



HAL
open science

Rôle de la Laminine $\gamma 1$ dans la morphogenèse de la placode olfactive et le développement des axones olfactifs

Pénélope Tignard

► To cite this version:

Pénélope Tignard. Rôle de la Laminine $\gamma 1$ dans la morphogenèse de la placode olfactive et le développement des axones olfactifs. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS742 . tel-04620352

HAL Id: tel-04620352

<https://theses.hal.science/tel-04620352>

Submitted on 21 Jun 2024

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 Complexité du Vivant (ED515)

Institut de Biologie Paris Seine

Laboratoire de Biologie du Développement /

Equipe Forces mécaniques et développement du système nerveux

Laboratoire Neurosciences Paris Seine /

Equipe Développement et plasticité des réseaux neuronaux

Rôle de la Laminine $\gamma 1$ dans la morphogénèse de la placode olfactive et le développement des axones olfactifs

Par Pénélope Tignard

Thèse de doctorat Sciences de la Vie

Dirigée par Marie Breau et Alain Trembleau

Présentée publiquement le 17 Mai 2023

Devant un jury composé de :

BREAU Marie, Chargée de recherche INSERM, directrice de thèse

DAVID Nicolas, Chargé de recherche CNRS, rapporteur

REBSAM Alexandra, Chargée de recherche INSERM, examinatrice

RETAUX Sylvie, Directrice de recherche CNRS, examinatrice et présidente du jury

RUGGIERO Florence, Directrice de recherche CNRS, rapportrice

TREMBLEAU Alain, Professeur des universités, co-directeur de thèse

A mes proches

*“Sans la curiosité de l’esprit que serions-nous ?
Telle est bien la beauté et la noblesse de la science :
désir sans fin de repousser les frontières du savoir,
de traquer les secrets de la matière et de la vie
sans idée préconçue des conséquences éventuelles”*

Marie Curie

Remerciement

Tout d'abord j'aimerais remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse : Florence Ruggiero, Nicolas David, Sylvie Rétaux et Alexandra Rebsam.

Merci à Marie et Alain de m'avoir fait confiance dès le stage de master 2 pour réaliser un projet de thèse. Merci pour votre soutien durant ces quatre années de travail et surtout de votre accompagnement, notamment lors du covid et du changement de sujet qui n'ont pas été des moments faciles.

Merci Marie de m'avoir accueillie dans ton laboratoire et de m'avoir montré et appris comment fonctionnait un laboratoire de biologie du développement. Tu as toujours su trouver le temps pour m'aider, me rassurer, me relire même quand tu avais énormément de travail de ton côté. Ça a été vraiment incroyable de faire partie de ton équipe dans laquelle tu as instauré une ambiance bienveillante et pleine d'entraide.

Merci Alain pour toute l'aide que tu m'as apportée pendant tout le doctorat. Merci pour les conseils avant les présentations, les nombreuses relectures et de manière générale l'implication que tu as eu. Merci aussi pour tous les mots d'encouragement qui m'ont motivée pendant la fin de la rédaction.

J'aimerais remercier tous les membres actuels et passés de l'équipe de Marie. Merci Karen d'avoir été un vrai pilier durant cette thèse autant sur le plan scientifique que personnel. Merci de m'avoir aidée pour le manuscrit, les expériences, les moments de doutes mais aussi pour tous les moments plus légers ; les pauses, qu'elles soient en vrai ou par téléphone les jours de télétravail, les tentatives de compréhension des chansons d'Anissa (« tu hors de ma vue » reste un mystère aujourd'hui), et les moments de douceur quand tu parles de ta fille. Tu as été d'un soutien sans faille depuis le premier jour. Merci Pauline de m'avoir intégrée dans l'équipe, de ton support et de ton amitié qui continue même après la thèse. Tu as toujours été une oreille à l'écoute, j'espère qu'on continuera à aller boire des bières et parler de nos dernières aventures. Merci Clara de m'avoir écoutée raconter mes histoires aussi bêtes soient elles, de m'avoir soutenu et d'être toujours positive (même quand tu oublies de mettre tes embryons à 33°C le soir). J'ai hâte de te voir remettre le feu au dancefloor cet été. Merci Marion pour les discussions scientifiques, les conseils et mots d'encouragement au moment

de la rédaction. Merci Mélody, notre lab manager qui rend les expériences si simples à réaliser. Merci également à tous les anciens membres, Camille pour ta bonne humeur, Méлина pour nos discussions de petites stagiaires et aussi tes gâteaux incroyables.

Je remercie également tous les membres de l'équipe d'Alain. Merci Mohamed pour l'aide apportée lors des analyses statistiques. Merci Mathilde pour les analyses de microscopie électronique. Merci à Caroline, aux deux Isabelles et à Oriane T, à Marie Pierre, à Ada et à Théo d'avoir assisté à plusieurs présentations de mes travaux et pour leurs remarques pertinentes. Merci aux anciens thésards Maxime, Julie et Oriane P pour vos conseils et votre soutien lors du passage du concours de l'ED et le début de la thèse. Merci aussi à Coralie, même si nos expériences de transplantation n'ont jamais rien donné j'ai adoré travailler avec toi. Enfin merci Salima, même si on ne travaillait pas ensemble au quotidien, on a toujours été là l'une pour l'autre. Merci pour ton soutien, les pauses café, les appels pendant le confinement. Maintenant qu'on est presque voisine on a intérêt à continuer à se voir.

Je voudrais aussi remercier l'équipe de Sylvie avec qui nous partageons beaucoup. Merci Sylvie pour tes commentaires constructifs, merci Christine pour nos discussions sur le sud-ouest et tes questions pertinentes lors de mes présentations, merci Isabelle, Laura et Pierre-Luc pour votre bonne humeur. Merci Martin de partager tes connaissances de tous les domaines lors de tes passages au laboratoire. Merci Aline, même si tu as toujours l'air débordée, tu gères et j'espère qu'on va finir par boire ce verre ! Merci à Antoine, ancien doctorant, de m'avoir soutenu pendant tout mon stage de master 2 et de m'avoir fait goûter les mousses au chocolat vegan. Merci Ludovica pour tous les moments partagés pendant les pauses déjeuner à la cafet. Merci Amina pour ton énergie et ta gaieté. Merci Antonia de nous faire partager tes traditions allemandes dont je serai incapable de prononcer les noms. Et enfin merci Morgane, on a commencé notre thèse le même jour dans le même bureau et nous voilà 3 ans et demi plus tard, dans 1 mois ça sera ton tour je sais que tu vas gérer ça comme une cheffe. J'ai adoré traverser cette "épreuve" avec toi, on a chacune eu des hauts et des bas mais on a toujours su se soutenir pour aller de l'avant et tu as été d'une aide et d'une amitié incroyables.

Je remercie également Alexis d'être le pro de la compréhension des CRISPR et autres expériences de génomique, sans toi je serais encore bien perdue au milieu des mes génotypages. Et merci surtout d'être venu squatter les pauses café pour me faire stresser (gentiment) pendant à peu près toute ma thèse.

Je voudrais également remercier tous les membres anciens et actuels de l'IBPS avec qui on se lie au fur et à mesure des années : Pénélope, Tom, Jennifer, Raphaëlle, Matthieu, Béatrice, Ronan, Sylvie, Giovanna, Jonathan. Un grand merci à Johnny pour tes conseils et tous les moments partagés ensemble, ça a été une chance de te rencontrer. Un merci particulier aux gestionnaires qui sont d'une efficacité redoutable et aux personnels de la laverie qui ont toujours un mot encourageant pour la journée.

Merci l'IDPA, Associations des Doc et Post-doc de l'IBPS. Ca a été très enrichissant d'être la trésorière pendant 3 ans même si le covid n'a pas rendu les choses faciles. Merci aux membres originaux et à ceux qui se sont rajoutés par la suite : Baptiste, Antoine, Agathe, Marc, Simon, Jonas, Agnès, Nolwenn, Théo, Judith, Cuong et encore d'autres. Merci de continuer à faire vivre l'association avec de supers projets.

J'aimerais aussi remercier les différentes plateformes de l'IBPS. L'animalerie aquatique : Alex, Karim, Marco, Jeremy, Edouard, Sylvie et Stéphane ; la plateforme d'imagerie : France, Chloé, Susanne, Jean-François, la plateforme de microscopie électronique : Audrey, Alexis et Michael et la plateforme d'illustration : Sophie.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse pour avoir suivi l'avancement de mes travaux pendant 3 ans et demi et de m'avoir apporté des commentaires et idées très intéressantes lors des différents comités : Coralie Fassier, Jérémy Salle et Sonia Garel.

Enfin j'aimerais remercier toute ma famille et mes amis qui pour la plupart n'appartiennent pas au domaine scientifique. Merci à Evelyne et Laurent, Jason, Virgile, Marie-Ju, Valentine et au reste de ma famille pour leur soutien. Merci à mes amies Marina, Elodie, Emmanuelle et Mélanie R pour vos mots d'encouragement surtout sur la fin de rédaction du manuscrit. Merci à mon équipe des « mouettes » de m'avoir permis de me défouler dans la piscine. Merci à toutes les personnes qui m'ont entouré pendant ces quatre années : Marie, Maryam, Mélanie B et Adèle de la team Joder et ainsi que tous les autres : Morgane, Valentin, Manon, Matthieu, Sarah, Maxime, Camille, Vianney, Caroline, Hugo, Lili, Pierrick, Cédric, Malaurie et tous ceux que j'oublie. En dernier, je souhaite remercier Thibaut, qui je pense, n'a toujours

pas exactement compris mon sujet d'étude mais qui m'a toujours soutenu, du début à la fin de cette thèse, et qui m'a aidé à prendre confiance en moi.

Rôle de la Laminine $\gamma 1$ dans la morphogenèse de la placode olfactive et le développement des axones olfactifs

Résumé :

La Laminine est l'un des composants majeurs de la matrice extracellulaire (MEC) et est essentielle à l'assemblage des membranes basales. C'est une protéine hétérotrimérique composée d'une chaîne α , d'une chaîne β et d'une chaîne γ dont l'assemblage peut former jusqu'à 20 isoformes différentes. Les Laminines s'associent avec d'autres composants des membranes basales tels que le Nidogène ou le Collagène IV pour assurer des rôles structuraux et biomécaniques. Elles assurent également un rôle signalétique en interagissant avec des récepteurs à la surface des cellules comme les Intégrines, leur récepteur principal, ou le Dystroglycan.

L'une des premières isoformes à apparaître au cours du développement est l'isoforme $\alpha 1\beta 1\gamma 1$. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé des poissons-zèbres *sleepy (sly)*, mutés pour la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine, afin d'étudier son rôle dans le développement du système olfactif. Le développement du système olfactif chez le poisson-zèbre implique des mouvements morphogénétiques qui vont former la placode olfactive par un processus de coalescence, ainsi que la croissance des axones olfactifs qui naviguent de la placode vers le bulbe olfactif, tandis que l'ensemble de la tête de l'embryon subit un mouvement général de flexure. Lors de leur navigation vers le bulbe olfactif, les axones sortent de la placode par son point de sortie, migrent dorsalement entre les membranes basales entourant les placodes et le cerveau puis pénètrent dans le cerveau via un point d'entrée avant de poursuivre leur navigation vers la zone présomptive du bulbe olfactif.

Grâce à des expériences d'immunofluorescence pour différents marqueurs des membranes basales ainsi que de microscopie électronique, nous avons montré qu'en absence de la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine, l'intégrité des membranes basales présentes autour du cerveau et des placodes olfactives est fortement perturbée. Mes analyses, mettant à profit l'utilisation de lignées transgéniques pour visualiser la mise en place de la placode olfactive ainsi que l'extension des axones olfactifs, montrent qu'aux stades de coalescence de la placode olfactive, l'absence de Laminine n'induit pas de défaut majeur, si ce n'est un positionnement de la placode légèrement décalé antérieurement qui pourrait être engendré par le déplacement antérieur du cerveau adjacent. A la suite de la coalescence, lors du mouvement de flexure du cerveau, l'absence de Laminine provoque un étirement des placodes olfactives selon l'axe de

la flexure et une augmentation du nombre de cellules ectopiques autour des placodes. Les deux placodes se rapprochent médialement, réduisant la taille du cerveau et rendant floue et courbée la démarcation entre le cerveau et les placodes olfactives. La navigation des axones sensoriels olfactifs est elle aussi perturbée : certains axones sortent des placodes olfactives de manière ectopique, dorsalement par rapport au point normal de sortie, leur trajectoire est anormale et la plupart d'entre eux ne parviennent pas à atteindre le bulbe olfactif. Dans des expériences préliminaires, nous avons commencé à développer des approches visant à identifier les mécanismes en jeu dans ces régulations, en ciblant notamment le Collagène IV, dont la distribution est fortement perturbée chez les mutants *sly*, ainsi que les Intégrines, récepteurs principaux de la Laminine.

Pour conclure, mes résultats mettent en évidence de nouveaux rôles pour la Laminine et les membranes basales dans le développement du système olfactif du poisson-zèbre, dans le maintien de la forme des placodes olfactives, dans la délimitation de la frontière entre le cerveau et les placodes, ainsi que dans la navigation des axones olfactifs vers le bulbe olfactif.

Mots clés : Laminine, Système olfactif, Développement, Poisson-zèbre, Navigation axonale

Role of Laminin $\gamma 1$ in olfactory placode morphogenesis and olfactory axon development

Abstract :

Laminin is one of the major components of the extracellular matrix (ECM), and is essential for basement membrane assembly. It is a heterotrimeric protein composed of one α , one β and one γ chain that assemble to form at least 20 different isoforms. Laminins interact with other basement membrane components such as Nidogen or Collagen IV to fulfill structural and biomechanical roles. They also achieve a signaling role by interacting with cell surface receptors such as Integrins, their main receptor, or Dystroglycan.

One of the first Laminin isoform to appear during development is the $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ isoform. During my PhD, I took advantage of the mutant zebrafish *sleepy (sly)* which is mutated for the $\gamma 1$ chain of Laminin, to study its role along the development of the olfactory sensory system, which involves morphogenetic movements that shape the olfactory placode through placodal cell coalescence, and the navigation of the olfactory sensory axons towards the olfactory bulb in the brain. While the axons are navigating, a general flexure of the head of the embryo occurs. To reach the olfactory bulb, olfactory axons exit the olfactory placode through an exit point, navigate dorsally between the two basement membranes surrounding the brain and the olfactory placode, penetrate the brain through an entry point and continue their navigation dorsally.

We performed immunofluorescence experiments for different markers of the basement membrane as well as electron microscopy and showed that, in the absence of the $\gamma 1$ chain of the Laminin, the integrity of basement membranes surrounding the olfactory placode and the brain is strongly affected. Through the analysis of transgenic lines allowing the visualization of the olfactory placode and the axonal growth in mutant and wild-type contexts, we show that the absence of Laminin does not induce major defects during the coalescence stage, except for an anterior shift of the olfactory placodes that might be dragged by the anterior movement of adjacent brain cells at this stage. On the other hand, after the coalescence, during the flexure movement that has a major dorso-ventral component, the lack of Laminin induces an elongation of the olfactory placodes in the dorso-ventral axis and an increase of scattered ectopic cells around them. The two olfactory placodes also tend to move medially, decreasing the size of the brain and affecting the boundary between the two tissues, which appears more curved and fuzzy. Olfactory axon behavior is also perturbed as we saw that,

without Laminin, those axons do not navigate properly towards the olfactory bulb. Our results show that only a subset of the axons manage to grow out of the placode, exiting it ectopically in a dorsal area, and that their trajectories are less directional. In preliminary experiments, we began to address the molecular mechanisms implicated in these processes, by targeting Collagen IV, another basement membrane component whose distribution is dramatically altered in the *sl*y mutant, and Integrins, as the main Laminin receptors.

In conclusion, my results document new roles for Laminin and basement membranes in the development of the olfactory system of the zebrafish. Those roles include maintaining the shape of the olfactory placode, establishing a boundary between the brain and the placodes, and participating in the navigation of olfactory axons towards the olfactory bulb.

Key words : Laminin, Olfactory system, Development, Zebrafish, Axon navigation

Rôle de la Laminine dans la mise en place du système olfactif chez le poisson-zèbre

Résumé vulgarisé :

Les cellules de l'organisme sont entourées d'un réseau de longues molécules appelé matrice extracellulaire (MEC) qui est cruciale pour le bon développement et la survie des cellules. Dans ma thèse, je me suis concentrée sur un composant de la MEC appelé la Laminine, et j'ai étudié son rôle dans le développement du système sensoriel olfactif, qui est caractérisé par des mouvements des neurones sensoriels olfactifs dans l'embryon et la croissance de longs prolongements neuronaux appelés axones qui vont transmettre les informations olfactives au cerveau. Pour cela j'ai utilisé les poissons-zèbres qui sont transparents, permettant ainsi de visualiser facilement les différents composants du système olfactif au cours du développement. Mes résultats montrent que la Laminine permet de maintenir la forme du tissu olfactif pendant que des mouvements généraux de la tête des embryons ont lieu et qu'elle aide à la croissance des axones olfactifs vers leur cible dans le cerveau.

