed retinofugal axons and the cellular environment at the chiasm of mouse embryos. Eur J Neurosci 11:3225–3235.

Colello RJ, Guillery RW. 1990. The early development of retinal ganglion cells with uncrossed axons in the mouse: Retinal position and axonal course. Development (Cambridge, England) 108:515–523.

Colello RJ, Guillery RW. 1992. Observations on the early development of the optic nerve and tract of the mouse. J Comp Neurol 317:357–378.

Colello SJ, Guillery RW. 1998. The changing pattern of fibre bundles that pass through the optic chiasm of mice. Eur J Neurosci 10:3653–3663.

Creel D, Hendrickson AE, Leventhal AG. 1982. Retinal projections in tyrosinase-negative albino cats. J Neurosci 2:907–911.

Cucchiaro J, Guillery RW. 1984. The development of the retinogeniculate pathways in normal and albino ferrets. Proc R Soc Lond B Biol Sci 223:141–164.

Dhande OS, Stafford BK, Lim J-HA, Huberman AD. 2015. Contributions of retinal ganglion cells to subcortical visual processing and behaviors. Annu Rev Vis Sci 1:291–328.

Dickson BJ, Gilestro GF. 2006. Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. Annu Rev Cell Dev Biol 22:651–675.

Drager UC. 1985. Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. Proc R Soc Lond B Biol Sci 224:57–77.

Drager UC, Olsen JF. 1980. Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. J Comp Neurol 191:383–412.

Erskine L, Herrera E. 2014. Connecting the retina to the brain. ASN Neuro 6:1759091414562107.

Erskine L, Williams SE, Brose K, Kidd T, Rachel RA, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Mason CA. 2000. Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: Expression and function of robos and slits. J Neurosci 20:4975–4982.

Erskine L, Reijntjes S, Pratt T, Denti L, Schwarz Q, Vieira Joaquim M, Alakakone B, Shewan D, Ruhrberg C. 2011. VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. Neuron 70:951–965.

Fabre PJ, Shimogori T, Charron F. 2010. Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the shh receptor Boc. J Neurosci 30:266–275.

Garcia-Frigola C, Herrera E. 2010. Zic2 regulates the expression of Sert to modulate eye-specific refinement at the visual targets. Embo J 29:3170–3183.

Garcia-Frigola C, Carreres MI, Vegar C, Mason C, Herrera E. 2008. Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. Development 135:1833–1841.

Godement P, Salaun J, Imbert M. 1984. Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. J Comp Neurol 230:552–575.

Godement P, Salaun J, Metin C. 1987. Fate of uncrossed retinal projections following early or late prenatal monocular enucleation in the mouse. J Comp Neurol 255:97–109.

Godement P, Salaun J, Mason CA. 1990. Retinal axon pathfinding in the optic chiasm: Divergence of crossed and uncrossed fibers. Neuron 5:173–186.

Godement P, Wang LC, Mason CA. 1994. Retinal axon divergence in the optic chiasm: Dynamics of growth cone behavior at the midline. J Neurosci 14:7024–7039.

Gottlob I, Proudlock FA. 2014. Aetiology of infantile nystagmus. Curr Opin Neurol 27:83–91.

Grieve KL. 2005. Binocular visual responses in cells of the rat dLGN. J Physiol 566:119–124.

Guillery RW. 1969. An abnormal retinogeniculate projection in Siamese cats. Brain Res 14:739–741.

Guillery RW. 1971. An abnormal retinogeniculate projection in the albino ferret (Mustela furo). Brain Res 33: 482–485.

Guillery RW, Kaas JH. 1971. A study of normal and congenitally abnormal retinogeniculate projections in cats. J Comp Neurol 143:73–100.

Guillery RW, Kaas JH. 1973. Genetic abnormality of the visual pathways in a "white" tiger. Science 180:1287–1289.

Guillery RW, Okoro AN, Witkop CJ. Jr. 1975. Abnormal visual pathways in the brain of a human albino. Brain Res 96:373–377.

Guillery RW, Hickey TL, Kaas JH, Felleman DJ, Debruyn EJ, Sparks DL. 1984. Abnormal central visual pathways in the brain of an albino green monkey (Cercopithecus aethiops). J Comp Neurol 226:165–183.

Hallonet M, Hollemann T, Pieler T, Gruss P. 1999. Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. Genes Dev 13: 3106–3114.