Table des matières

Remerciement	6
Résumé en français	10
Résumé en anglais	12
Résumé vulgarisé	14
Table des matières	16
Liste des abréviations	20
Introduction	22
I La Laminine, un composant majeur des membranes basales	24
I.1 Gènes codant pour la Laminine	25
I.2 Structure, polymérisation et expression de la Laminine	27
I.2.1 Structure de la Laminine	27
I.2.2 Rôle des différents domaines de la Laminine dans la polymérisation	29
I.2.3 Expression de la Laminine	30
I.2.3.a Expression tissulaire de la Laminine	30
I.2.3.b Expression de la Laminine dans le système nerveux	33
I.3 Autres composants des membranes basales	34
I.3.1 Le Collagène IV	34
I.3.1.a Structure du Collagène	34
I.3.1.b Les différents types de Collagènes	36
I.3.1.c Les récepteurs du Collagène	38
I.3.1.d Rôles du Collagène	39
I.3.2 Le Nidogène	40
I.3.2.a Structure du Nidogène	40
I.3.2.b Expression du Nidogène	41
I.3.2.c Interactions du Nidogène avec les autres composants de la MEC	43
I.3.2.d Fonctions du Nidogène	43
I.3.3 Les protéoglycans	44
I.3.3.a Le Perlécan	44
I.3.3.b L'Aggrine	45
I.3.2.c Le Collagène XVIII/XV	46
	16

I.4 Les récepteurs de la Laminine	46
I.4.1 Les Intégrines	46
I.4.1.a Structure des Intégrines	47
I.4.1.b Signalisation et activation	48
I.4.1.c Expression des Intégrines	50
I.4.1.d Les ligands des Intégrines	51
I.4.1.e Fonctions des Intégrines	52
I.4.2 Le Dystroglycan	53
I.4.2.a Structure du Dystroglycan	53
I.4.2.b Expression du Dystroglycan	55
I.4.2.c Fonctions du Dystroglycan	56
I.4.3 Autres récepteurs de la Laminine	56
I.4.3.a Les Syndécans	57
I.4.3.b Le CD146	57
I.5 Rôles de la Laminine	58
I.5.1 Formation des membranes basales	58
I.5.2 Morphogenèse tissulaire et migration cellulaire	59
I.5.3 Différenciation cellulaire	61
I.5.4 Polarité cellulaire	64
I.5.4.a La polarité apico-basale	64
I.5.4.b La polarité neuronale	64
I.5.5 Migration neuronale	67
I.5.6 Croissance et navigation axonale	68
I.5.7 Rôle de la Laminine dans le système olfactif	70
II Le développement du système olfactif	72
II.1 Description générale du système olfactif : cas des mammifères et des insectes	72
II.1.1 L'organe sensoriel olfactif et les récepteurs olfactifs	72
II.1.2 Navigation des axones olfactifs vers le premier relai du système nerveux central	76
II.1.3 La règle un récepteur olfactif, un neurone sensoriel olfactif, un glomérule	78
II.1.4 Les neurones post-synaptiques du premier relai olfactif dans le système nerveux central	80
II.2 Le développement du système olfactif du poisson-zèbre	81

II.2.1 Morphogenèse de la placode olfactive	83
II.2.1.a Origine/spécification des placodes sensorielles	83
II.2.1.b Mouvements de coalescence des placodes olfactives	85
II.2.1.c Mécanismes régulant la coalescence des placodes olfactives	89
II.2.1.d Neurogenèse des OSN	93
II.2.1.e Étapes plus tardives de la morphogenèse de la placode olfactive	95
II.2.2 Croissance et navigation axonale	96
II.2.2.a L'extension rétrograde des axones dans la placode olfactive	100
II.2.2.b L'hypothèse des axones pionniers	101
II.2.2.c Rôle des molécules de guidage pendant la navigation des axones vers le bulbe olfactif	103
II.2.2.d Autres molécules impliquées dans le développement des axones	109
II.2.3 Innervation du bulbe olfactif	111
II.2.3.a Conservation chez le poisson-zèbre de la règle "un récepteur olfactif = un glomérule"	111
II.2.3.b Des protogglomérules aux glomérules	113
III Les objectifs de la thèse	116
Résultats	120
I Article Scientifique	122
II Résultats complémentaires	170
II.1 Perturbation du Collagène IV dans des embryons mutants sly et des embryons contrôles	170
II.2 Etude de l'implication des Intégrines et de leurs effecteurs	174
II.3 Tentative de sauvetage des mutants sly par l'expression du transgène lamC1:LamC1-sfGFP	179
II.4 Matériels et méthodes additionnels	181
Discussion et perspectives	184
Conclusion	196
Bibliographie	198
Liste des figures	218
Liste des tableaux	222

Liste des abréviations

α -DG : α -Dystroglycan	IR : récepteur ionotropique
β -DG : β -Dystroglycan	ISV : <i>intersegmental blood vessel</i>
3D : trois dimensions	KO : <i>knock out</i>
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	L4/LF : Laminine globulaire IV
AP : antero-postérieur	LE : <i>Laminin EGF-like</i>
aPKC : <i>atypical protein kinase C</i>	LG1-4 : glomérules latéraux 1-4
Bal : <i>bashful</i>	LG : Laminine globulaire
CA : constitutivement actif	LN : Laminine N-terminal
CZ : zone centrale	MEC : matrice extracellulaire
DCC : <i>deleted in colorectal cancer</i>	MG : glomérule médian
Domaine I : domaine d'Insertion	MHB : <i>midbrain hindbrain boundary</i>
DN : dominant négatif	ML : médio-latéral
DV : dorso-ventral	NCC : cellules de crêtes neurales
DZ : zone dorsale	nucMLF : noyau du faisceau longitudinal médian
EGF : <i>epidermal growth factor-like</i>	nucTPOC : noyau bilatéral du tractus ventral post-optique
ENU : <i>N-Ethyl-N-nitrosourea</i>	OB : bulbe olfactif
EON : neurones olfactifs précoces	OBP : <i>odor binding protein</i>
EP : <i>exit point</i>	OE : épithélium olfactif
EPL : couche plexiforme externe	OEC : cellules engainantes
FACIT : <i>fibril associated collagens with interrupted triple helices</i>	OMP : <i>olfactory marker protein</i>
FAK : <i>focal adhesion kinase</i>	ON : nerf olfactif
FBMN : <i>facial branchiomotor neuron</i>	ONL : couche du nerf olfactif
GAP : <i>GTPases activating protein</i>	OP : placode olfactive
GC : cônes de croissance	OR : récepteur olfactif
GEF : <i>guanine nucleotide exchange factor</i>	ORN : neurone récepteur olfactif
GFP : <i>green fluorescent protein</i>	OSN : neurone sensoriel olfactif
Gup : <i>grumpy</i>	PKA : protéine kinase A
Hpf : heures post fécondation	PPR : région pré-placodale
HS : héparan sulfate	RFP : <i>red fluorescent protein</i>
HSPG : héparan sulfate protéoglycan	RGC : <i>retinal ganglion cell</i>

RGD : acide arginine glycine aspartique

RMS : *rostral migration stream*

SEA : *sea urchin sperm protein
enterokinase and agrin*

Sly : *sleepy*

SNC : système nerveux central

TRPC2 : *transient receptor potential
cation channel subfamily C member 2b*

VR : récepteur voméronasal

WISH : *whole mount in situ hybridisation*

Introduction

Ma thèse a porté sur l'étude du rôle de la Laminine et des membranes basales dans le développement du système olfactif chez le poisson-zèbre. Dans cette introduction, je présenterai dans deux parties successives les principales données de bibliographie concernant la Laminine et les membranes basales, et le système olfactif.

Dans la première partie de l'introduction, je décrirai d'abord les différents composants des membranes basales en insistant particulièrement sur la Laminine. Ensuite je présenterai les principaux récepteurs impliqués dans la signalisation induite par les membranes basales. Enfin, je décrirai certains rôles connus de la Laminine dans différents modèles d'études. Dans la seconde partie de mon introduction, je présenterai le système olfactif en commençant par une description générale des systèmes olfactifs des mammifères et des insectes. Ensuite, je concentrerai mon propos sur le développement du système olfactif du poisson-zèbre, en expliquant la morphogenèse de la placode olfactive, la mise en place des axones sensoriels olfactifs et de leurs projections dans le bulbe olfactif.

I La Laminine, un composant majeur des membranes basales

La Laminine est un des composants majeurs de la matrice extracellulaire (MEC), un réseau de macromolécules qui occupe l'espace intercellulaire et qui est essentiel au développement des tissus (Willis et Crocker 2016; Nirwane et Yao 2019). Au-delà de son rôle structurel, la MEC joue aussi un rôle dans la signalisation cellulaire en fixant des facteurs de croissance (Walma et Yamada 2020). On retrouve deux classes majeures de MEC, les lames basales (ou membranes basales), et la MEC interstitielle composée principalement de Collagène, de Fibronectine, d'Elastine, de Laminine, de Ténascine et de Protéoglycans (Walma Cruz 2020). Les Laminines sont les composants principaux des membranes basales qui forment des barrières entre les différents compartiments tissulaires (Peter D. Yurchenco et O'Rear 1994). On retrouve ces membranes basales autour des épithéliums, du cerveau et de la moelle épinière, des fibres musculaires, des vaisseaux sanguins et des nerfs périphériques (Halfter et al. 2015). Elles séparent ces épithéliums du tissu connectif environnant. Même si la composition des lames basales varie en fonction de leur localisation et du stade de développement de l'organisme, quatre composants majeurs sont présents de manière ubiquitaire : la Laminine, le Collagène IV, le Nidogène et des protéoglycans (le Perlécan, l'Agrine et le Collagène XVIII/XV) (Fig.1) (Nirwane et Yao 2019; Halfter et al. 2015; Walma et Yamada 2020; Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012; Peter D. Yurchenco et O'Rear 1994). Parmi ces composants, seule la Laminine est absolument essentielle pour l'assemblage et la formation des membranes basales (Huang et al. 2003; Urbano et al. 2009; Miner et Yurchenco 2004; Nirwane et Yao 2019).

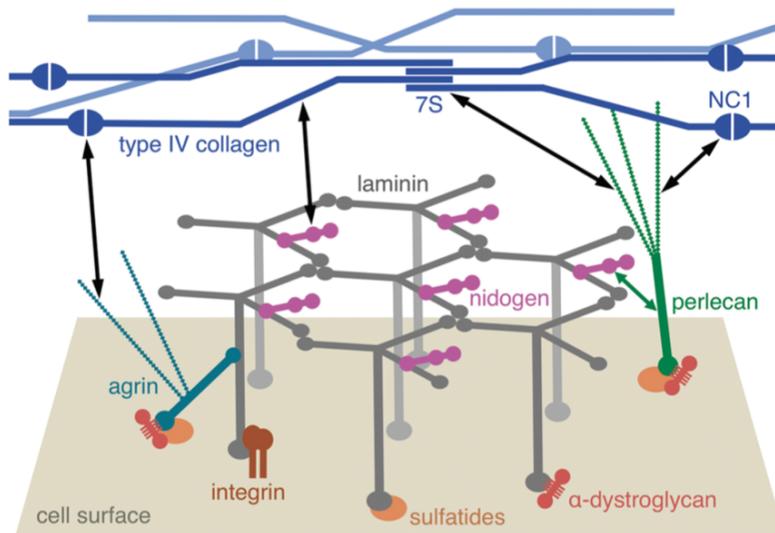


Figure 1 : Schéma représentant la structure et les principaux composants des membranes basales (tirée de Hohenester et Yurchenco 2013).

I.1 Gènes codant pour la Laminine

La famille des gènes codant pour les différentes chaînes de la Laminine (α , β et γ) provient de duplications répétées d'un gène ancestral unique (Sztal et al. 2011). Chez les vertébrés, on retrouve maintenant cinq gènes α (*lamA*), trois gènes γ (*lamC*) et trois à six gènes β (*lamB*) (quatre chez les mammifères uniquement) (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012; Nirwane et Yao 2019; Hohenester 2019). Les produits de ces gènes s'agencent en trimères $\alpha\beta\gamma$ (Hohenester 2019; Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012), formant dix-huit isoformes principales chez les mammifères (Durbeej 2010) ou seize chez les autres vertébrés (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012). Les trimères sont nommés selon les chaînes qui les composent. Par exemple, la Laminine 111 est composée des chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ (Fig.2) (Durbeej 2010; Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012).

D'autres trimères additionnels, issus d'un processus d'épissage alternatif des ARNm codant pour les chaînes de Laminine, ont également été mis en évidence (Miner et Yurchenco 2004). Les premiers trimères qui apparaissent au cours du développement des mammifères sont $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ et $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ (Li et al. 2003; Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012). Des invalidations génétiques de $\gamma 1$ ou $\beta 1$ empêchent la formation d'hétérotrimères et l'assemblage des premières membranes basales, provoquant une létalité embryonnaire précoce à E5.5 chez la souris (Smyth et al. 1999). En revanche, l'invalidation génétique d'autres composants des membranes basales provoque des défauts développementaux plus tardifs (à partir de E10) et n'empêche pas la formation de membranes basales dans la majorité des tissus (Hohenester et Yurchenco 2013).

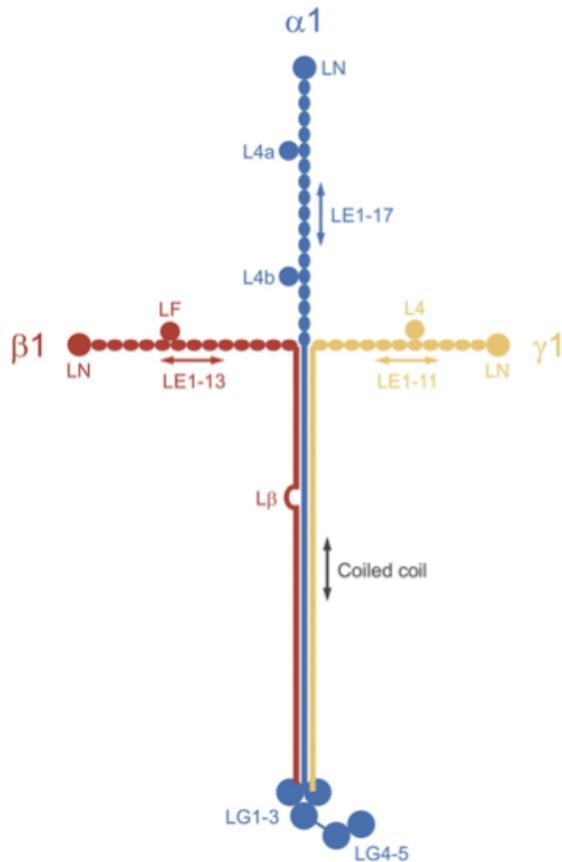


Figure 2 : Schéma de l'isoforme 111 de la Laminine composée des chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ (tirée de Hohenester 2019).

Les Laminines sont conservées d'un point de vue phylogénétique chez les vertébrés et les "invertébrés" (Sztal et al. 2011; Li et al. 2003). Pour certains gènes, la fonction est conservée entre les espèces. C'est le cas de la sous-unité $\alpha 2$ qui, lorsqu'elle est mutée, provoque des dystrophies musculaires chez le poisson-zèbre, la souris et l'humain. Pour d'autres sous-unités comme $\alpha 1$ ou $\alpha 5$, les perturbations observées ne sont pas les mêmes lorsqu'on compare le poisson-zèbre avec les mammifères (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012).

Chez le poisson-zèbre, on trouve dix gènes de la Laminine orthologues aux gènes de mammifères. Ces dix gènes semblent avoir des fonctions similaires chez le poisson-zèbre et les mammifères. Pour le gène *lamB3* de mammifères, aucun orthologue n'a été trouvé chez le poisson-zèbre (Sztal et al. 2011). Même si une première étude montrait que le gène *lamC2* de mammifères ne possédait pas d'orthologue chez le poisson-zèbre (Sztal et al. 2011), des expériences de WISH (*whole mount in situ hybridisation*) ont détecté *lamC2* dans l'épiderme de poisson-zèbre à 24 et 48 heures post fécondation (hpf) (Carrara et al. 2019). Pour le gène *lamB4* du poisson-zèbre, on retrouve un gène orthologue chez l'humain mais pas chez la

souris ou le rat (Fig.3) (Sztal et al. 2011). Sur la Figure 3, on peut voir qu'il y a une expansion du clade β chez le poisson-zèbre. On trouve en effet la séquence *lamB2l* qui résulte de la duplication de *lamB2* et la séquence *lamB1b* qui est une séquence paralogue à *lamB1*. Il y a donc cinq gènes *lama*, cinq gènes *lamB* et trois gènes *lamC* présents chez le poisson-zèbre (Sztal et al. 2011; Carrara et al. 2019).

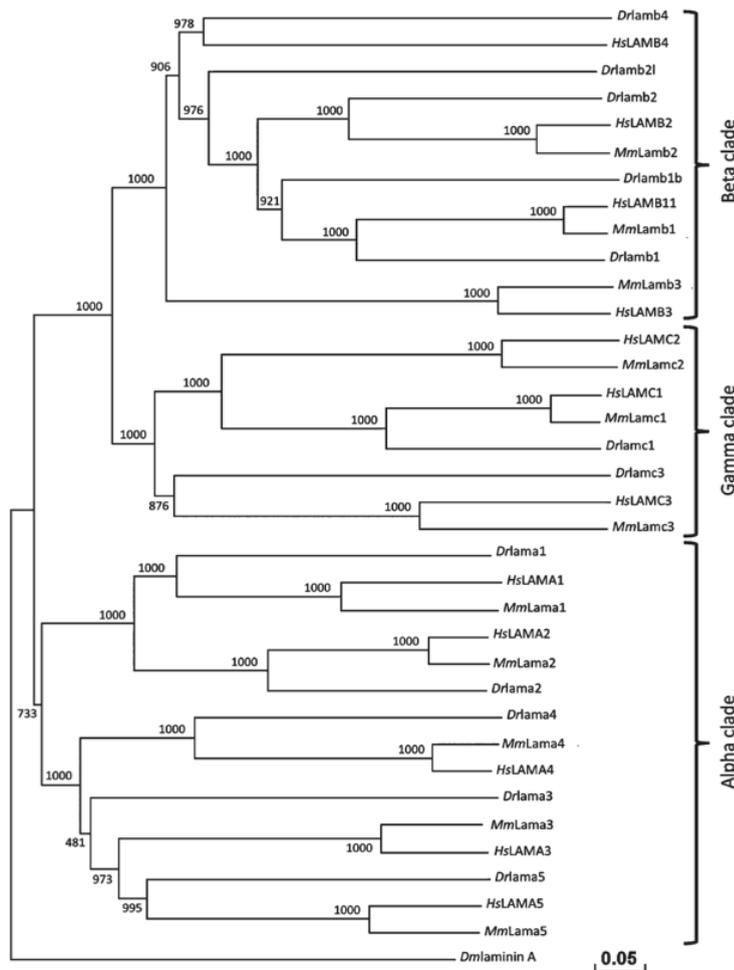


Figure 3 : Phylogramme des séquences protéiques de la Laminine chez le poisson-zèbre (Dr), la souris (Mm) et l'Homme (Hs) (tirée de Sztal et al. 2011).

I.2 Structure, polymérisation et expression de la Laminine

I.2.1 Structure de la Laminine

Chaque sous-unité comporte plusieurs domaines et leur organisation est très similaire (Hohenester 2019; Durbeej 2010). Je vais maintenant décrire ces domaines, et j'aborderai plus tard leur rôle dans la polymérisation de la Laminine. On retrouve un domaine globulaire Laminine N-terminal (LN) suivi de plusieurs domaines *Laminin EGF-like* (LE). Un ou deux domaines globulaires L4/LF (Laminine IV) sont insérés au sein des domaines LE. Pour

certaines chaînes ($\alpha3A$, $\alpha4$, $\beta3$ et $\gamma2$), il manque le domaine LN et parfois tout ou une partie des domaines LE tandis que d'autres chaînes sont plus longues dans cette région, comme $\alpha5$ par exemple (Nirwane et Yao 2019; Durbeej 2010; Hohenester 2019). Les trois sous-unités α , β et γ s'assemblent via leur domaine *coiled coil*, ce qui confère la forme de T caractéristique aux trimères (Hohenester 2019; Durbeej 2010). Ce domaine est formé par toute la partie C-terminale des sous-unités β et γ . Les sous-unités α possèdent aussi un domaine *coiled coil*, et en plus cinq domaines Laminine Globulaire (LG1-5) dans leur partie C-terminale (Fig.2 et Fig.4) (Hohenester 2019; Durbeej 2010).

L'observation de la structure des trimères de Laminine en microscopie électronique a révélé la présence de quatre bras : un bras long (~77 nm) terminé par un domaine globulaire (les domaines LG de la chaîne α) et trois bras courts (~34 nm) formés par les parties N-terminales des trois chaînes, comprenant les domaines LN, L4/LF et LE. Mais toute une variété de formes a été observée car certaines chaînes ($\alpha3A$, $\alpha4$, $\beta3$ et $\gamma2$) sont tronquées tandis que la chaîne $\alpha5$ est plus grande (Fig.4) (Durbeej 2010; Hohenester 2019).