Herrera E, Brown L, Aruga J, Rachel RA, Dolen G, Mikoshiba K, Brown S, Mason CA. 2003. Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. Cell 114:545–557.

Herrera E, Marcus R, Li S, Williams SE, Erskine L, Lai E, Mason C. 2004. Foxd1 is required for proper formation of the optic chiasm. Development 131:5727–5739.

Hoffmann MB, Dumoulin SO. 2015. Congenital visual pathway abnormalities: A window onto cortical stability and plasticity. Trends Neurosci 38:55–65.

Hoffmann MB, Kaule FR, Levin N, Masuda Y, Kumar A, Gottlob I, Horiguchi H, Dougherty RF, Stadler J, Wolynski B, Speck O, Kanowski M, Liao YJ, Wandell BA, Dumoulin SO. 2012. Plasticity and stability of the visual system in human achiasma. Neuron 75:393–401.

Howarth M, Walmsley L, Brown TM. 2014. Binocular integration in the mouse lateral geniculate nuclei. Curr Biol: CB 24:1241–1247.

Huang YY, Rinner O, Hedinger P, Liu SC, Neuhauss SC. 2006. Oculomotor instabilities in zebrafish mutant belladonna: A behavioral model for congenital nystagmus caused by axonal misrouting. J Neurosci 26:9873–9880.

Hubel DH, Wiesel TN. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. J Physiol 160:106–154.

Hubel DH, Wiesel TN. 1969. Anatomical demonstration of columns in the monkey striate cortex. Nature 221:747–750.

Hubel DH, Wiesel TN. 1971. Aberrant visual projections in the Siamese cat. J Physiol 218:33–62.

Huberman AD, Feller MB, Chapman B. 2008. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. Annu Rev Neurosci 31:479–509.

Ilia M, Jeffery G. 1996. Delayed neurogenesis in the albino retina: Evidence of a role for melanin in regulating the pace of cell generation. Brain Res Dev Brain Res 95: 176–183.

Ilia M, Jeffery G. 1999. Retinal mitosis is regulated by dopa, a melanin precursor that may influence the time at which cells exit the cell cycle: Analysis of patterns of cell production in pigmented and albino retinae. J Comp Neurol 405:394–405.

Ilia M, Jeffery G. 2000. Retinal cell addition and rod production depend on early stages of ocular melanin synthesis. J Comp Neurol 420:437–444.

Iwai-Takekoshi L, Ramos A, Schaler A, Weinreb S, Blazeski R, Mason C. 2016. Retinal pigment epithelial integrity is compromised in the developing albino mouse retina. J Comp Neurol 524:3696–3716.

Kaas JH. 2005. Serendipity and the Siamese cat: The discovery that genes for coat and eye pigment affect the brain. Ilar J 46:357–363.

Karlstrom RO, Trowe T, Klostermann S, Baier H, Brand M, Crawford AD, Grunewald B, Haffter P, Hoffmann H, Meyer SU, Muller BK, Richter S, van Eeden FJ, Nusslein-Volhard C, Bonhoeffer F. 1996. Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. Development 123:427–438.

Kaule FR, Wolynski B, Gottlob I, Stadler J, Speck O, Kanowski M, Meltendorf S, Behrens-Baumann W, Hoffmann MB. 2014. Impact of chiasma opticum malformations on the organization of the human ventral visual cortex. Hum Brain Mapp 35:5093–5105.

Kim PC, Mo R, Hui Cc C. 2001. Murine models of VACTERL syndrome: Role of sonic hedgehog signaling pathway. J Pediatr Surg 36:381–384.

Kim N, Min KW, Kang KH, Lee EJ, Kim H-T, Moon K, Choi J, Le D, Lee S-H, Kim JW. 2014. Regulation of retinal axon growth by secreted Vax1 homeodomain protein. eLife 3:e02671.

Kruger K, Tam AS, Lu C, Sretavan DW. 1998. Retinal ganglion cell axon progression from the optic chiasm to initiate optic tract development requires cell autonomous function of GAP-43. J Neurosci 18:5692–5705.

Kuwajima T, Yoshida Y, Takegahara N, Petros TJ, Kumanogoh A, Jessell TM, Sakurai T, Mason C. 2012. Optic chiasm presentation of Semaphorin6D in the context of Plexin-A1 and Nr-CAM promotes retinal axon midline crossing. Neuron 74:676–690.

Lambot MA, Depasse F, Noel JC, Vanderhaeghen P. 2005. Mapping labels in the human developing visual system and the evolution of binocular vision. J Neurosci 25:7232–7237.

Lavado A, Jeffery G, Tovar V, de la Villa P, Montoliu L. 2006. Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin. J Neurochem 96:1201–1211.

Lee R, Petros TJ, Mason CA. 2008. Zic2 regulates retinal ganglion cell axon avoidance of ephrinB2 through inducing expression of the guidance receptor EphB1. J Neurosci 28:5910–5919.

Lopez VM, Decatur CL, Stamer WD, Lynch RM, McKay BS. 2008. L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. PLoS Biol 6:e236.

Lund RD, Land PW, Boles J. 1980. Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in rats: An HRP study in adults. J Comp Neurol 189:711–720.

Macdonald R, Scholes J, Strahle U, Brennan C, Holder N, Brand M, Wilson SW. 1997. The Pax protein Noi is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain. Development 124:2397–2408.

Marcos S, Nieto-Lopez F, Sandonìs A, Cardozo MJ, Di Marco F, Esteve P, Bovolenta P. 2015. Secreted frizzled related proteins modulate pathfinding and fasciculation of mouse retina ganglion cell axons by direct and indirect mechanisms. J Neurosci 35:4729–4740.

Marcus RC, Mason CA. 1995. The first retinal axon growth in the mouse optic chiasm: Axon patterning and the cellular environment. J Neurosci 15:6389–6402.

Marcus RC, Wang LC, Mason CA. 1996. Retinal axon divergence in the optic chiasm: Midline cells are unaffected by the albino mutation. Development 122:859–868.

Mason CA, Wang LC. 1997. Growth cone form is behavior-specific and, consequently, position-specific along the retinal axon pathway. J Neurosci 17:1086–1100.

Montoliu L, Gronskov K, Wei AH, Martinez-Garcia M, Fernandez A, Arveiler B, Morice-Picard F, Riazuddin S, Suzuki T, Ahmed ZM, Rosenberg T, Li W. 2014. Increasing the complexity: New genes and new types of albinism. Pigm Cell Melanoma Res 27:11–18.

Morin LP, Studholme KM. 2014. Retinofugal projections in the mouse. J Comp Neurol 522:3733–3753.

Nakagawa S, Brennan C, Johnson KG, Shewan D, Harris WA, Holt CE. 2000. Ephrin-B regulates the Ipsilateral routing of retinal axons at the optic chiasm. Neuron 25: 599–610.

Oetting WS. 1999. Albinism. Curr Opin Pediatr 11:565–571.

Osterhout JA, Josten N, Yamada J, Pan F, Wu SW, Nguyen PL, Panagiotakos G, Inoue YU, Egusa SF, Volgyi B, Inoue T, Bloomfield SA, Barres BA, Berson DM, Feldheim DA, Huberman AD. 2011. Cadherin-6 mediates axon-target matching in a non-image-forming visual circuit. Neuron 71:632–639.

Osterhout Jessica A, El-Danaf Rana N, Nguyen Phong L, Huberman AD. 2014. Birthdate and outgrowth timing predict cellular mechanisms of axon target matching in the developing visual pathway. Cell Rep 8:1006–1017.

Osterhout JA, Stafford BK, Nguyen PL, Yoshihara Y, Huberman AD. 2015. Contactin-4 mediates axon-target specificity and functional development of the accessory optic system. Neuron 86:985–999.

Pak W, Hindges R, Lim YS, Pfaff SL, O'Leary DD. 2004. Magnitude of binocular vision controlled by islet-2 repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. Cell 119:567–578.

Palmisano I, Bagnato P, Palmigiano A, Innamorati G, Rotondo G, Altimare D, Venturi C, Sviderskaya EV, Piccirillo R, Coppola M, Marigo V, Incerti B, Ballabio A, Surace EM, Tacchetti C, Bennett DC, Schiaffino MV. 2008. The ocular albinism type 1 protein, an intracellular G protein-coupled receptor, regulates melanosome transport in pigment cells. Hum Mol Genet 17:3487–3501.

Petros TJ, Rebsam A, Mason CA. 2008. Retinal axon growth at the optic chiasm: To cross or not to cross. Annu Rev Neurosci 31:295–315.