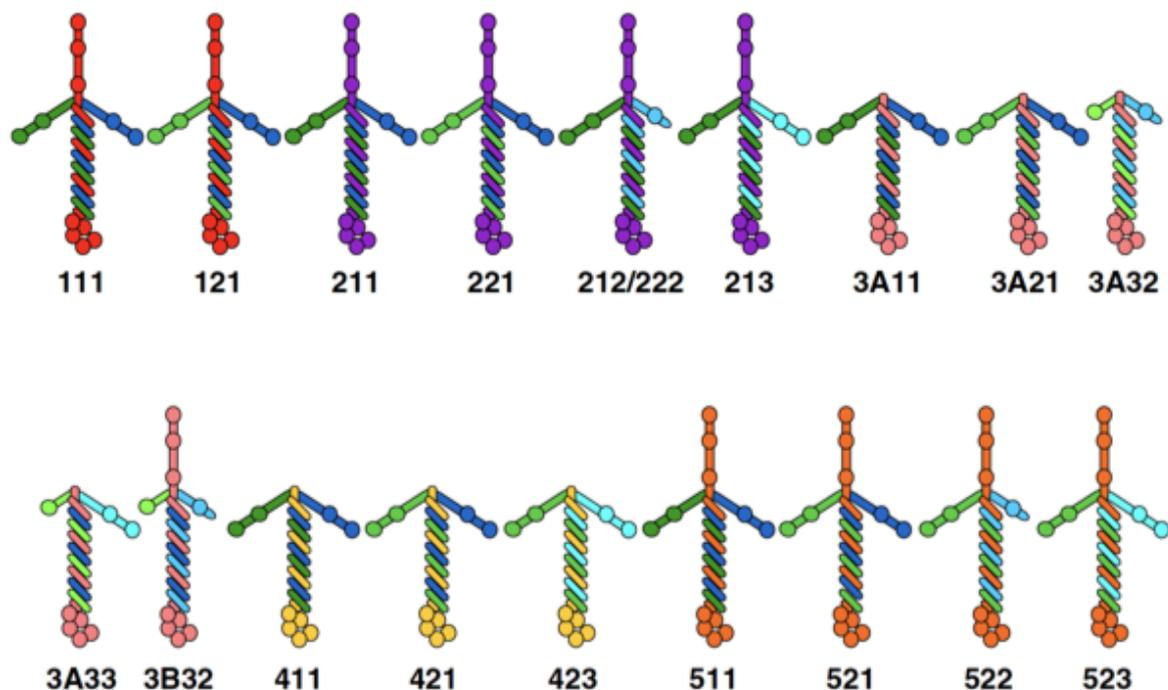


Figure 4 : Schéma représentant les différentes isoformes connues de la Laminine chez les mammifères et leur structure (tirée de Durbeej 2010).

I.2.2 Rôle des différents domaines de la Laminine dans la polymérisation

Les parties N-terminales des bras courts participent à la polymérisation de la Laminine via des interactions homo-et hétérotypiques. En effet, les domaines LN présents dans la partie N-terminale des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3B$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$ et $\gamma 3$ sont essentiels à l'assemblage des différents hétérotrimères et à leur incorporation dans les membranes basales chez les souris (Durbeej 2010; Hohenester 2019; Hohenester et Yurchenco 2013). Seules les isoformes possédant les domaines LN sont capables de polymériser correctement *in vitro* et dans des cultures cellulaires (Hohenester 2019). La polymérisation de la Laminine *in vivo* se produit à la surface des cellules et nécessite non seulement les trois bras courts en N-terminal mais également la partie C-terminale qui, en se liant aux récepteurs de la Laminine à la surface des cellules (comme les Intégrines $\beta 1$ ou le Dystroglycan (Li et al. 2003)), concentre les isoformes et permet leur polymérisation (Li et al. 2003; Hohenester 2019; Hohenester et Yurchenco 2013). L'assemblage de certaines Laminines comme les isoformes 111, 211 et 221 s'effectue de manière calcium-dépendante par interaction entre leurs domaines N-terminal (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012; Peter D. Yurchenco et O'Rear 1994).

Le rôle du domaine LE reste méconnu même si dans certaines chaînes ($\gamma 1$ et $\gamma 3$), ce domaine participe à la liaison du Nidogène-1, un autre composant majeur des membranes basales que je détaillerai plus tard (Durbeej 2010; Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012; Hohenester 2019). Certaines études ont suggéré que cette interaction serait nécessaire à l'assemblage des membranes basales mais cette hypothèse n'a pas été validée par des analyses génétiques (Durbeej 2010).

La partie C-terminale comprenant les domaines LG contribue aux interactions avec la surface des cellules via des interactions directes ou indirectes avec des récepteurs membranaires qui seront présentés plus tard dans le texte (Durbeej 2010; Nirwane et Yao 2019; Hohenester 2019; Hohenester et Yurchenco 2013). En plus de son rôle dans l'assemblage cohésif des trois sous-unités de la Laminine, le domaine *coiled coil* participe également aux liaisons avec d'autres groupes de composants des membranes basales, dont les proteoglycans (Hohenester 2019; Durbeej 2010).

I.2.3 Expression de la Laminine

I.2.3.a Expression tissulaire de la Laminine

Les Laminines sont exprimées de manière tissu-spécifique, et leur spécificité d'expression est déterminée en partie par les variations d'expression de la sous-unité α dans les différents tissus (Durbeej 2010; Sztal et al. 2011). Les mécanismes régulant l'expression des gènes codant pour les différentes sous-unités α restent pour l'instant peu connus même si on sait que, chez la souris, les facteurs de transcription *Sp1/Sp3*, *NF-Y*, *Sox7* et *Sox17* contrôlent l'expression de la chaîne $\alpha1$ dans les cellules de l'endoderme pariétal (ces cellules appartiennent au sac vitellin et synthétisent des composants de la membrane basale, qui sont organisés en monocouche de membrane basale que l'on appelle la membrane de Reichert (Niimi et al. 2004)).

Chez la souris, en plus d'être exprimée dans l'endoderme pariétal, la sous-unité $\alpha1$ est aussi retrouvée dans les membranes basales embryonnaires lors du développement précoce et est exprimée par des cellules épithéliales lors de l'organogenèse. La sous-unité $\alpha2$ est présente majoritairement dans les membranes basales des muscles striés et des cellules de Schwann. La sous-unité $\alpha3$ est retrouvée notamment dans l'épiderme et la chaîne $\alpha4$ est associée à l'endothélium, aux cellules de Schwann et à la jonction neuromusculaire entre autres. La chaîne $\alpha5$ est plus largement distribuée (membranes basales embryonnaires, épithéliums notamment) (Durbeej 2010).

Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que les différentes chaînes entrant dans la composition de la Laminine ne sont pas forcément exprimées par un même type cellulaire. Par exemple, si la chaîne $\beta2$ de la Laminine est synthétisée par des cellules de la plaque du plancher du tube neural, l'expression des ARNm des chaînes α de la Laminine est restreinte aux cellules épendymaires du tube neural (Thomas et Dziadek 1993). De manière plus générale, un même type cellulaire ne produit pas tous les composants nécessaires à la formation de la lame basale (Peter D. Yurchenco et O'Rear 1994). En effet, des expériences d'hybridation *in situ* réalisées chez des embryons de souris âgées de 12,5 jours, ont montré que les gènes codant pour la Laminine ou le Nidogène ne sont pas exprimés de manière coordonnée (Thomas et Dziadek 1993). De plus, si les ARNm des chaînes $\beta1$ et $\beta2$ de la Laminine et des chaînes du Collagène IV sont exprimés par des cellules qui peuvent être épithéliales ou mésenchymateuses, l'ARNm du Nidogène n'est détecté dans aucun épithélium mais est très abondant dans les cellules mésenchymateuses et endothéliales (Thomas et Dziadek 1993). Autre exemple : dans l'intestin embryonnaire, les cellules

épithéliales et mésenchymateuses synthétisent différents composants des membranes basales. Le Collagène IV est synthétisé par des cellules mésenchymateuses (Simon-Assmann et al. 1990), les chaînes β de la Laminine sont produites par les cellules épithéliales et mésenchymateuses, et les chaînes α sont produites uniquement par les cellules épithéliales lors du développement embryonnaire, puis par les cellules mésenchymateuses plus tardivement (Klein et al. 1990).

Chez le poisson-zèbre, la plupart des gènes de la Laminine sont exprimés dans plusieurs tissus pendant le développement embryonnaire (Tableau 1) (Sztal et al. 2011).

TABLE 1. Expression of Zebrafish Laminin Genes by In Situ Hybridization Expression at Different Developmental Stages

Gene	Expression pattern				
	16 somite	24 hpf	48 hpf	72 hpf	15 mm (trunk muscle sections)
<i>lama1</i>	Otic vesicle (p), notochord, brain and spinal cord	Eye, otic vesicle, notochord, brain and spinal cord	Eye, otic vesicle, brain and spinal cord, pectoral fin	Eye, otic vesicle, brain and spinal cord, pectoral fin, branchial arches	Not detected
<i>lama2</i>	Head, adaxial cells	Eye, brain and spinal cord, trunk muscle	Eye, otic vesicle, brain and spinal cord, trunk muscle	Eye, brain and spinal cord, trunk muscle, pectoral fin muscle, posterior hypaxial muscle	Fast and slow muscle fibers
<i>lama3</i>	Low level expression	Eye, brain and spinal cord, skin	Lens, otic vesicle, brain and spinal cord, pectoral fin	Eye, brain and spinal cord, pectoral fin	Not detected
<i>lama4</i>	Head, adaxial cells	Eye, brain and spinal cord, trunk muscle	Eye, otic vesicle, brain and spinal cord, trunk muscle, horizontal myosepta	Eye, brain and spinal cord, trunk muscle, pectoral fin muscle, gut, myosepta, fin folds, otic vesicle	Cells between fast and slow muscle fibers
<i>lama5</i>	Low level expression	Eye, brain and spinal cord	Lens, brain and spinal cord, pectoral fin	Eye, brain and spinal cord, pectoral fin, branchial arches	Not detected
<i>lamb1</i>	Head, notochord	Eye, otic vesicle, brain and spinal cord, notochord, fin folds, trunk muscle	Eye, brain and spinal cord, otic vesicle, pectoral fins, fin fold, myosepta	Eye, brain and spinal cord, otic vesicle, pectoral fins, branchial arches, fin folds	Not detected
<i>lamb1b</i>	Low level expression	Eye, notochord, brain and spinal cord	Eye, notochord, brain and spinal cord, pectoral fins, fin fold	Eye, notochord, brain and spinal cord, pectoral fins, fin fold	Not detected
<i>lamb2</i>	Head, adaxial cells	Eye, brain and spinal cord, trunk muscle	Eye, otic vesicle, brain and spinal cord, pectoral fins, trunk muscle	Eye, brain and spinal cord, pectoral fins, branchial arches, trunk muscle	Fast and slow muscle fibers
<i>lamb2l</i>	Brain and spinal cord tube, head	Brain and spinal cord tube, head	Spinal cord, lens, otic vesicle, telecephalon, pectoral fins	Lens, otic vesicle, telecephalon, branchial arches, pectoral fins, gut	Not detected
<i>lamb4</i>	Low level expression	Eye, otic vesicle, brain and spinal cord, skin, trunk muscle	Eye, brain and spinal cord, otic vesicle, pectoral fins, skin	Eye, brain and spinal cord, otic vesicle, branchial arches, pectoral fins, skin	Not detected
<i>lamc1</i>	Head, adaxial cells, otic vesicle (p), notochord	Eye, brain and spinal cord, otic vesicle, trunk muscle, notochord, fin folds	Eye, brain and spinal cord, otic vesicle, trunk muscle, notochord, fin folds	Eye, brain and spinal cord, otic vesicle, trunk muscle, branchial arches, notochord, fin folds, pectoral fin muscle	Fast and slow muscle fibers
<i>lamc3</i>	Low level expression	Eye, otic vesicle, trunk muscle	Eye, otic vesicle, brain and spinal cord, branchial folds, pectoral fins, myosepta,	Eye, otic vesicle, telecephalon, branchial arches, pectoral fins, gut, fin folds, myosepta,	Not detected

Tableau 1 : Tableau montrant l'expression des gènes de la Laminine chez le poisson-zèbre à différents stades de développement, déterminée par hybridation *in situ* (tiré de Sztal et al. 2011).

Par exemple, *lamA1* est détecté par hybridation *in situ* dans la notochorde postérieure et la queue aux stades précoces (Sztal et al. 2011) puis dans les yeux à partir de 24 hpf (Carrara et al. 2019), les nageoires pectorales et les structures neurales à 48 hpf. A 72 hpf, on détecte *lamA2*, *lamA3* et *lamA5* dans le cerveau et les yeux (Sztal et al. 2011; Carrara et al. 2019).

lamB1 est d'abord détecté dans des cellules entourant la notochorde pendant le développement précoce puis dans le cerveau antérieur. On a pu observer une forme de redondance d'expression entre *lamB1* et *lamB1b* dans ces tissus. *lamC3* est également détecté dans le cerveau à 24 hpf (Tableau 1, Sztal, 2011). A des stades précoces, on retrouve une expression maternelle de *lamB1* et *lamC1* dans les embryons de poisson-zèbre (Fig.5) (Parsons, Pollard, et al. 2002; Dolez, Nicolas, et Hirsinger 2011).

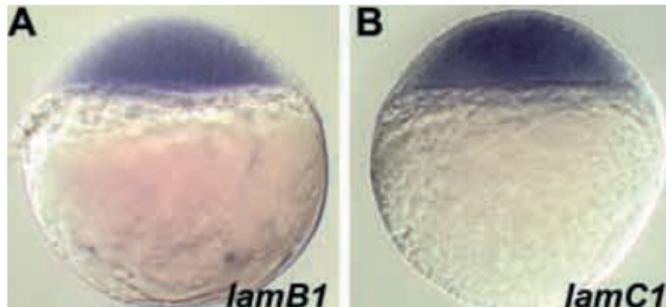


Figure 5 : Expression maternelle des gènes *lamB1* et *lamC1* chez le poisson-zèbre, détectée par hybridation *in situ* (tirée de Parsons et al. 2002).

Les expériences d'hybridation *in situ* permettent de détecter les ARNm et sont donc cruciales pour déterminer quel(s) tissu(s) synthétise(nt) et secrète(nt) les différentes chaînes de Laminine. Pour visualiser la protéine, on dispose notamment d'un anticorps polyclonal reconnaissant l'isoforme 111, utilisé dans un grand nombre d'études chez le poisson-zèbre (par exemple, Dolez, Nicolas, et Hirsinger 2011). Récemment, des lignées transgéniques permettant de visualiser des chaînes de Laminine fusionnées à la GFP (*Green Fluorescent Protein, GFP*) ont été construites. Ces protéines de fusion sont exprimées sous le contrôle de leur propre promoteur, permettant d'obtenir des niveaux d'expression proches des niveaux d'expression endogènes. La lignée transgénique *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP)* créée par l'équipe de H. Knaut (Fig.6) permet par exemple de visualiser l'expression de la chaîne $\gamma 1$ chez des embryons vivants ou fixés (Yamaguchi et al. 2022). Deux autres lignées rapportrices de l'expression de la chaîne $\alpha 1$ (*Tg(lama1:lama1-sfGFP)* et *Tg(lama1:lama1-mKate2)*) ont été produites par l'équipe de C. Norden (Soans et al. 2022).

TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP)



Figure 6 : Expression de la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine visualisée grâce à la lignée transgénique *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP)* à 28 hpf (barre d'échelle 0,5 mm) (tirée de Yamaguchi et al. 2022).

1.2.3.b Expression de la Laminine dans le système nerveux

Presque toutes les sous-unités α , β , ou γ sont exprimées lors du développement neural mais leur expression reste tissu-spécifique et dépend du stade de développement (Nirwane et Yao 2019; K. R. Long et Huttner 2019). Je donne ici quelques exemples. Dans le système nerveux central (SNC), les Laminines sont détectées majoritairement dans les membranes basales (Nirwane et Yao 2019). Chez la souris, l'isoforme 111 est exprimée dans tout le SNC lors du développement embryonnaire et elle est détectée dans la plaque du plancher de la moelle épinière chez l'Homme. Les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ sont largement exprimées dans le cerveau en développement chez la souris, et les isoformes 111 et 511 sont les premières isoformes à être exprimées durant l'embryogenèse des mammifères (Nirwane et Yao 2019). Chez la souris encore, presque toutes les chaînes sont exprimées durant la formation du tube neural et les Laminines $\alpha 2$ et $\alpha 4$ sont détectées dans la zone ventriculaire du néocortex à E9.5 (K. R. Long et Huttner 2019). Dans le système olfactif des souris, l'isoforme 111, ainsi que les sous-unité $\alpha 2$ et $\beta 2$, sont présentes autour de la couche du nerf olfactif (Raabe, Yoshida, et Schwarting 1997).

La Laminine est aussi produite et sécrétée par les astrocytes *in vivo* chez les souris adultes et *in vitro* (Willis et Crocker 2016). La Laminine astrocytaire produite est déposée dans la MEC

puis se fixe à la surface des cellules via des récepteurs transmembranaires (Willis et Crocker 2016). Les précurseurs des oligodendrocytes peuvent sécréter une faible quantité de Laminine (Yang et al. 2005). Il a été démontré que les oligodendrocytes peuvent exprimer une variété de chaînes de la Laminine incluant $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$ et $\gamma 2$ (Kim et al. 2014). On peut donc supposer que les oligodendrocytes peuvent synthétiser de nombreuses isoformes de la Laminine, même si pour l'instant aucune étude n'a montré lesquelles (Nirwane et Yao 2019). On pense également que la microglie peut synthétiser la plupart des isoformes de la Laminine car elle exprime quatre chaînes α ($\alpha 2$ - $\alpha 4$) (Nirwane et Yao 2019).

Chez le poisson-zèbre, à des stades précoces (17 hpf), on retrouve exprimé dans le système nerveux (je résume également ici leurs autres sites d'expression) les chaînes $\alpha 1$ (vésicule optique, notochorde, cerveau et moelle épinière), $\alpha 2$ (tête, cellules adaxiales qui sont des cellules adjacentes à la notochorde et deviendront des fibres musculaires), $\alpha 4$ (tête, cellules adaxiales), $\beta 1$ (tête, notochorde), $\beta 2$ (tête, cellules adaxiales), $\beta 21$ (cerveau, moelle épinière, tête) et $\gamma 1$ (tête, cellules adaxiales, vésicule optique, notochorde). A partir de 24 hpf, toutes les sous-unités sont exprimées dans le SNC (Tableau 1) (Sztal et al. 2011).

I.3 Autres composants des membranes basales

I.3.1 Le Collagène IV

C'est principalement le Collagène IV qui participe à la formation des membranes basales. Je présente ici quelques notions générales sur la structure, l'expression et la fonction des différents types de Collagènes, en donnant des informations plus détaillées sur le Collagène IV.