Petros TJ, Shrestha BR, Mason C. 2009. Specificity and sufficiency of EphB1 in driving the ipsilateral retinal projection. J Neurosci 29:3463–3474.

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.

Poulter JA, Al-Araimi M, Conte I, van Genderen MM, Sheridan E, Carr IM, Parry DA, Shires M, Carrella S, Bradbury J, Khan K, Lakeman P, Sergouniotis PI, Webster AR, Moore AT, Pal B, Mohamed MD, Venkataramana A, Ramprasad V, Shetty R, Saktivel M, Kumaramanickavel G, Tan A, Mackey DA, Hewitt AW, Banfi S, Ali M, Inglehearn CF, Toomes C. 2013. Recessive mutations in SLC38A8 cause foveal hypoplasia and optic nerve misrouting without albinism. Am J Hum Genet 93:1143–1150.

Prakash S, Dumoulin SO, Fischbein N, Wandell BA, Liao YJ. 2010. Congenital achiasma and see-saw nystagmus in VACTERL syndrome. J Neuro-Ophthalmol 30:45–48.

Prochiantz A, Di Nardo AA. 2015. Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. Neuron 85: 911–925.

Rachel RA, Dolen G, Hayes NL, Lu A, Erskine L, Nowakowski RS, Mason CA. 2002. Spatiotemporal features of early neuronogenesis differ in wild-type and albino mouse retina. J Neurosci 22:4249–4263.

Rebsam A, Petros TJ, Mason CA. 2009. Switching retinogeniculate axon laterality leads to normal targeting but abnormal eye-specific segregation that is activity dependent. J Neurosci 29:14855–14863.

Rebsam A, Bhansali P, Mason CA. 2012. Eye-specific projections of retinogeniculate axons are altered in albino mice. J Neurosci 32:4821–4826.

Roffler-Tarlov S, Liu JH, Naumova EN, Bernal-Ayala MM, Mason CA. 2013. L-Dopa and the albino riddle: Content of L-Dopa in the developing retina of pigmented and albino mice. PloS One 8:e57184.

Sanchez-Arrones L, Nieto-Lopez F, Sanchez-Camacho C, Carreres MI, Herrera E, Okada A, Bovolenta P. 2013. Shh/Boc signaling is required for sustained generation of ipsilateral projecting ganglion cells in the mouse retina. J Neurosci 33:8596–8607.

Sánchez-Camacho C, Bovolenta P. 2008. Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. Development (Cambridge, England) 135:3531–3541.

Sanes JR, Masland RH. 2015. The types of retinal ganglion cells: Current status and implications for neuronal classification. Annu Rev Neurosci 38:221–246.

Schmolesky MT, Wang Y, Creel DJ, Leventhal AG. 2000. Abnormal retinotopic organization of the dorsal lateral geniculate nucleus of the tyrosinase-negative albino cat. J Comp Neurol 427:209–219.

Seth A, Culverwell J, Walkowicz M, Toro S, Rick JM, Neuhauss SC, Varga ZM, Karlstrom RO. 2006. belladonna/(Ihx2) is required for neural patterning and midline axon guidance in the zebrafish forebrain. Development 133:725–735.

Shanmugalingam S, Houart C, Picker A, Reifers F, Macdonald R, Barth A, Griffin K, Brand M, Wilson SW. 2000. Ace/Fgf8 is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. Development 127:2549–2561.

Simon DK, O'Leary DD. 1992. Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. J Neurosci 12:1212–1232.

Slavotinek AM, Chao R, Vacik T, Yahyavi M, Abouzeid H, Bardakjian T, Schneider A, Shaw G, Sherr EH, Lemke G, Youssef M, Schorderet DF. 2012. VAX1 mutation associated with microphthalmia, corpus callosum agenesis, and orofacial clefting: The first description of a VAX1 phenotype in humans. Hum Mutat 33:364–368.

Soares CA, Mason CA. 2015. Transient ipsilateral retinal ganglion cell projections to the brain: Extent, targeting, and disappearance. Dev Neurobiol 75:1385–1401.

Sretavan DW. 1990. Specific routing of retinal ganglion cell axons at the mammalian optic chiasm during embryonic development. J Neurosci 10:1995–2007.

Sretavan DW, Reichardt LF. 1993. Time-lapse video analysis of retinal ganglion cell axon pathfinding at the mammalian optic chiasm: Growth cone guidance using intrinsic chiasm cues. Neuron 10:761–777.