I.3.1.a Structure du Collagène

Les Collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères (~30% de la masse protéique totale). Ils sont composés de trois chaînes α qui s'associent en homotrimères (ex: Collagène II), ou en hétérotrimères (ex: Collagène IX) pour former les vingt-huit membres de la superfamille des Collagènes (I – XXVIII), caractérisés par la présence d'au moins une triple hélice (Fig.7) (Khoshnoodi et al. 2006; Gordon et Hahn 2010; S. Ricard-Blum 2011). Cette triple hélice est stabilisée par la présence de séquences répétées de peptides Gly-X-Y (M. A. Fox 2008). Il existe quarante-sept gènes chez les mammifères qui codent pour les quarante-trois chaînes α (M. A. Fox 2008). Les chaînes α de Collagène ont

une taille qui varie entre 662 et 3152 acides aminés (S. Ricard-Blum 2011; Gordon et Hahn 2010).

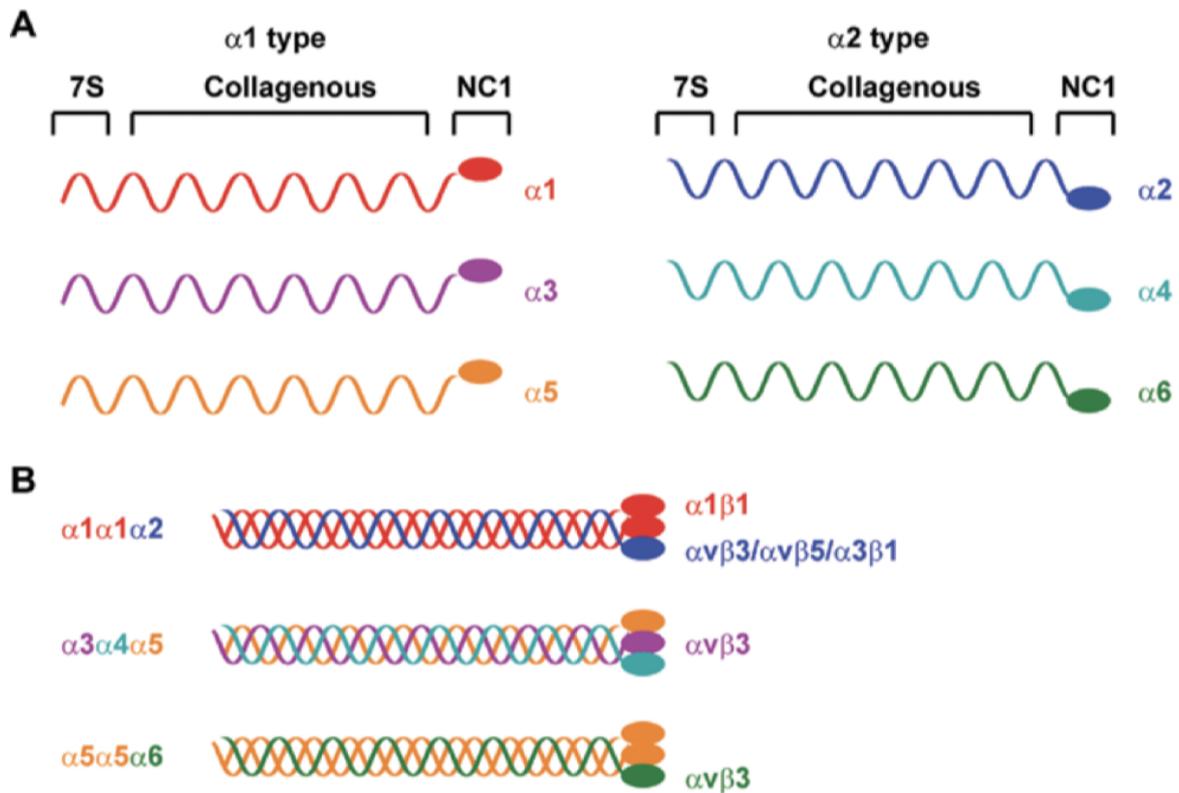


Figure 7 : Organisation en triple hélice du Collagène (exemple de différentes isoformes de Collagène IV) (adaptée de Wu et Ge 2019). Le domaine 7S, riche en résidus cystéine et lysine, sert à la formation du réseau de Collagène IV.

Les Collagènes sont des protéines multidomaines, ils possèdent deux domaines non collagèneux (NC) de taille, forme et séquence variable (Fig.7). Les domaines NC sont positionnés côté C-terminal ou N-terminal et sont désignés respectivement C-NC ou N-NC (Khoshnoodi et al. 2006). Ils participent à l'assemblage structural et confèrent aux Collagènes leurs activités biologiques. Ils sont répétés au sein d'une même chaîne de Collagène. On trouve aussi des domaines Fibronectine III, Kunitz, thrombospondine-1 (présent dans les *Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices, FACIT*) et von Willebrand, ces derniers étant les plus abondants. Le domaine von Willebrand, qui participe aux interactions protéine-protéine, est présent dans les Collagènes VI, VII, XU, XIV, XX, XXI, XXII et XXVIII. Le rôle du domaine Kunitz qui est clivé durant la maturation des Collagènes VI et VII n'est pas encore élucidé (S. Ricard-Blum 2011).

Il existe des liaisons covalentes intra-Collagènes, notamment les ponts disulfures pour les Collagènes III, IV, VI, VII et XVI (S. Ricard-Blum 2011).

1.3.1.b Les différents types de Collagènes

Le Collagène fibrillaire :

Les Collagènes fibrillaires (I, II, III V, XI, XXIV et XXVII) sont les premiers à avoir été découverts, ils possèdent un domaine triple hélice principal. D'autres collagènes d'aspect fibrillaire ont été identifiés mais ils ont une interruption de leur domaine triple hélice, ce sont les FACIT (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII). En microscopie électronique, les Collagènes fibrillaires forment des « tiges » de taille variable (Sylvie Ricard-Blum et Ruggiero 2005; Gordon et Hahn 2010; S. Ricard-Blum 2011). Les FACIT ne forment pas de fibrilles par eux-mêmes mais sont associés à des Collagènes fibrillaires (Fig.8) (S. Ricard-Blum 2011).

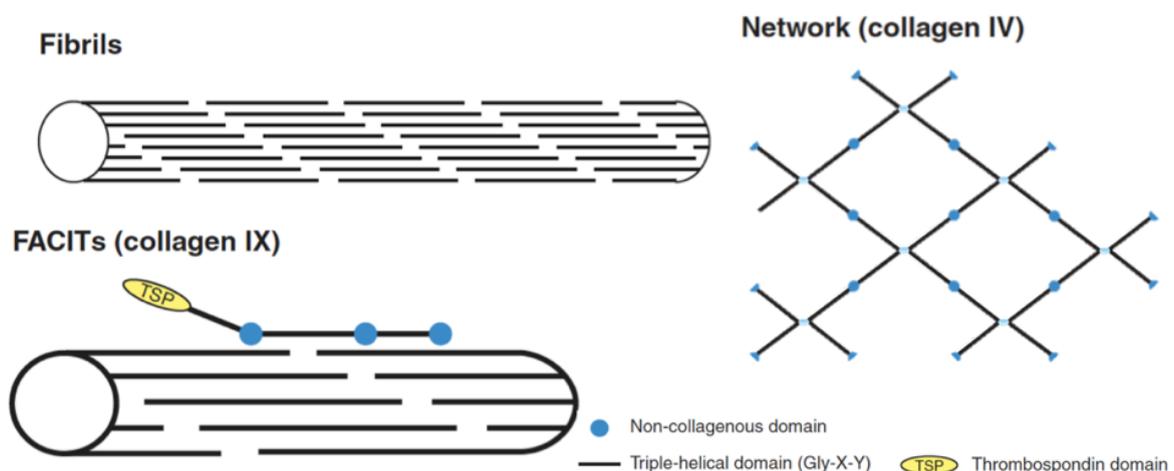


Figure 8 : Organisation en fibrilles et en réseaux des Collagènes fibrillaires et des collagènes formant des réseaux (exemple du Collagène IV) (adaptée de S. Ricard-Blum 2011).

La formation du Collagène fibrillaire n'a été que peu étudiée (sauf dans les tendons) et les étapes initiales sont peu connues. Il existe deux hypothèses principales. Selon la première, ce processus aurait lieu dans les compartiments extracellulaires où des fibrilles intermédiaires seraient assemblées avant de former des fibres matures (G. Zhang et al. 2005). La deuxième hypothèse statue que la fibrillogenèse aurait lieu intracellulairement, les fibrilles seraient ensuite adressées à la membrane plasmique (Canty et al. 2004).

Le Collagène membranaire :

Ce sous-groupe est composé des Collagènes XIII, XVII, XXIII et XXV, ce sont des collagènes transmembranaires, avec leur partie N-terminale localisée en intracellulaire et plusieurs domaines triple hélice localisés dans la MEC (Franzke, Bruckner, et Bruckner-Tuderman 2005; Sylvie Ricard-Blum et Ruggiero 2005; Gordon et Hahn 2010).

Les multiplexines (*Multiple Triple Helix Domains and Interruptions*) :

Il s'agit des Collagènes XV et XVIII, des homotrimères contenant de nombreux domaines triple hélice (Sylvie Ricard-Blum et Ruggiero 2005). Le Collagène XV est nécessaire pour stabiliser les cellules musculaires squelettiques et le Collagène XVIII joue un rôle critique dans le fonctionnement et la mise en place de l'œil ainsi que dans d'autres mécanismes d'organogenèse (Sylvie Ricard-Blum et Ruggiero 2005).

Les collagènes formant des réseaux :

On retrouve dans ce groupe les Collagènes VI, VIII, X et IV (Sylvie Ricard-Blum et Ruggiero 2005; Gordon et Hahn 2010; S. Ricard-Blum 2011). Le Collagène IV est aussi connu sous le nom de « *basement membrane Collagen* » (Gordon et Hahn 2010). Le Collagène IV forme un réseau dans lequel quatre molécules s'assemblent via leur domaine N-terminal pour former des tétramères et deux molécules s'assemblent via leur domaine C-terminal pour former des dimères (Fig.8). C'est un des constituants majeurs des membranes basales et il s'assemble à partir de six chaînes homologues ($\alpha 1-\alpha 6$), chacune caractérisée par un long domaine collagèneux (1400 résidus) possédant environ vingt petits domaines NC. Les six chaînes s'assemblent en trois protomères hétérotrimériques différents $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$, et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ qui, par la suite, s'assemblent en trois réseaux distincts (Fig.7) (Khoshnoodi et al. 2006; Khoshnoodi, Pedchenko, et Hudson 2008).

Chez le poisson-zèbre, toutes les chaînes de Collagène IV sont exprimées dans l'embryon (Fig.9) (Carrara et al. 2019).

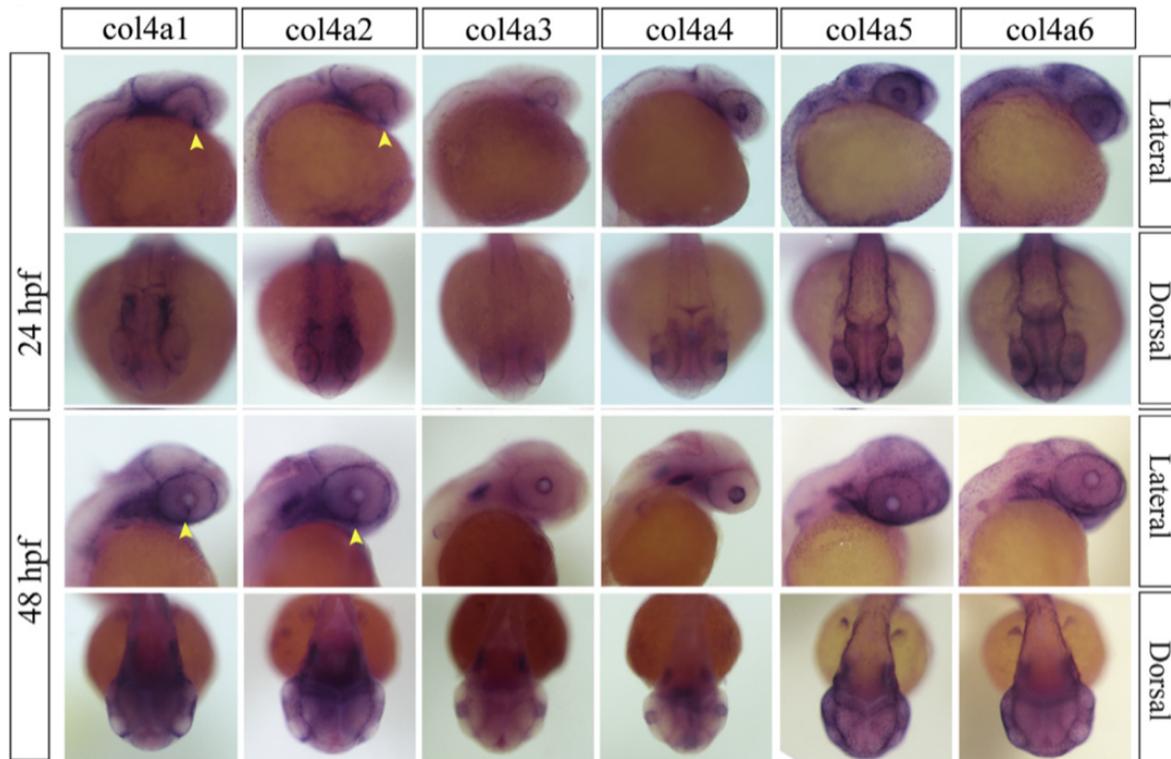


Figure 9 : Expression de l'ARNm des six gènes de Collagène IV chez le poisson-zèbre (tirée de Carrara et al. 2019).

1.3.1.c Les récepteurs du Collagène

Les molécules de Collagènes présentes dans la MEC participent aux interactions cellules-MEC via différents récepteurs pour assurer des fonctions de croissance cellulaire, de différenciation et de migration. On trouve notamment les Intégrines, des récepteurs sans activité kinase que je décrirai plus tard dans une partie dédiée, car ce sont aussi des récepteurs de la Laminine. Les Collagènes lient majoritairement les Intégrines possédant une sous-unité $\beta 1$ combinée à un domaine «inséré» (I) contenu dans leur sous-unité α . On parle de domaine intégrine A ou αA ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ et $\alpha 11$) (Humphries, Byron, et Humphries 2006; Heino 2007; Heino et al. 2009). Les Collagènes I - III se lient également aux récepteurs à domaine discoïdal DDR1 et DDR2 qui sont des récepteurs à activité tyrosine kinase (S. Ricard-Blum 2011; Heino et al. 2009). Les Collagènes se lient également à la Glycoprotéine VI (GPVI) de la famille des récepteurs immunoglobuline-like et à LAIR-1 (*Inhibitory Leukocyte-associated Immunoglobulin-like Receptor-1*). Les Collagènes fibrillaires et le Collagène IV sont aussi des ligands d'Endo180 (une protéine associée à l'activateur plasminogène de type urokinase) de la famille des récepteurs macrophage-mannose, qui participe à l'internalisation du Collagène (Leitinger et Hohenester 2007; Heino et al. 2009). Plusieurs Collagènes (IV, VI,

XVIII et XXV) se lie au peptide β amyloïde dans le cerveau de patients Alzheimer tandis que le collagène VI protège les neurones contre la toxicité $A\beta$ (J. S. Cheng et al. 2009).

1.3.1.d Rôles du Collagène

Les Collagènes fibrillaires jouent un rôle structural dans l'architecture du milieu extracellulaire, la forme des tissus et organes, et leurs propriétés mécaniques (résistance à la traction notamment dans la peau) (S. Ricard-Blum 2011; Kadler 1995). Certains Collagènes fibrillaires et autres, sont cruciaux pour l'intégrité tissulaire comme le Collagène IX (dans le cartilage) ou les Collagènes V et VII qui régulent l'adhésion derme-épiderme (Sweeney et al. 2010; S. Ricard-Blum 2011; Bonod-Bidaud et al. 2012). D'autres Collagènes, dont la distribution tissulaire est restreinte, ont des fonctions biologiques spécifiques comme le Collagène X, exprimé dans le cartilage, qui joue un rôle dans l'ossification endochondrale (Sweeney et al. 2010). De nouvelles fonctions ont été mises en évidence dans le développement du système nerveux des vertébrés, comme le Collagène IV qui intervient à la jonction neuromusculaire comme organisateur présynaptique (M. A. Fox et al. 2007; M. A. Fox 2008).

Chez le poisson-zèbre, le Collagène XXVII joue un rôle dans la squelettogenèse en assurant la minéralisation des vertèbres et la croissance axiale post-embryonnaire (Christiansen et al. 2009). La croissance des axones rétiniens termine dans une des quatre couches tectales rétiniennes et, chez le mutant *dagnet*, muté pour le gène *col4a5* (qui code pour la chaîne $\alpha 5$ du Collagène IV), les axones rétiniens n'atteignent pas leur cible. Leur croissance est correcte, mais leur guidage est altéré (Xiao et Baier 2007; M. A. Fox 2008). Le collagène IV joue également probablement un rôle dans la mise en place des projections des cellules granulaires du cervelet car chez un mutant *col4a6*, les projections sont anormales (Takeuchi et al. 2015). En utilisant un morpholino et un mutant spécifique de la chaîne *coll5a1b*, l'équipe de F. Ruggiero a montré que celle-ci est nécessaire au guidage axonal des motoneurones, et que son absence provoque des atrophies musculaires (Guillon, Bretau, et Ruggiero 2016). La chaîne paralogue *coll4a1a* est quant à elle nécessaire à la différenciation de la notochorde, à l'intégrité de la membrane basale et au développement des muscles (en jouant un rôle dans la spécification de différents types de cellules musculaires et dans le guidage des axones des motoneurones) (Pagnon-Minot et al. 2008). Cette même équipe a aussi étudié le collagène XXII avec un morpholino ciblant *col22a1*, qui induit des dystrophies musculaires caractérisées par une interruption de la jonction des tendons, nécessaire au fonctionnement correct des muscles (Charvet et al. 2013).

I.3.2 Le Nidogène

I.3.2.a Structure du Nidogène

Les Nidogènes sont des glycoprotéines monomériques qui possèdent trois domaines globulaires (G1-G3). G1 se situe à l'extrémité N-terminale de la protéine et est relié au domaine G2 par un segment flexible. Les domaines G2 et G3 sont reliés via un domaine "rod like". Les Nidogènes possèdent également des domaines EGF (*Epidermal growth Factor-like*), un domaine thyroglobuline de type 1 (TY), un domaine de récepteur lipoprotéique (LY), un module *nidogen-like* (NIDO) et un domaine G2F (Fig.10) (Ho et al. 2008). Il existe deux isoformes du Nidogène chez les vertébrés, le Nidogène-1 (ou Entactine-1) (Rupert Timpl et al. 1983) et le Nidogène-2 (ou Entactine-2) (Kohfeldt et al. 1998). Chez les "invertébrés", il n'y a qu'une seule isoforme, Nidogène-1 (Zhou et al. 2022). Chez les poissons-zèbres, il y a quatre homologues du Nidogène, *nid1a*, *nid1b*, *nid2a* et *nid2b* (Fig.10) (Zhu et al. 2017; Carrara et al. 2019).

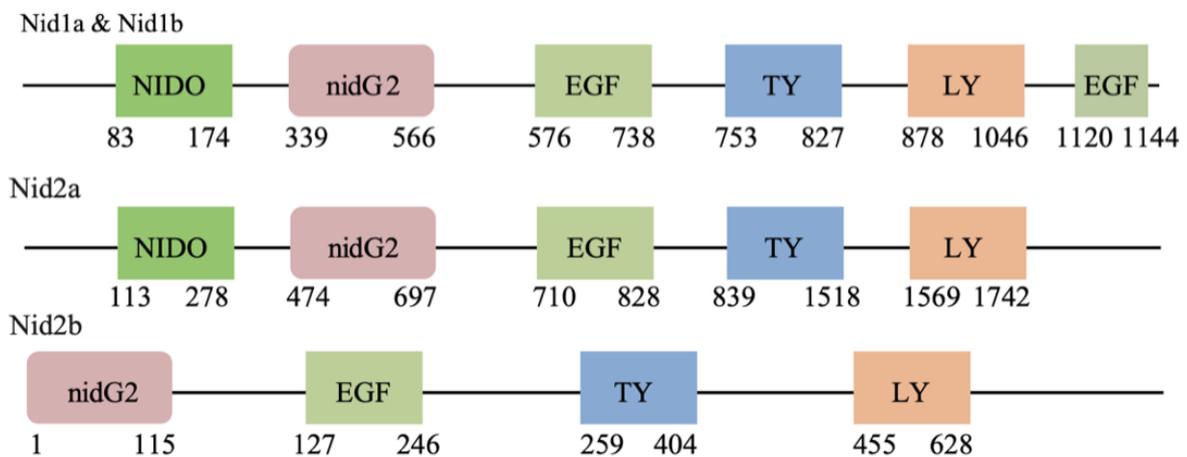


Figure 10 : Structure des différents homologues du Nidogène chez le poisson-zèbre (tirée de Zhu et al. 2017). Les domaines G1-G3 ne sont pas représentés sur le schéma.

Le Nidogène est produit par les cellules mésenchymateuses (Ho 2008) et les fibroblastes de la peau *in vitro* puis sécrété dans les membranes basales pendant le développement (Fleischmajer et al. 1995). Chez le poisson-zèbre, une étude récente suggère que *nid1b* et *nid2a* seraient produits par les cellules de crêtes neurales (*Neural Crest Cells, NCC*) présentes dans la région de l'œil (Bryan et al. 2020).

1.3.2.b Expression du Nidogène

Chez les souris, seul le Nidogène-1 est exprimé au tout début du développement (stade morula) puis les deux isoformes ont une distribution similaire. Elles sont présentes dans les trois couches dermiques (ectoderme, mésoderme et endoderme) (Zhou et al. 2022). Le Nidogène-1 est fortement exprimé dans les myocytes cardiaques et squelettiques tandis que le Nidogène-2 est très exprimé dans les vaisseaux sanguins (Kohfeldt et al. 1998; Murshed et al. 2000).

Chez le poisson-zèbre, des hybridations *in situ* montrent que *nid1a* est exprimé dans les somites (Carrara et al. 2019; Zhu et al. 2017; Bryan et al. 2020), *nid2a* dans la queue et *nid2b* à une expression diffuse dans la tête (Bryan et al. 2020). *Nid1a*, *1b* et *2a* sont exprimés dans la tête et notamment dans la région de l'œil (par les cellules de la crête neurale (*neural crest cells*, NCC) notamment, (Bryan et al. 2020) puis leur expression dans cette région disparaît autour de 56 hpf (Carrara et al. 2019). À 48 hpf, *nid1a* est exprimé dans la partie postérieure de la moelle épinière (Fig.11) (Zhu et al. 2017).

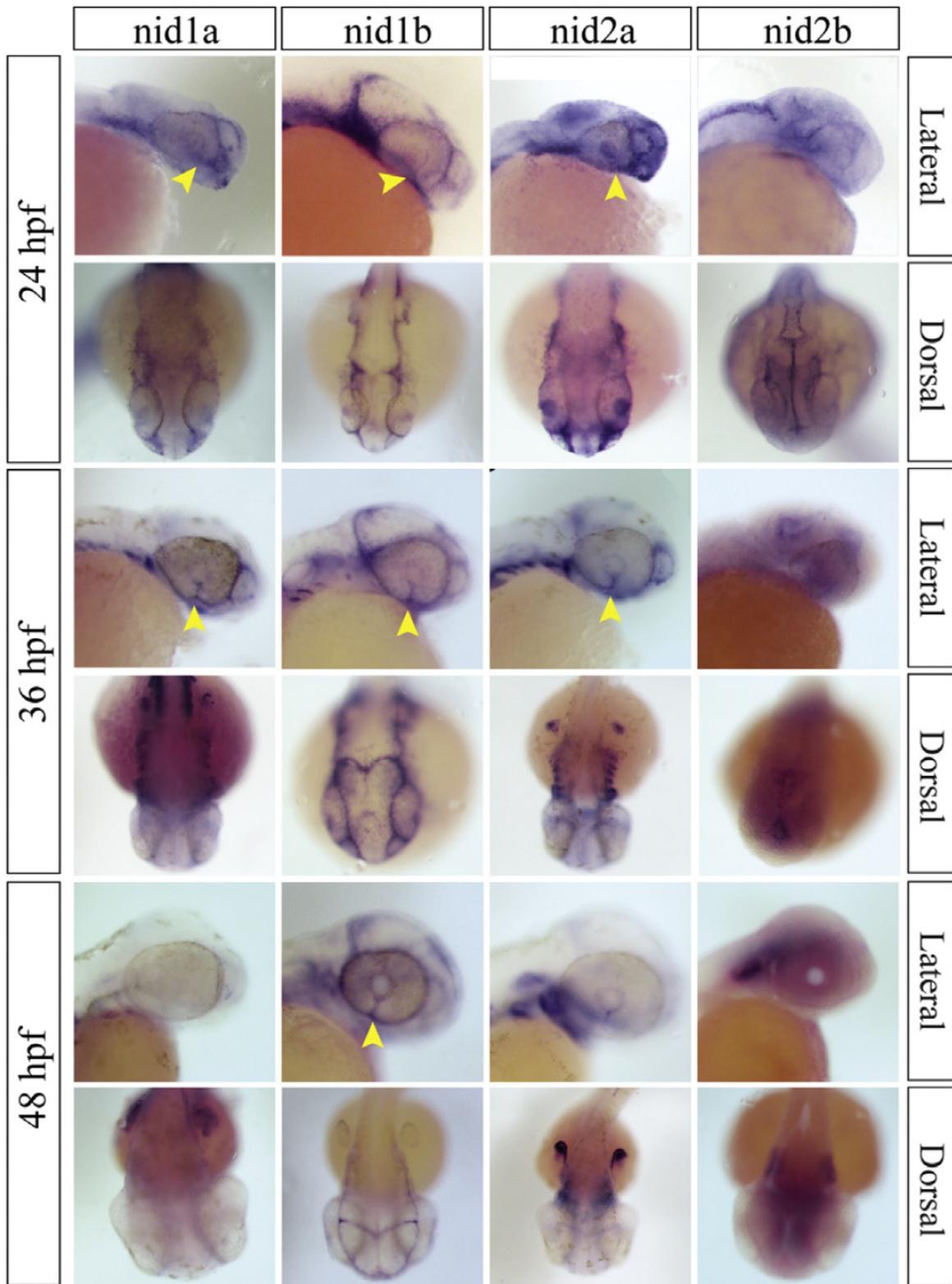


Figure 11 : Expression du Nidogène chez le poisson-zèbre visualisé par hybridation *in situ* (tirée de Carrara et al. 2019).

1.3.2.c Interactions du Nidogène avec les autres composants de la MEC

Les deux isoformes du Nidogène interagissent avec le domaine LE de la Laminine γ via leur domaine G3 (Kohfeldt et al. 1998; Salmivirta et al. 2002; P. D. Yurchenco 2011), mais seul le Nidogène-1 se lie au Collagène IV et au Perlécan via son domaine G2 (Aumailley et al. 1993; J. W. Fox et al. 1991; Pöschl et al. 1996; Ries et al. 2001). Le Nidogène-2 peut également se lier à un membre de la famille des Fibuline (des protéines de la MEC) chez la souris et le poisson-zèbre (J.-L. Zhang et al. 2022).

1.3.2.d Fonctions du Nidogène

Les deux isoformes sont présentes dans toutes les membranes basales mais elles ne sont pas nécessaires à sa formation, car la délétion de l'une ou l'autre des isoformes chez la souris n'engendre pas d'altérations majeures des membranes basales. Par contre, le Nidogène est important pour la stabilisation de la membrane basale plus tardivement. Sa mutation cause chez les souris mutantes des problèmes de poumons et de cœur qui mènent à leur mort juste après leur naissance (Zhou et al. 2022). Ces deux isoformes ont des rôles compensatoires (Murshed et al. 2000; Zhou et al. 2022) et jouent également un rôle dans la différenciation et la régénération des tissus squelettiques musculaires chez les souris (pour revue voir Zhou et al. 2022). Le Nidogène joue aussi un rôle dans la transmission synaptique (mis en évidence par analyse de souris mutantes) (Ho et al. 2008).

Chez le poisson zèbre, l'utilisation de deux morpholinos dirigés contre *nid1a* et *nid1b* induit des malformations de la rétine chez l'embryon, un retard de développement léger et une diminution globale de la taille de l'embryon à 24 hpf. Des analyses d'imagerie *live* montrent que les défauts induits par les morpholinos commencent à 20 hpf, ce qui indique que la morphogenèse de la rétine et le maintien de la coupe optique est affecté en absence de Nidogène (Carrara et al. 2019). Ces observations ont été confirmées par l'expression inductible d'un dominant négatif inductible de *nid1a* provoquant également des défauts de morphogenèse de la coupe optique (Bryan et al. 2020). Comme *nid1a* et *nid1b* sont spécifiquement exprimés par les NCC migrant autour de la coupe optique, ces défauts de morphogenèse de l'œil sont sans doute dûs à des interactions entre cellules de crête neurale et coupe optique (Bryan et al. 2020).

I.3.3 Les protéoglycans

Les protéoglycans de la membrane basale sont des protéines “péricellulaires” sécrétées, possédant des chaînes heparan sulfate (HS). Les protéoglycans de la membrane basale sont le Perlécan, l’Agrine et le Collagène XVIII/XV (Iozzo et Schaefer 2015). N’étant pas primordiaux à la compréhension de mes travaux de thèse, je ne les présenterai que très succinctement.

I.3.3.a Le Perlécan

Le Perlécan est le protéoglycan le plus représenté dans les membranes basales. C’est une protéine attachée à trois chaînes HS et/ou à des chaînes de chondroïtine sulfate (Paulsson et al. 1987; Pozzi, Yurchenco, et Iozzo 2017; R. Timpl 1993). Cette protéine est composée de 5 domaines complexes. Le domaine I comporte notamment un module SEA (*Sea Urchin Sperm Protein Enterokinase and Agrin*), et le domaine II des modules homologues aux récepteurs LDL (*Low Density Lipoprotein*) et un motif Ig-Like. Le domaine V ou endorepelline, contient trois motifs LG (Fig.12) (Iozzo et Schaefer 2015).

Chez le poisson-zèbre on trouve un gène qui code pour le Perlécan (Zoeller et al. 2008). L’expression du Perlécan dans l’embryon de poisson-zèbre a été identifiée par hybridation *in situ* dans la tête, les yeux et les somites (Zoeller et al. 2008; Carrara et al. 2019). A 24 hpf, une faible expression est détectée dans la fissure optique et la rétine en développement (Carrara et al. 2019) mais il est fortement exprimé le long des myotomes (Zoeller et al. 2008). À 48 hpf, il est exprimé dans la fissure optique et autour de la lentille (Carrara et al. 2019).

Le Perlécan se lie au Nidogène, à la sous-unité α du Dystroglycan (un récepteur de la Laminine, voir plus loin) et au Collagène IV (Pozzi, Yurchenco, et Iozzo 2017). Il a un rôle de modulateur des adhésions cellulaires, et est important pour la prolifération et la signalisation des facteurs de croissance (Smith et al. 2007; Iozzo et Schaefer 2015; Pozzi, Yurchenco, et Iozzo 2017). Chez le poisson-zèbre, l’étude de morphants a montré l’implication du Perlécan dans le développement des muscles et des vaisseaux intersegmentaux (Zoeller et al. 2008). Il participe à la régulation de l’angiogenèse en modulant un facteur de croissance vasculaire (Zoeller, Whitelock, et Iozzo 2009). Une équipe propose également un rôle dans la différenciation des NCC (Castellanos, Reyes-Nava, et Quintana 2021). Par contre, il n’est pas essentiel à la formation des membrane basales (Zoeller et al. 2008).

Dans le système olfactif des souris dont la structure sera décrite plus tard dans le texte, le Perlécan est présent autour de l'épithélium olfactif, de la *lamina propria*, ainsi qu' autour des faisceaux d'axones présents dans la *lamina propria*. Entre l'épithélium olfactif et le bulbe olfactif, le marquage Perlécan n'est pas présent autour de tous les faisceaux d'axones. En revanche, il est présent aux points d'entrée des axones olfactifs dans le bulbe olfactif. Son marquage coïncide avec celui des cellules engainantes, dont le rôle sera décrit plus tard dans le texte (Shay, Greer, et Treloar 2008).

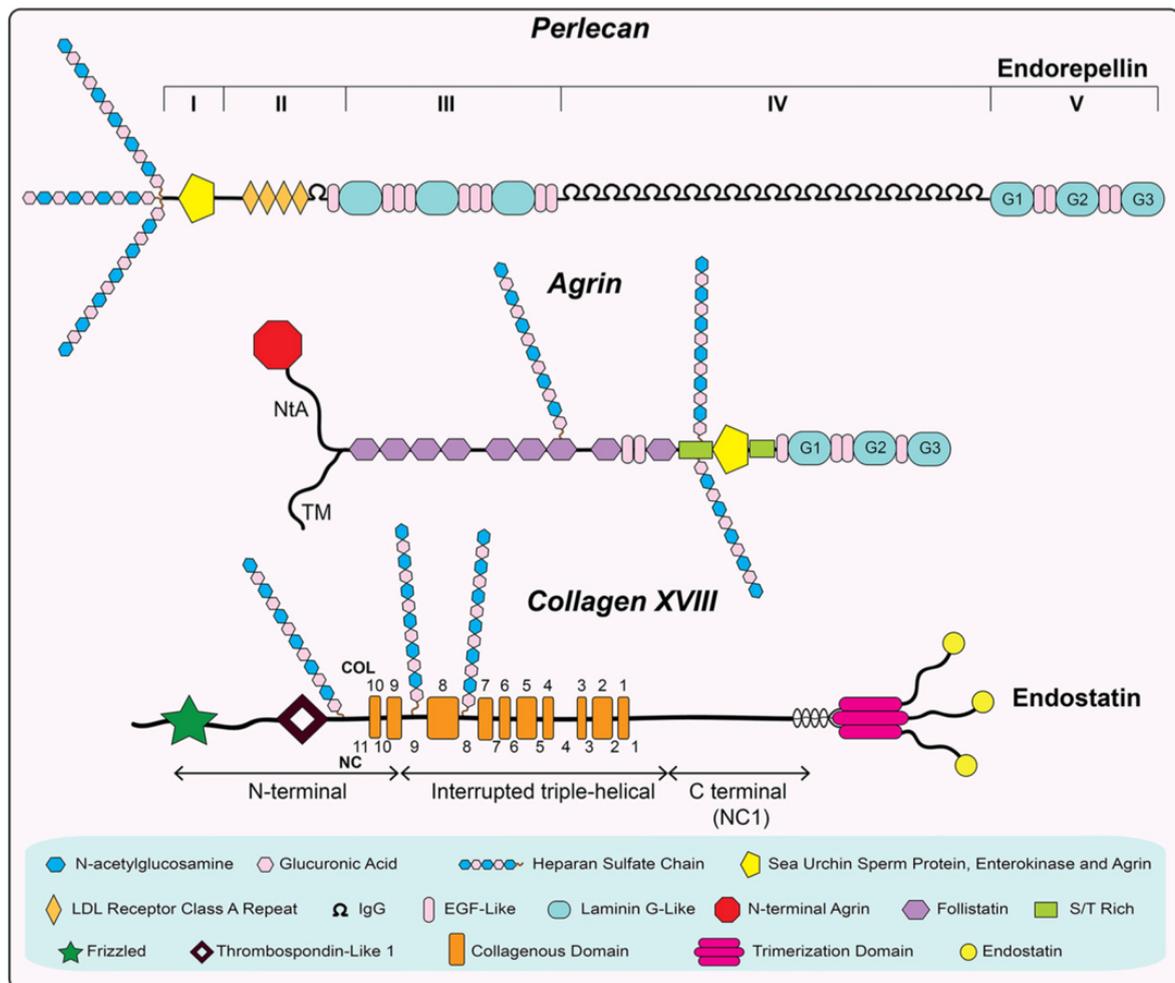


Figure 12 : Structure des trois protéoglycans faisant partie des membranes basales, le Perlécan, l'Agrine et le Collagène XVIII (et XV, non représenté ici mais ayant une structure similaire) (tirée de Iozzo et Schaefer 2015).

I.3.3.b L'Agrine

Les Agrines sont également des HSPG (*Heparan Sulfate Proteoglycan*) avec un domaine N-terminal NtA et un domaine C-terminal composé de trois domaines LG espacés par des

domaines *EGF-like*. Elles possèdent également un domaine SEA comme le Perlécan (Fig.12) (Iozzo et Schaefer 2015; Pozzi, Yurchenco, et Iozzo 2017). Elles sont présentes uniquement dans les membranes basales des vertébrés et peuvent être sécrétées ou transmembranaires (McCarthy 2015).

L'Agrine se lie fortement à la sous-unité α du Dystroglycan via ses domaines LG (P. D. Yurchenco 2011; Pozzi, Yurchenco, et Iozzo 2017) et elle interagit avec la sous-unité γ de la Laminine via son domaine NtA (Pozzi, Yurchenco, et Iozzo 2017). L'Agrine est cruciale pour le fonctionnement de la jonction neuromusculaire et des mutations de l'Agrine provoquent des défauts de synaptogenèse et de transmission synaptique neuromusculaires (pour revue voir Swenarchuk 2019).

1.3.2.c Le Collagène XVIII/XV

Comme décrit précédemment, ces Collagènes font partie de la famille des multiplexines (S. Ricard-Blum 2011). Le Collagène XVIII/XV est un homotrimère qui se lie avec la Laminine, le Collagène IV, le Nidogène et le Perlécan (Iozzo et Schaefer 2015). Il a un rôle important dans la stabilisation des membranes basales (Iozzo et Schaefer 2015).