Sretavan DW, Kruger K. 1998. Randomized retinal ganglion cell axon routing at the optic chiasm of GAP-43-deficient mice: Association with midline recrossing and lack of normal ipsilateral axon turning. J Neurosci 18: 10502–10513.

Sretavan DW, Feng L, Puré E, Reichardt LF. 1994. Embryonic neurons of the developing optic chiasm express L1 and CD44, cell surface molecules with opposing effects on retinal axon growth. Neuron 12:957–975.

Sretavan DW, Puré E, Siegel MW, Reichardt LF. 1995. Disruption of retinal axon ingrowth by ablation of embryonic mouse optic chiasm neurons. Science (New York, N.Y.) 269:98–101.

Su J, Haner CV, Imbery TE, Brooks JM, Morhardt DR, Gorse K, Guido W, Fox MA. 2011. Reelin is required for

class-specific retinogeniculate targeting. J Neurosci 31: 575–586.

Sun LO, Brady CM, Cahill H, Al-Khindi T, Sakuta H, Dhande OS, Noda M, Huberman AD, Nathans J, Kolodkin AL. 2015. Functional assembly of accessory optic system circuitry critical for compensatory eye movements. Neuron 86:971–984.

Tarpey P, Thomas S, Sarvananthan N, Mallya U, Lisgo S, Talbot CJ, Roberts EO, Awan M, Surendran M, McLean RJ, Reinecke RD, Langmann A, Lindner S, Koch M, Jain S, Woodruff G, Gale RP, Bastawrous A, Degg C, Droutsas K, Asproudis I, Zubcov AA, Pieh C, Veal CD, Machado RD, Backhouse OC, Baumber L, Constantinescu CS, Brodsky MC, Hunter DG, Hertle RW, Read RJ, Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Teague J, Wooster R, Futreal PA, Trembath RC, Stratton MR, Raymond FL, Gottlob I. 2006. Mutations in FRMD7, a newly identified member of the FERM family, cause X-linked idiopathic congenital nystagmus. Nat Genet 38:1242–1244.

Tian NM, Pratt T, Price DJ. 2008. Foxg1 regulates retinal axon pathfinding by repressing an ipsilateral program in nasal retina and by causing optic chiasm cells to exert a net axonal growth-promoting activity. Development 135: 4081–4089.

Tillo M, Erskine L, Cariboni A, Fantin A, Joyce A, Denti L, Ruhrberg C. 2015. VEGF189 binds NRP1 and is sufficient for VEGF/NRP1-dependent neuronal patterning in the developing brain. Development 142:314–319.

Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P. 1996. Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. Development 122:3381–3391.

Traber GL, Chen CC, Huang YY, Spoor M, Roos J, Frens MA, Straumann D, Grimm C. 2012. Albino mice as an animal model for infantile nystagmus syndrome. Investig Ophthalmol Vis Sci 53:5737–5747.

Upton AL, Ravary A, Salichon N, Moessner R, Lesch KP, Hen R, Seif I, Gaspar P. 2002. Lack of 5-HT(1B) receptor and of serotonin transporter have different effects on the segregation of retinal axons in the lateral geniculate nucleus compared with the superior colliculus. Neuroscience 111:597–610.

Victor JD, Apkarian P, Hirsch J, Conte MM, Packard M, Relkin NR, Kim KH, Shapley RM. 2000. Visual function and brain organization in non-decussating retinal-fugal fibre syndrome. Cereb Cortex 10:2–22.

Wang L-C, Dani J, Godement P, Marcus RC, Mason CA. 1995. Crossed and uncrossed retinal axons respond differently to cells of the optic chiasm midline in vitro. Neuron 15:1349–1364.

Wang L-C, Rachel RA, Marcus RC, Mason CA. 1996. Chemosuppression of retinal axon growth by the mouse optic chiasm. Neuron 17:849–862.

Wang L, Lam JS-Y, Zhao H, Wang J, Chan S-O. 2014. Localization of protein kinase C isoforms in the optic pathway of mouse embryos and their role in axon routing at the optic chiasm. Brain Res 1575:22–32.

Watabe H, Valencia JC, Yasumoto K, Kushimoto T, Ando H, Muller J, Vieira WD, Mizoguchi M, Appella E, Hearing VJ. 2004. Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity. J Biol Chem 279:7971–7981.