1.4 Les récepteurs de la Laminine

La Laminine, via ses interactions avec ses récepteurs situés à la surface des cellules environnantes, est impliquée dans la régulation de nombreuses voies de signalisation cellulaires (Nirwane et Yao 2019). Les récepteurs de la Laminine sont transmembranaires et font le lien entre la MEC et les composants intracellulaires, notamment le cytosquelette et des acteurs de diverses cascades de transduction des signaux (Vecino et Kwok 2016). Ces récepteurs se répartissent en deux catégories, les Intégrines, et les autres récepteurs comprenant le Dystroglycan, le Syndecan, et d'autres glycoprotéines (Durbeej 2010; Nirwane et Yao 2019). Les domaines LG de la partie C-terminale de la Laminine permettent la liaison à ces récepteurs (Nirwane et Yao 2019).

1.4.1 Les Intégrines

Les Intégrines reconnaissent principalement les ligands présents dans la MEC ou à la surface des cellules même si quelques ligands solubles ont été identifiés (Takada, Ye, et Simon 2007, 20) (Hynes 2002). Il s'agit des principaux récepteurs permettant l'attachement de la MEC avec les cellules et la mise en place d'un lien fonctionnel avec les constituants intracellulaires

en agissant directement sur le cytosquelette (Vecino et Kwok 2016; Walma et Yamada 2020). Les Intégrines interviennent dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire impliquées dans une diversité de fonctions comme la motilité cellulaire, la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire (Cheah et Andrews 2018).

1.4.1.a Structure des Intégrines

Les Intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés d'une chaîne α et d'une chaîne β (Fig.13) (Vecino et Kwok 2016; Nirwane et Yao 2019). Pour le moment, dix-huit chaînes α et huit chaînes β sont connues, et vingt-cinq hétérodimères $\alpha\beta$ ont été identifiés chez les mammifères (Vecino et Kwok 2016; Nirwane et Yao 2019; Campbell et Humphries 2011). Chez le poisson-zèbre, quatorze chaînes (quatre α , neuf β et une chaîne β -like) ont été identifiées (Tableau 2) (Takada, Ye, et Simon 2007). Les deux séquences α et β ne présentent pas d'homologie entre elles et la diversité des chaînes α et β est issue de la duplication d'un gène ancestral (Takada, Ye, et Simon 2007). Des analyses génomiques menées sur 24 espèces "d'invertébrés" et de vertébrés ont montré que la structure des Intégrines α et β était hautement conservée (Takada, Ye, et Simon 2007).

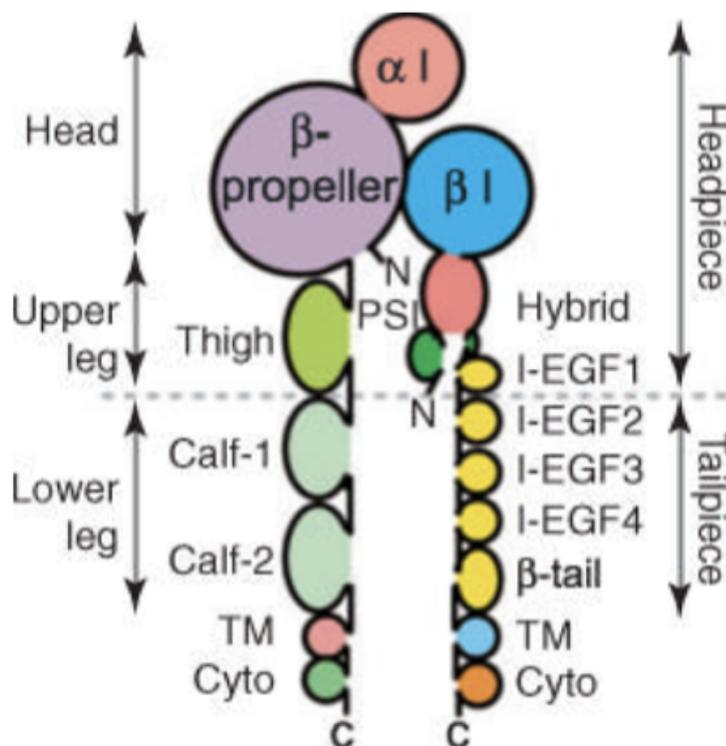


Figure 13 : Structure des Intégrines (tirée de Luo, Carman, et Springer 2007).

Symbol	Gene name	Synonyms
itga2b	α IIb	Platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41B
itga5	α 5	fe02h07, sb:cb665, wu:fe02h07
itga11	α 11	
itgav	α V	vitronectin receptor, α
itgb1a	β 1a	itgb1
itgb1b	β 1b	cb810, itgb1
itgb1b.1	β 1b.1	itgb1
itgb1b.2	β 1b.2	MGC85632; zgc:85632
itgb3.1	β 3.1	
itgb3.2	β 3.2	
itgb4	β 4	fl03d06, wu:fl03d06
itgb5	β 5	fi30h12, wu:fi30h12
itgb8	β 8	
zgc:112304	β -like 1	

Tableau 2 : Les gènes des Intégrines présents dans le génome du poisson-zèbre (tiré de Takada, Ye, et Simon 2007).

Les deux sous-unités α et β sont des glycoprotéines transmembranaires comprenant un grand domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire unique (TM) et, à l'exception de β 4, un petit domaine cytoplasmique (Cyto) (Fig.13) (B.-H. Luo, Carman, et Springer 2007; Mezu-Ndubuisi et Maheshwari 2021). La moitié des sous-unités α possède un domaine d'insertion (ou d'interaction, domaine I ou A), qui agit en tant que domaine de liaison principal aux ligands (Fig.13) (B.-H. Luo, Carman, et Springer 2007). Ce domaine I peut être présent sous forme ouverte (active) ou fermée (inactive) (Takada, Ye, et Simon 2007; B.-H. Luo, Carman, et Springer 2007). Il est inséré dans la partie N-terminale de la sous-unité α (appelé hélice β , β propeller) (Fig.13). Chez les dimères dont la sous-unité α ne possède pas de domaine I, c'est la sous-unité β qui est responsable de la liaison au ligand *via* son domaine I (homologue au domaine I parfois présent sur les sous-unités α). Ce domaine β I est également responsable de la formation de l'interface avec l'hélice β du dimère α (Fig.13) (B.-H. Luo, Carman, et Springer 2007).

1.4.1.b Signalisation et activation

La liaison de la MEC aux Intégrines est régulée par la conformation des Intégrines qui elle-même est déterminée par l'activité intracellulaire (signalisation *inside-out*). Suite à leur liaison à la MEC, les Intégrines peuvent également changer de conformation et ainsi permettre une signalisation *outside-in* (Vecino et Kwok 2016). L'information peut donc être

véhiculée dans les deux directions : *outside-in* (de la MEC vers l'intérieur des cellules) et *inside-out* (des cellules vers la MEC) (Vecino et Kwok 2016; Nirwane et Yao 2019).

Les intégrines existent sous forme inactive ou active. En réponse à des stimuli intracellulaires ou extracellulaires, les Intégrines sous forme inactive vont allonger leurs domaines extracellulaires et éloigner leurs domaines cytoplasmiques respectifs et passer en forme active (Fig.14). Lorsqu'elles sont sous forme inactive, les Intégrines ont une affinité de liaison faible ce qui inhibe la liaison à leurs ligands et la transduction de signaux. Une fois activée, les Intégrines adoptent une conformation ouverte ce qui augmente leur affinité pour leurs ligands et la transduction de signaux. Lors de la signalisation *inside-out*, la taline ou la kindline sépare les domaines cytoplasmiques en se liant à la sous-unité β , et d'autres activateurs vont activer les domaines de liaison des Intégrines situés en N-terminale. Lors de la signalisation *outside-in*, c'est la liaison d'un ligand extracellulaire qui induit la séparation des domaines cytoplasmiques permettant les interactions avec le cytosquelette de la cellule (Cheah et Andrews 2018; Mezu-Ndubuisi et Maheshwari 2021).

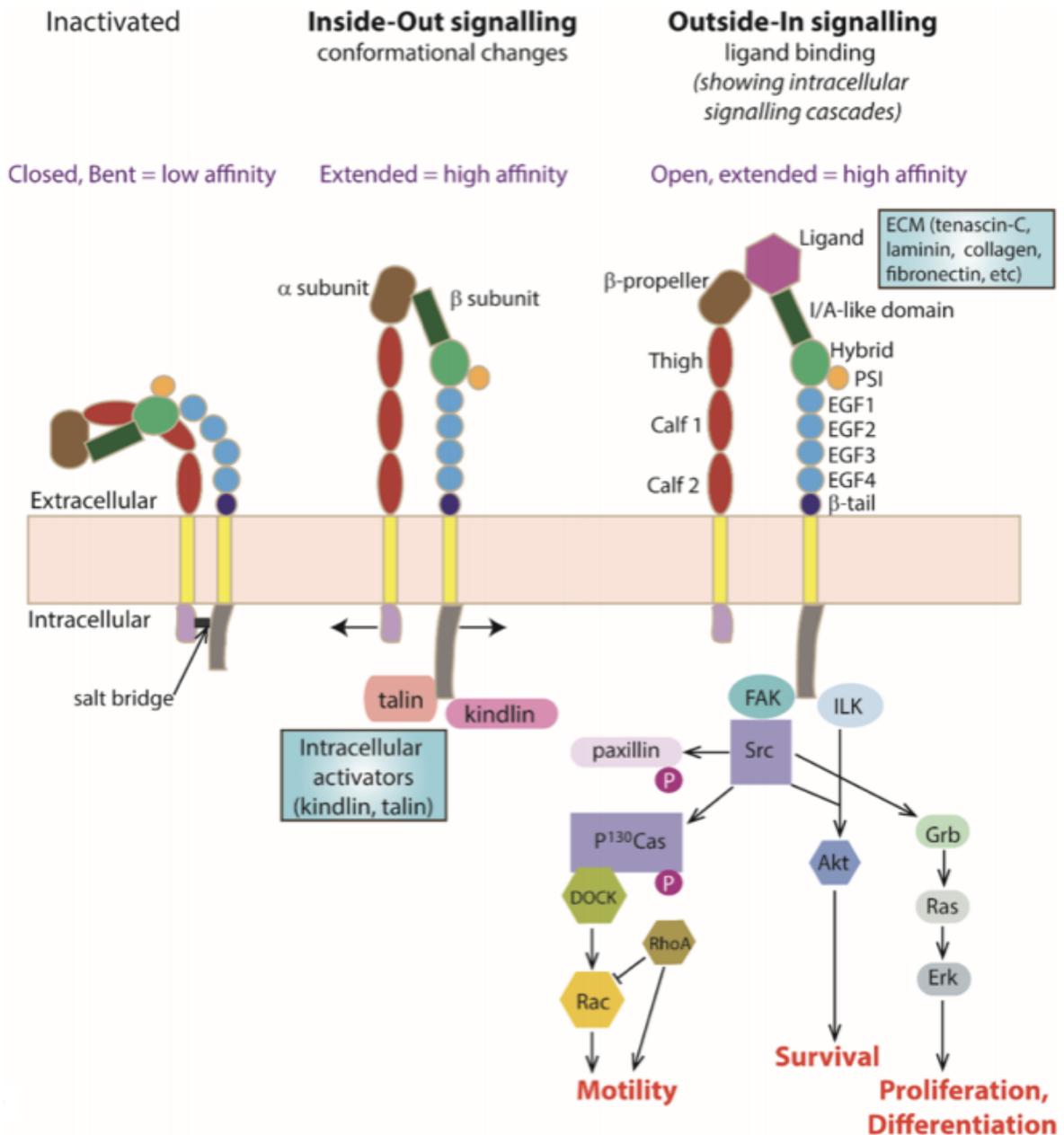


Figure 14 : Schéma des conformations inactive (gauche) et active (droite) des Intégrines ainsi que certaines voies de signalisation impliquées (tirée de Cheah et Andrews 2018).

1.4.1.c Expression des Intégrines

Chez les mammifères, certaines Intégrines ont une expression restreinte à un seul type cellulaire comme $\alpha 6\beta 4$ dans les kératinocytes ou $\alpha 4\beta 1$ dans les leucocytes, tandis que d'autres sont exprimées plus largement comme $\alpha V\beta 3$ que l'on retrouve dans les endothéliums (Takada, Ye, et Simon 2007).

Une grande variété d'intégrines est présente dans le cerveau en développement (Nirwane et Yao 2019). Dans le SNC des vertébrés, au moins quatorze dimères sont présents ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$,

$\alpha3\beta1$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$, $\alpha8\beta1$, $\alpha9\beta1$, $\alpha V\beta1$, $\alpha V\beta3$, $\alpha V\beta6$, $\alpha V\beta8$, $\alpha6\beta4$) (X. Wu et Reddy 2012). Elles y sont distribuées de manière ubiquitaire avec une expression accrue dans les cônes de croissance des axones (X. Wu et Reddy 2012).

Chez les poissons-zèbres, l'expression des gènes $\beta1a$, $\beta1b$, $\beta1b.1$ et $\beta1b.2$ a été étudiée par hybridation *in situ*. L'ARNm de l'intégrine $\beta1a$ a une expression maternelle faible, dans l'épiderme aux stades précoces (12 hpf), dans l'aorte dorsale à partir de 22 hpf, dans la notochorde et la vésicule auditive à partir de 36 hpf. L'ARNm de la chaîne $\beta1b$ a une forte expression maternelle. A 12 hpf, il est présent dans les somites et dans la queue puis dans les myotomes à 24 hpf. A 36 hpf cette chaîne est aussi présente dans la vésicule auditive, dans l'épiderme des nageoires, l'aorte dorsale et la notochorde. A 48 hpf, elle est détectable dans l'épiderme et à 86 hpf, dans les arcs branchiaux. La chaîne $\beta1b.1$ est présente maternellement à 12 hpf dans l'épiderme de tout l'embryon puis à 22 et 36 hpf dans les ouvertures urogénitales et la notochorde. A 72 hpf, elle est détectable dans les arcs pharyngés et l'épithélium intestinal. L'ARNm de $\beta1b.2$ n'est pas exprimé maternellement. Il est détectable à partir de 12 hpf, à bas niveau d'expression dans l'épiderme, à 36 hpf dans la notochorde et les ouvertures urogénitales, puis à 48 hpf dans la vésicule auditive, les arcs branchiaux et l'épiderme intestinal (X. Wang, Li, et Liu 2014).

La chaîne αV est présente maternellement, dans le mésoderme et la notochorde à 10 hpf, dans le cerveau antérieur et le myocarde à 24 hpf, puis dans l'ectoderme apical à 60 hpf et enfin dans le cerveau à 72 hpf. Les chaînes $\beta3.1$ et $\beta3.2$ n'ont pas d'expression maternelle mais sont détectées dans le cerveau à 24 hpf et dans le myocarde pour $\beta3.1$. A 60 hpf, $\beta3.1$ est exprimé dans l'ectoderme apical et $\beta3.2$ est présent dans les nageoires pectorales (Ablooglu et al. 2007).

Récemment, le laboratoire de M. Bagnat a incorporé un tag GFP dans la protéine endogène intégrine $\beta1b$, ce qui permet de visualiser l'expression endogène de cette chaîne d'intégrine (Levic et al. 2021).

1.4.1.d Les ligands des Intégrines

Le motif de liaison reconnu par les intégrines le plus connu est la séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) de la fibronectine (Hohenester 2019). Certaines Intégrines peuvent également reconnaître d'autres motifs spécifiques présents sur d'autres ligands (Takada, Ye, et Simon 2007).

Les dimères d'intégrines ont des affinités différentes pour les composants de la MEC et chaque dimère a des propriétés et fonctions qui lui sont propres (Vecino et Kwok 2016). C'est la sous-unité α qui est responsable de la spécificité de liaison du ligand tandis que la sous-unité β détermine la nature des signaux cellulaires activés (X. Wu et Reddy 2012). Par contre, il est également connu qu'un même dimère n'a pas forcément les mêmes ligands et donc le même rôle en fonction du type cellulaire dans lequel il se trouve (Vecino et Kwok 2016). Il a été montré qu'un hétérodimère peut souvent se lier à plus d'un ligand et *vice-versa* (X. Wu et Reddy 2012). Les Intégrines ont également des interactions fonctionnelles avec des récepteurs membranaires comme des canaux ioniques et des récepteurs de facteurs de croissance (X. Wu et Reddy 2012).

La plupart des Intégrines se lient aux domaines LG1-3 de la sous-unité α des Laminines (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012; Durbeej 2010; Hohenester et Yurchenco 2013) même si certaines peuvent également se lier aux domaines LN de la sous-unité α . Sont également impliquées dans la liaison aux intégrines les parties C-terminales des chaînes Laminine $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ et $\gamma 2$ (Durbeej 2010) qui ont des affinités différentes pour différentes Intégrines. Par exemple, les Laminines possédant la chaîne $\beta 2$ ont de plus fortes affinités pour les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 7\beta 1$ (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012).

Ma thèse portant sur le rôle de la Laminine au cours du développement, un des ligands principaux des intégrines, je vais maintenant m'intéresser aux intégrines liant les différentes isoformes de la Laminine. Les dimères liant la Laminine sont notamment $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, et $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$ (Durbeej 2010; Hohenester 2019; Nirwane et Yao 2019). Les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, et $\alpha 7\beta 1$ sont particulièrement importantes pour l'ancrage des domaines LG de la Laminine au cytosquelette d'actine (Hohenester et Yurchenco 2013). On retrouve également dans certains contextes des liaisons de la Laminine avec d'autres Intégrines comme $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ ou $\alpha V\beta 8$ dans le SNC (X. Wu et Reddy 2012). En terme d'affinité, les Laminines 511 et 521 ont une forte affinité pour l'intégrine $\alpha 6\beta 1$, la laminine 3A32 pour l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, les laminines 211 et 221 pour l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ et la laminine 111 pour l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012).

1.4.1.e Fonctions des Intégrines

Comme décrit plus haut, les Intégrines sont impliquées dans une variété de processus cellulaires. La littérature décrivant ces fonctions des intégrines étant très vaste, je ne citerai

ici que quelques exemples d'expériences fonctionnelles ayant mis en évidence certaines de ces fonctions. L'expression d'une forme constitutivement active de l'intégrine $\beta 1$ dans le neuroépithélium de poulet stimule la neurogenèse de manière non autonome (K. Long et al. 2016). L'intégrine $\alpha 6$ est présente dans les cellules engainantes du système olfactif de la souris, autour du nerf olfactif et dans le bulbe olfactif. Chez des souris présentant une mutation dans la chaîne $\alpha 6$, le bulbe olfactif est plus petit, ce qui suggère que l'Intégrine $\alpha 6$ joue un rôle dans le développement du système olfactif (Whitley et al. 2005).

Chez le poisson-zèbre, les mutants pour l'Intégrine $\beta 1b$ ont un axe plus court avec une queue rétrécie, un œdème cardiaque à 72 hpf, et ils meurent après une semaine de développement. Chez ces mutants, le réseau vasculaire ne se forme pas correctement. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'une version dominante négative de l'Intégrine $\beta 1$, ce qui renforce l'idée que l'Intégrine $\beta 1$ est importante pour la formation des vaisseaux sanguins (Iida et al. 2018). Toujours chez le poisson-zèbre, une autre équipe a perturbé la fonction des Intégrines en utilisant des antagonistes (le peptide RGD et l'échistatine). Ces antagonistes perturbent la croissance et la navigation des axones moteurs primaires, ce qui suggère un rôle des Intégrines dans la croissance et la navigation de ces axones (Becker, McLane, et Becker 2003).