Watkins RJ, Patil R, Goult BT, Thomas MG, Gottlob I, Shackleton S. 2013. A novel interaction between FRMD7 and CASK: Evidence for a causal role in idiopathic infantile nystagmus. Hum Mol Genet 22:2105–2118.

Williams RW, Hogan D, Garraghty PE. 1994. Target recognition and visual maps in the thalamus of achiasmatic dogs. Nature 367:637–639.

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

Williams SE, Grumet M, Colman DR, Henkemeyer M, Mason CA, Sakurai T. 2006. A Role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. Neuron 50:535–547.

Yonehara K, Fiscella M, Drinnenberg A, Esposti F, Trenholm S, Krol J, Franke F, Scherf BG, Kusnyerik A, Muller J, Szabo A, Juttner J, Cordoba F, Reddy AP, Nemeth J, Nagy ZZ, Munier F, Hierlemann A, Roska B. 2016. Congenital nystagmus gene frmd7 is necessary for establishing a neuronal circuit asymmetry for direction selectivity. Neuron 89:177–193.

Young TR, Bourke M, Zhou X, Oohashi T, Sawatari A, Fassler R, Leamey CA. 2013. Ten-m2 is required for the generation of binocular visual circuits. J Neurosci 33: 12490–12509.

Zhang F, Lu C, Severin C, Sretavan DW. 2000. GAP-43 mediates retinal axon interaction with lateral diencephalon cells during optic tract formation. Development 127: 969–980.

Nouveau rôle de la Sémaphorine 6D et de son récepteur Plexine-A1 dans le ciblage des axones rétiniens

Résumé :

Durant le développement, l'innervation d'une zone précise du cerveau par certaines branches axonales est un mécanisme encore mal compris. Afin d'aborder cette question, je me suis intéressée aux axones rétiniens qui innervent deux cibles principales du système visuel : le corps genouillé latéral dorsal (CGLd) et le colliculus supérieur. J'ai étudié le rôle de la protéine de guidage Sémaphorine 6D et de son récepteur Plexine-A1 dans l'innervation spécifique du CGLd par les axones rétiniens.

J'ai ainsi découvert que chez les souris Sema6D-/- et Plexine-A1-/-, le tractus optique (formé par les axones rétiniens) entre dans le CGLd au lieu de le contourner et certains axones rétiniens innervent des régions ectopiques de l'autre côté du tractus optique. De plus, l'analyse des souris simple ou double hétérozygotes indique que ces deux protéines interagissent avec un mécanisme dose-dépendant. Grâce à des expériences de perte et de gain de fonction par électroporation rétinienne in utero, j'ai pu montrer la nécessité de Sema6D et de Plexine-A1 dans la rétine pour l'innervation des axones rétiniens et ce via des effets non-cellulaire autonomes.

Ces résultats révèlent un mécanisme dose-dépendant dans lequel Sema6D et Plexine-A1 interagissent et assurent une communication axone-axone permettant l'innervation précise du CGLd par une sous-population d'axones rétiniens.

Mots clés : Sémaphorine, Plexine, système visuel, interaction axone-axone, ciblage, dose-dépendance

Deciphering a new role for Semaphorin 6D and its receptor Plexin-A1 in retinal axon targeting

Abstract :

During development, axons branch at precise points to innervate a specific brain target, yet the mechanisms at hand are still unclear. To address this question, I used retinal axons forming the optic tract that innervate two principal targets of the visual system: the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) and the superior colliculus. I investigated the role of the guidance receptor Plexin-A1and its ligand Semaphorin-6D (Sema6D) in this targeting process.

Here I highlight a new type of phenotype in Plexin-A1$^{-/-}$ or Sema6D$^{-/-}$ mice. In these mice, the optic tract enters in the dLGN instead of circumscribing it and some retinal axons innervate ectopic regions at the other side of the optic tract. Furthermore, the analysis of simple or double heterozygotes mice reveals that Plexin-A1 and Sema6D interact together with a dose-dependent effect. Using loss and gain of function experiments (via retinal *in utero* electroporation), I showed that both are necessary in the retina for proper retinal innervation through non-cell autonomous effects.

All these results reveal for the first time a dose-dependent mechanism, in which Sema6D and Plexin-A1 interact together. They monitor axon-axon communication to allow the correct innervation of the dLGN by a subpopulation of retinal axons.

Keywords: Semaphorin, Plexin, Visual system, axon-axon interaction, targeting, dose-dependent