I.4.2 Le Dystroglycan

Le Dystroglycan est le récepteur non-intégrine de la Laminine le plus étudié. Il est présent notamment à la surface des cellules musculaires et des cellules nerveuses (Hohenester 2019).

I.4.2.a Structure du Dystroglycan

C'est un récepteur transmembranaire hétérodimérique composé d'une sous-unité α extracellulaire et d'une sous-unité β transmembranaire (Fig.15). Les deux sous-unités dérivent du gène *DAG1*, qui est hautement conservé chez les "invertébrés" et les vertébrés, et dont le produit est clivé par protéolyse après la traduction (Hohenester et Yurchenco 2013; Barresi et Campbell 2006; Nickolls et Bönnemann 2018; Bello et al. 2015). Les deux sous-unités font l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles incluant une glycosylation (ajout d'un carbohydrate par des enzymes) induisant une flexure de la protéine ou sa liaison à d'autres protéines (Chris J. Moore et Winder 2012; Nickolls et Bönnemann 2018), et des phosphorylations. La glycosylation de la sous-unité α extracellulaire est critique pour les interactions du Dystroglycan avec la Laminine et ses autres ligands comprenant des domaines LG (Chris J. Moore et Winder 2012; Bello et al. 2015), car les Laminines lient un

polysaccharide acide-xylose glucuronique, le matriglycan, qui est fixé au α -DG (α -Dystroglycan) (Fig.15) (Hohenester et Yurchenco 2013; Nickolls et Bönnemann 2018; Hohenester 2019). En effet, des mutations perte de fonction des enzymes glycosyltransférases provoquent une hypo-glycosylation de l' α -DG et une baisse de son affinité pour ses ligands extracellulaires (Nickolls et Bönnemann 2018). La phosphorylation du domaine cytoplasmique de la sous-unité β module son association avec le cytosquelette et les autres interacteurs intracellulaires (Chris J. Moore et Winder 2012). La phosphorylation du α -DG est aussi requise pour sa liaison à la Laminine (Yoshida-Moriguchi et al. 2010). La surexpression d'une protéine mutée au niveau du site de clivage entre les chaînes α et β inhibe ces modifications post-traductionnelles et conduit à des dystrophies musculaires chez des souris (Barresi et Campbell 2006).

L' α -DG se lie au domaine LG4 d'un certain nombre de chaînes α de la Laminine (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012; Hohenester et Yurchenco 2013; Nirwane et Yao 2019; Hohenester 2019). La sous-unité β du Dystroglycan (β -DG) est impliquée dans la transduction des signaux à l'intérieur et vers l'extérieur des cellules (Nirwane et Yao 2019). La sous-unité β -DG s'associe avec la dystrophine/utrophine intracellulaire formant le complexe DGC (*Dystrophin Glycoprotein Complex*) (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012; Hohenester et Yurchenco 2013). Ce complexe se lie aux filaments d'actine (actine-F) (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012). Le Dystroglycan est donc primordial pour l'ancrage des domaines LG de la Laminine au cytosquelette d'actine et plus largement pour la liaison entre la MEC et le cytosquelette (Domogatskaya, Rodin, et Tryggvason 2012; Hohenester et Yurchenco 2013).

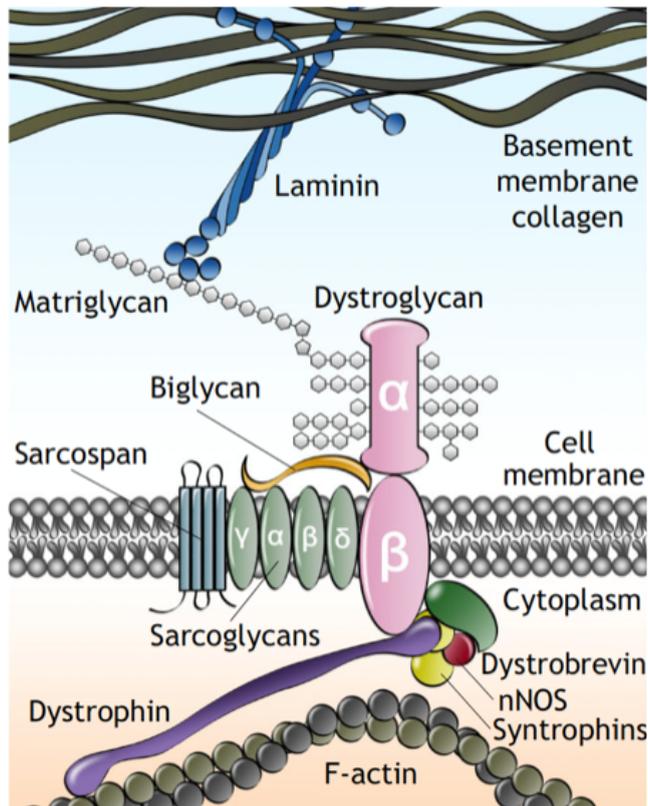


Figure 15 : Schéma du Dystroglycan et de ses liaisons avec les composés intra et extracellulaires (tirée de Nickolls et Bönnemann 2018).

1.4.2.b Expression du Dystroglycan

Le Dystroglycan est fortement exprimé dans les tissus en développement (Barresi et Campbell 2006). Dans le SNC embryonnaire et adulte, le Dystroglycan est détecté au niveau des synapses et des micro-vascularisations cérébrales (Nirwane et Yao 2019). On le trouve également à la surface des pieds astrocytaires (sites d'interaction des astrocytes avec les vaisseaux sanguins), des neurones et des oligodendrocytes (Nirwane et Yao 2019). L'expression du Dystroglycan par les cellules endothéliales n'est pas encore certaine. D'une part, il est absent dans les cellules endothéliales vasculaires du cerveau, mais d'autre part, son expression a été observée dans des cultures de cellules endothéliales, et dans des cellules endothéliales issues de vaisseaux sanguins de cerveaux humains (pour revue voir (Nirwane et Yao 2019).

Chez le poisson-zèbre, l'ARNm maternel du Dystroglycan est détecté au stade 128 cellules de manière ubiquitaire, avant le début de la transcription zygotique. A partir de 10 hpf, les transcrits sont présents dans les cellules adaxiales, le tube neural en développement, le mésoderme, la notochorde et l'hypochorde (Parsons, Campos, et al. 2002).

I.4.2.c Fonctions du Dystroglycan

Chez les souris, une mutation perte-de-fonction du gène *Dagl* provoque une létalité embryonnaire causée par des perturbations fonctionnelles et structurales d'une membrane basale (la membrane de Reichter) qui se forme précocement chez l'embryon murin entre l'endoderme pariétal et le trophoctoderme (Williamson et al. 1997). Par contre, d'autres membranes basales localisées dans d'autres régions chez la souris persistent chez les mutants *Dagl*, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle le Dystroglycan serait, de façon générale, essentiel à l'assemblage des membranes basales (Henry et Campbell 1998; Williamson et al. 1997).

La liaison Laminine-Dystroglycan est essentielle pour les fonctions musculaires. Des mutations du Dystroglycan causent des dystroglycanopathies, un groupe de dystrophies musculaires (Hohenester 2019). Le Dystroglycan est également impliqué dans toute une série de processus développementaux chez la souris : il participe à la structuration du SNC, à la myélinisation, à la morphogenèse des épithéliums, à l'adhésion cellulaire et à la signalisation cellulaire (Nickolls et Bönnemann 2018; Barresi et Campbell 2006). Le Dystroglycan aurait également un rôle important dans la synaptogenèse et l'intégrité vasculaire (Nirwane et Yao 2019), ainsi que dans la navigation des axones puisque des expériences menées chez *C.elegans* ont montré qu'une mutation de *DAG1* provoque des défauts de guidage axonal des motoneurons (Johnson, Kang, et Kramer 2006). Une étude menée par Wright et al. en 2012 chez la souris a par ailleurs montré que le Dystroglycan est nécessaire à l'intégrité des membranes basales le long de la moelle épinière, où migrent les faisceaux axonaux commissuraux en développement. Il permet donc le maintien d'un environnement de migration permissif pour certains axones. Cette étude montre enfin que le Dystroglycan se lie directement au domaine Laminin LG de la protéine *Slit* qui, avec son récepteur *Robo*, fait partie des molécules de guidage axonal. Le Dystroglycan, organisant ainsi la distribution de *Slit in vivo* dans la membrane basale et le plancher de la moelle épinière, joue un rôle critique dans le guidage d'une population d'axones (Wright et al. 2012).

I.4.3 Autres récepteurs de la Laminine

Il existe d'autres récepteurs de la Laminine, qui sont moins étudiés dans la littérature et dont je ne parlerai que très brièvement. Il s'agit du Syndécan et de la molécule d'adhésion

cellulaire du mélanome (ou CD146). Ces récepteurs non-intégrine se lient majoritairement aux domaines LG4-5 de la Laminine (Nirwane et Yao 2019).

1.4.3.a Les Syndécans

Les syndécans sont des HSPG transmembranaires (Arrington et Yost 2009). Il existe quatre membres de cette famille chez les vertébrés : Syndecan-1, -2, -3 et -4. Les Syndécans possèdent un ectodomaine, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire (Iozzo et Schaefer 2015). La plupart des types cellulaires expriment au moins un membre de cette famille (Morgan, Humphries, et Bass 2007). Le Syndecan-3 est présent dans les tissus neuronaux et est largement exprimé pendant le développement chez les vertébrés (Xian, Gopal, et Couchman 2010). Les Syndécans peuvent interagir avec la Laminine via ses domaines LG4-5 qui interagissent avec la chaîne HS des Syndécans (Xian, Gopal, et Couchman 2010). C'est une propriété conservée au sein des 5 Laminines α chez les vertébrés qui peuvent lier le Syndecan-1, -2 et -4 mais aucune étude ne s'est intéressée au Syndecan-3 pour l'instant.

Avec une version tronquée de Syndecan-2 injectée dans des cellules ovariennes de hamster, l'assemblage de la Laminine en matrice ne se fait plus correctement (Klass, Couchman, et Woods 2000). Des mutations perte de fonction de Syndecan-3 chez la souris provoquent des déficits neuronaux ainsi que des défauts de migration neuronale, notamment au niveau des cellules du cerveau antérieur (Hienola et al. 2006).

Chez le poisson-zèbre, des malformations cardiaques surviennent après l'utilisation d'un morpholino ciblant Syndecan-2 (Arrington et Yost 2009). Une étude a aussi montré que le Syndecan-4 régule la prolifération de cellules neuro-épithéliales lors du développement (N. Luo et al. 2016). La mutation du Syndecan-4 entraîne une augmentation de la prolifération alors que sa surexpression entraîne une réduction de la prolifération (N. Luo et al. 2016).

1.4.3.b Le CD146

Il s'agit d'une protéine membranaire ayant deux isoformes, une forme longue et une forme courte, classées selon la longueur de leur queue cytoplasmique. Cette protéine est présente dans la plupart des types cellulaires et peut se lier aux isoformes 411 et 421 de la Laminine *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Z. Wang et al. 2020). Chez le poisson-zèbre, aucun rôle de CD146 en lien avec les membranes basales n'a été mis en évidence pour l'instant.

I.5 Rôles de la Laminine

Le premier rôle attribué à la Laminine date de sa découverte, en 1979 (R. Timpl et al. 1979). Il a alors été proposé que cette glycoprotéine participait, au même titre que le Collagène, à l'organisation structurale des lames basales ou membranes basales. Depuis cette époque, et avec la découverte de récepteurs de la Laminine ayant diverses activités biologiques, d'autres fonctions de la Laminine ont été identifiées, dans des processus variés comme la morphogenèse tissulaire, la différenciation cellulaire, la polarisation cellulaire, la migration cellulaire, la croissance et la navigation axonale.

I.5.1 Formation des membranes basales

Dans les membranes basales, la Laminine se lie au Nidogène-1 qui se lie au Collagène IV. En présence de mutations dans la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine par remplacement d'acides aminés (N802S), il y a une perte de la liaison au Nidogène-1 (Pöschl et al. 1996). De nombreuses études ont montré que la Laminine est essentielle pour l'assemblage des membranes basales. Par exemple, autour des cellules de Schwann en culture et en présence de différentes formes mutées (McKee et al. 2007) extracellulaires des isoformes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ de la Laminine, on ne détecte pas ou beaucoup moins de Laminine 111, de Nidogène-1 ou de Collagène IV en immunofluorescence alors que c'est le cas lorsque les cultures se font en présence de Laminine sauvage. Cela implique que la Laminine 111 s'accumule autour des cellules de Schwann en culture avant que le Nidogène-1 et le Collagène IV s'incorporent dans la membrane basale. La Laminine 111 est donc le premier acteur de l'assemblage des membranes basales dans ce contexte (McKee et al. 2007). D'autres auteurs ont analysé la formation de la MEC chez des embryons de souris et des corps embryonnaires *in vitro* dans un mutant pour la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine, et ont observé qu'il n'y avait plus d'accumulation de collagène IV dans les tissus (Smyth et al. 1999).

Il existe trois mutants principaux régulièrement utilisés dans la littérature en vue d'identifier les fonctions de la Laminine chez le poisson-zèbre. Il s'agit des mutants *bashful* (*bal*, muté pour la chaîne $\alpha 1$), *grumpy* (*gup*, muté pour la chaîne $\beta 1$) et *sleepy* (*sly*, muté pour la chaîne $\gamma 1$). Pour chaque gène/locus, il existe différents types de mutations (insertion, délétion, mutation ponctuelle, etc) qui seront précisées plus tard dans ce texte. De manière générale, les mutants pour la Laminine ont une durée de vie plus courte que les poissons-zèbres sauvages, une résultante de tous les défauts que je présenterai plus tard dans le texte.

Par microscopie électronique, il a été montré que chez les mutants *sly*^{m86/} *sly*^{m466} et *gup*^{m189}, trois mutants obtenus chez le poisson-zèbre avec le mutagène N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) (Stemple et al. 1996), la membrane basale est fortement désorganisée et parfois absente autour de la notochorde (Parsons, Pollard, et al. 2002), ce qui là aussi montre que la Laminine est une protéine indispensable à la formation des membranes basales, au moins dans certains tissus.

I.5.2 Morphogenèse tissulaire et migration cellulaire

En lien avec son rôle crucial dans la formation des membranes basales, la Laminine contrôle certaines étapes de la morphogenèse tissulaire, et je détaillerai ici quelques exemples.

La Laminine est importante pour la formation de la frontière entre le mésencéphale et le rhombencéphale (*Midbrain Hindbrain Boundary, MHB*) chez le poisson-zèbre, qui apparaît comme un pli dans le neuroépithélium au stade 17 hpf. Les cellules de la zone de la MHB se raccourcissent selon l'axe apico-basal, ce qui participe à la formation du pli. Dans des expériences d'imagerie *live* sur les mutants *bal*^{UW1} (mutation ponctuelle - (Paulus et Halloran 2006)), *gup*^{hi1113Tg} (insertion virale dans l'intron 1 (Amsterdam et al. 2004)), *sly*^{m86} (Stemple et al. 1996), une équipe a récemment montré que l'angle du pli de la MHB est plus grand chez les trois mutants et qu'il n'y a pas de raccourcissement apico-basal des cellules du neuroépithélium. Ces résultats montrent que la Laminine 111 est essentielle à la morphogenèse de la MHB (Falat, Voit, et Gutzman 2022).

La Laminine régule également le développement des vaisseaux sanguins qui apparaissent entre les somites chez le poisson-zèbre (*Intersegmental Blood Vessel, ISV*). Des immunohistochimies avec un anticorps polyclonal reconnaissant la Laminine 1 montre sa présence le long de la voie de migration des ISV. Mis à part chez le mutant *bal*^{m190} (ayant également des mutations ponctuelles induites par le mutagène ENU engendrant un codon stop (Schier et al. 1996)) qui forme ces vaisseaux sanguins normalement (Pollard et al. 2006), les mutants Laminine *gup*^{m189}, *sly*^{m86} et *sly*^{m466} présentent un phénotype sévère de formation de ces vaisseaux, visualisés par hybridation *in situ* pour *fli-1*, un marqueur des progéniteurs des vaisseaux (Parsons, Pollard, et al. 2002).

Avec le morpholino dirigé contre la Laminine $\alpha 4$ ou le mutant *bal*^{m190}, il y a une expression normale de *fli-1*. Par contre, dans le cas d'une double perte de fonction, il n'y a plus d'expression de *fli-1* au niveau des jonctions entre somites, ou celle-ci est fortement retardée.

Des expériences suggèrent qu'il ne s'agit pas d'un problème de différenciation ou de spécification des cellules endothéliales mais plutôt d'un problème de migration. En effet, en étudiant la migration des ISV avec la lignée *fli-EGFP* (Lawson et Weinstein 2002) chez des doubles morphants *lama1/lama4*, il y a moins d'activité protrusive des progéniteurs des vaisseaux, moins de croissance et un mauvais guidage de ces cellules (Pollard et al. 2006). Chez les mutants *bal^{ra69}*, il y a également des problèmes dans la mise en place des vaisseaux à proximité de l'œil (Semina et al. 2006).

Cependant, il reste possible que ces différents phénotypes soient dûs à des défauts de différenciation cellulaire, et non pas seulement dûs à des défauts de morphogenèse ou de migration. Des expériences supplémentaires d'imagerie *live* devront être réalisées pour étudier plus en détail les mécanismes impliqués.

Toujours chez le poisson-zèbre, chez le mutant *bal^{UW1}*, la morphogenèse de la coupe optique est fortement affectée. La coupe optique est constituée de la rétine et de l'épithélium pigmenté qui entourent progressivement le cristallin lors du processus d'invagination. Des expériences d'imagerie *live* sur ce mutant montrent que la vésicule optique est plus ronde et plus symétrique que chez les contrôles. L'épithélium pigmenté est normal mais la rétine est désorganisée et le cristallin n'est pas correctement entouré par les deux tissus, suggérant des défauts d'invagination (Fig.16) (Bryan, Chien, et Kwan 2016). Ce phénotype de cristallin protrusif a également été observé par Parsons et al., 2002 dans les mutants *gup^{m189}*, *sly^{m86}* et *sly^{m466}* (Parsons, Pollard, et al. 2002).

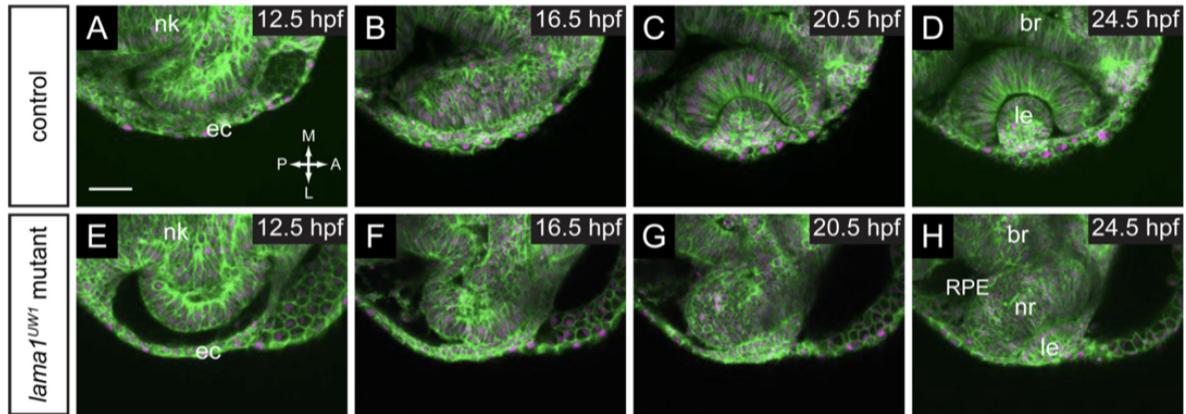


Figure 16 : Les défauts de la coupe optique chez les mutants bal^{UW1} ($lama1^{UW1}$) révélés par imagerie *live* (tirée de Bryan, Chien, et Kwan 2016). EGFP-CAAX permet de marquer les membranes de manière ubiquitaire et H2A.F/Z-mCherry les noyaux (injection d'ARNm). *nk*, tube neural; *ov*, vésicule optique; *ec*, ectoderme; *br*, cerveau; *RPE*, épithélium rétinien pigmenté; *nr*, rétine neurale; *le* (*lens*), cristallin.

Grâce à l'analyse en imagerie *live* de lignées transgéniques $Tg(lama1:lama1-sfGFP)$ et $Tg(lama1:lama1-mKate2)$ permettant de visualiser le comportement de la Laminine autour de la coupe optique lors de la morphogenèse de l'oeil, des déformations dynamiques de la Laminine ont été mises en évidence. Les auteurs ont également observé qu'un groupe de cellules situées dans la rétine postérieure, les "*rim cells*", migrent de manière active sur la Laminine grâce à des cryptopodes (protrusions basales qui s'étendent sous la cellule voisine en direction de la migration) avant et pendant l'invagination de la coupe optique. Ce mouvement permet leur déplacement de la zone médiale de la rétine vers la zone latérale, et participe donc au processus d'invagination. Ils ont mis en évidence par l'utilisation d'un morpholino ciblant la Laminine $\alpha 1$ que cette migration dépend de la topologie de la matrice qui n'est pas organisée de la même manière dans toute la coupe optique, et qui n'a pas les mêmes propriétés mécaniques (Soans et al. 2022).

I.5.3 Différenciation cellulaire

Les cellules neuro-épithéliales de poulet en culture augmentent leur prolifération et se différencient en présence de Laminine 1 dans leur milieu de culture. De plus, ces cellules expriment la chaîne $\alpha 1$ lorsqu'elles se différencient (Frade, Martínez-Morales, et Rodríguez-Tébar 1996). La Laminine a le même effet sur des progéniteurs du tube neural en culture chez le poulet, elle induit la différenciation de ces cellules en neurones (Heaton et Swanson 1988). Sur des cellules souches embryonnaires humaines (Ma et al. 2008) et des

cultures de cellules neuro-épithéliales murines (Drago, Nurcombe, et Bartlett 1991), le même effet sur la différenciation est observé (Walma et Yamada 2020).

Dans des corps embryonnaires dont les cellules sont mutées (par KO, *Knock-Out*) pour la chaîne $\gamma 1$, il n'y a plus de différenciation des épiblastes et les membranes basales ne se forment pas (Murray et Edgar 2000; Li et al. 2002). Chez des souris également KO pour la chaîne $\gamma 1$ (Smyth et al. 1999) ou $\beta 1$ (Miner et al. 2004), l'endoderme ne se différencie pas, ce qui provoque une létalité embryonnaire (Miner et al. 2004; Yao 2017).

En utilisant les mutants bal^{tp82} , gup^{tg210} et sly^{ii263a} chez le poisson-zèbre, (Schier et al. 1996) une autre équipe a étudié le rôle de la Laminine dans le maintien de la rétine chez le poisson-zèbre (Biehlmaier, Makhankov, et Neuhaus 2007). En effet, en plus des défauts de morphogenèse de la coupe optique décrits plus haut, les mutants Laminine présentent des défauts de différenciation cellulaire dans la rétine et le cristallin. Les trois mutants ont un cristallin réduit en taille ou absent et leur membrane limitante interne (qui marque la limite entre la partie vitreuse de la rétine et les neurones) est altérée. Ils présentent également des altérations dans la couche des cellules ganglionnaires et dans la fasciculation du nerf optique : au lieu d'avoir les cellules organisées en trois couches avec le nerf optique qui s'organise en un seul groupe d'axones, il y a plus de couches de cellules, elles sont désorganisées et le nerf optique est formé de plusieurs petits fascicules. En testant la réponse optocinétique et en faisant des électro-rétinogrammes, les auteurs constatent que bal^{tp82} a une réponse pour les deux tests ce qui n'est pas le cas des deux autres mutants. Cela montre que les mutants bal^{tp82} peuvent voir alors que les autres sont aveugles (Biehlmaier, Makhankov, et Neuhaus 2007). Les mutants bal^{a69} ont également de nombreux défauts morphologiques de l'œil, comme tous les mutants *bashful* en général (Semina et al. 2006).

Par contre, comme pour les défauts de la notochorde que nous verrons plus tard, (Parsons, Pollard, et al. 2002) les mutants sly^{ii263a} et gup^{tg210} ont un phénotype plus marqué que le mutant bal^{tp82} avec en plus un raccourcissement des segments extérieurs des photorécepteurs, qui sont par ailleurs moins nombreux. Dans la couche plexiforme externe, il n'y a pas de défaut d'expression d'un marqueur synaptique des synapses en ruban, mais leur ultrastructure est affectée pour les deux mutants. Il y a également une augmentation de la mort cellulaire dans la rétine. Les sous-unités $\gamma 1$ et $\beta 1$ de la Laminine jouent donc un rôle important dans la différenciation des photorécepteurs et de leurs synapses ainsi que dans le maintien de la rétine chez le poisson-zèbre (Biehlmaier, Makhankov, et Neuhaus 2007).

La Laminine est importante pour le développement de la notochorde chez le poisson-zèbre. Il est cependant difficile de distinguer si les défauts observés chez les mutants sont dûs à une fonction dans la morphogenèse et/ou la différenciation cellulaire. Chez les mutants *sly*^{m86}/*sly*^{m466} (chaîne γ 1) et *gup*^{m189} (chaîne β 1), les cellules de la notochorde présentent des défauts de différenciation et de morphogenèse: elles ne sont pas correctement vacuolées, l'expression de marqueurs précoces persiste (ex : *echidna hedgehog*) et il y a plus d'apoptose (Parsons, Pollard, et al. 2002; Stemple et al. 1996). Pour déterminer si la Laminine contrôle ces processus de manière cellulaire-autonome, des expériences de transplantation ont été réalisées. En transplantant le *shield* embryonnaire (la région de l'embryon qui contient les précurseurs de la notochorde) d'un embryon donneur dans un embryon hôte, on observe la formation d'un axe secondaire qui produit une notochorde issue de l'embryon donneur et entourée de cellules de l'hôte. La notochorde secondaire issue d'une transplantation à partir d'embryons donneurs *sly*^{m86}, *sly*^{m466} ou *gup*^{m189} dans des embryons hôtes contrôles est normale, et la transplantation inverse (notochorde contrôle chez les mutants) permet aussi de former une notochorde normale. Cela montre que la formation de la notochorde est contrôlée par les chaînes *lamB1* et *lamC1* de manière à la fois non-autonome et autonome (Parsons, Pollard, et al. 2002).

Chez les mutants *bal*^{m190} (chaîne α 1) par contre, le phénotype est moins marqué car les auteurs observent des défauts uniquement dans les régions antérieures de la notochorde avec une absence d'immunoréactivité à la Laminine et un problème de différenciation des cellules de la notochorde. De manière générale, chez ces mutants, la malformation globale de l'embryon est moins marquée (Pollard et al. 2006). Le phénotype moins sévère des mutants *bal*^{m190} pourrait être causé par la redondance fonctionnelle avec d'autres chaînes α . La chaîne α 5 est exprimée dans la notochorde et les morphants α 5 présentent des défauts morphologiques de la notochorde, associés à la persistance de marqueurs précoces. α 5 pourrait avoir un rôle dans la transition chordamésoderme/notochorde. La chaîne α 4 est également exprimée dans la notochorde avec en plus une expression maternelle, par contre, les morphants α 4 ne présentent pas de défauts de la notochorde même si les embryons ont une tête plus petite. L'injection de morpholino α 4 ou α 5 dans les mutants *bal*^{m190} provoque des défauts plus importants, ce qui indique une redondance fonctionnelle entre ces trois chaînes dans le développement de la notochorde (Pollard et al. 2006).

I.5.4 Polarité cellulaire

I.5.4.a La polarité apico-basale

La polarité apico-basale est une propriété des cellules épithéliales. Leur surface apicale est en contact avec le milieu extérieur ou l'intérieur des cavités internes de l'organisme, et la surface basale est localisée à l'opposé, en contact avec la membrane basale.

Chez des embryons de poissons-zèbres contrôles, les progéniteurs de la rétine sont bien alignés et pointent vers le cristallin, ce qui n'est pas le cas chez les mutants *bal^{UW1}*. Leur polarité apico-basale est perturbée car avec un marquage de la kinase aPKC (*Atypical Protein Kinase C*), un marqueur apical localisé à la limite de la rétine et de l'épithélium pigmenté, on voit que cette protéine est mal localisée, suggérant une inversion de la polarité (Bryan, Chien, et Kwan 2016). Chez les mutants *gup^{hi113b}* et *sly^{hi3890}*, il y a également une mauvaise polarisation apico-basale des cellules de la rétine (*inside out*) (Lee et Gross 2007).

Lors de l'évagination de la vésicule optique chez le poisson-zèbre, les cellules ne traversent pas la ligne médiane lors de leurs divisions cellulaires (contrairement à ce qui se passe lors de la formation du tube neural). Des marqueurs de polarité apico-basale (position du centrosome, de Zona Occludens-1 (ZO-1), d'aPKC ou de *pard6 $\gamma\beta$* , un déterminant apical) apparaissent dans la vésicule optique autour de 12 hpf. L'injection d'un morpholino ciblant la sous-unité $\gamma 1$ de la Laminine perturbe la polarité apico-basale des cellules de cette zone, les marqueurs apicaux sont présents des deux côtés (apical et basal) des cellules, elles sont plus rondes, se rétractent parfois et sont présentes en dehors du domaine de l'œil. De plus, en présence de billes recouvertes de Laminine insérées dans la région de l'œil, les cellules orientent leur surface apicale à l'opposé des billes (Ivanovitch, Cavodeassi, et Wilson 2013). Ces résultats montrent que la Laminine est à la fois nécessaire et suffisante pour établir la polarité apico-basale des progéniteurs de l'œil pendant l'évagination de la vésicule optique chez le poisson-zèbre.

I.5.4.b La polarité neuronale

Les neurones sont les types cellulaires les plus polarisés car ils possèdent de longues protrusions, axones et dendrites, qui ont des propriétés et des fonctions différentes. La polarisation des neurones (axe dendrite/soma/axone) permet leur fonctionnement correct et notamment la transmission des messages nerveux. Elle est contrôlée par des signaux extracellulaires et intracellulaires ainsi que par le cytosquelette (Takano et al. 2015). Les cultures de neurones hippocampaux de souris ont été utilisées comme modèle d'étude de ces

signaux. Ils se polarisent *in vitro* selon cinq stades : (1) les neurones post-mitotiques possèdent de nombreux filopodes et lamellipodes, (2) qui s'étendent et deviennent des neurites immatures. (3) Un seul neurite va s'étendre rapidement et devenir l'axone, on parle de spécification axonale, tandis que les autres neurites deviennent des dendrites. (4) L'axone et les dendrites grandissent rapidement puis (5) la différenciation se termine (Fig.17) (Takano et al. 2015; Polleux et Snider 2010).

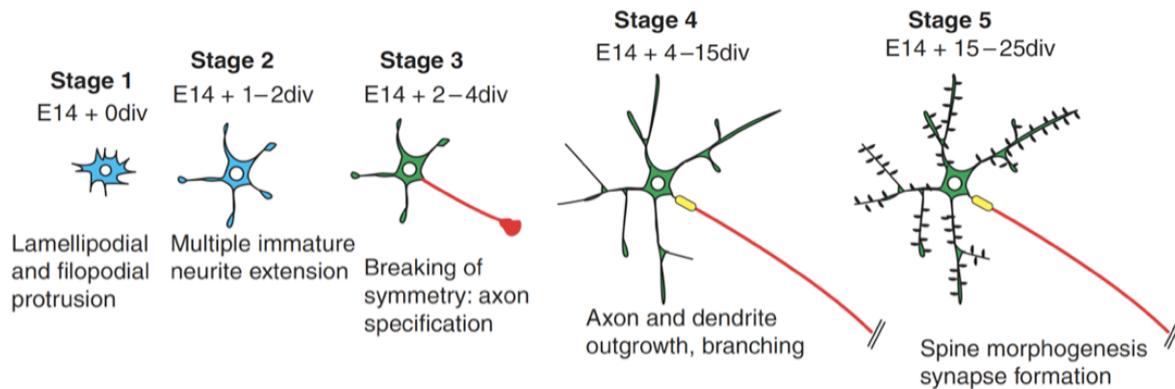


Figure 17 : Les étapes de la polarisation des neurones hippocampaux de souris *in vitro* (tirée de Polleux et Snider 2010). (1) Les neurones post-mitotiques possèdent de nombreux lamellipodes et filopodes. (2) Les protrusions s'étendent et deviennent des neurites non différenciés. (3) Un neurite va se spécifier en axone tandis que les autres neurites deviennent des dendrites. (4) L'axone et le dendrite vont s'allonger et faire du *branching*. (5) Les synapses se forment.

Dans des cultures primaires de neurones hippocampaux de souris, la présence de bandes de Laminine dans les boîtes de cultures définit la polarité des neurones et augmente la probabilité qu'un neurite devienne un axone (Esch, Lemmon, et Banker 1999), donnant une première indication de son rôle dans la polarisation neuronale.

In vivo, la Laminine a été impliquée dans la polarité neuronale des cellules ganglionnaires de la rétine (Randlett et al. 2011). Les étapes de la mise en place de la polarité de ces neurones sont décrites dans la Figure 18A. En condition sauvage, les cellules ganglionnaires de la rétine (*Retinal Ganglion cells, RGC*) venant de se former étendent un prolongement en direction de la membrane basale de la rétine (*Internal Limiting Membrane, ILM*). Cette protrusion basale rentre alors en contact avec la Laminine 1, ce qui a pour effet de la stabiliser. Ce contact avec la Laminine est suivi d'une accumulation stable, au point de contact, de la construction *Kif5C⁵⁶⁰-YFP*, un marqueur de spécification axonale.

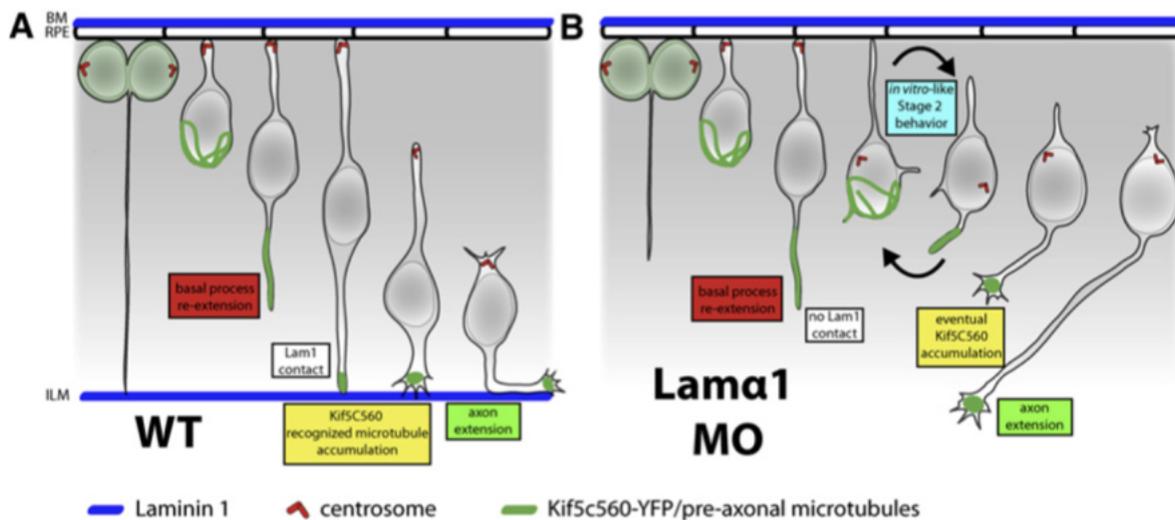


Figure 18 : Schéma illustrant l'émergence des axones des RGC *in vivo* chez le poisson-zèbre, en condition contrôle et en absence de Laminine $\alpha 1$ (tirée de Randlett et al. 2011).

Les *KIFs* font partie de la super-famille des *Kinésines* participant au transport des organelles dans les neurones (Nakata et Hirokawa 2003). Il a été montré qu'une version tronquée de *Kif5*, un des membres de la famille *Kinésine-1* (*Kif5C⁵⁶⁰*), s'accumule dans les axones mais pas dans les dendrites (Nakata et Hirokawa 2003). Une autre équipe a montré que l'accumulation stable de *Kif5C⁵⁶⁰* dans un seul neurite est un marqueur précoce de la spécification axonale dans des cultures de neurones hippocampaux (Jacobson, Schnapp, et Banker 2006). En effet, leurs expériences en time-lapse de neurones exprimant *Kif5C⁵⁶⁰* fusionnée avec une protéine fluorescente ont montré qu'une accumulation stable du marqueur se produit dans un neurite juste avant que celui-ci ne devienne significativement plus long que les autres neurites (Jacobson, Schnapp, et Banker 2006).

L'équipe de William A. Harris (Randlett et al. 2011) a donc ré-utilisé ce marqueur *in vivo* et montré grâce à des expériences de surexpression qu'il y avait une accumulation de *Kif5C⁵⁶⁰-YFP* à l'extrémité du neurite sélectionné pour former un axone dans les RGC. Cette accumulation a lieu en même temps que le contact des RGC avec la surface basale de la rétine. Il y a donc là un rôle potentiel de la MEC dans ce processus de polarisation. Pour tester le rôle de la Laminine, les auteurs ont utilisé un morpholino dirigé contre la chaîne Laminine $\alpha 1$. Ils ont observé une perturbation de l'organisation intra-rétinale des axones des RGC qui peut être due à des défauts de guidage ou de polarisation. Des transplantations ont

été réalisées pour étudier l'autonomie cellulaire de ces défauts. Lorsque des RGC sauvages se retrouvent dans un environnement déplété de Laminine $\alpha 1$, on observe que la phase multipolaire (c'est-à-dire une phase durant laquelle les neurones possèdent plusieurs neurites indifférenciés, avant que l'un d'eux ne soit spécifié en axone) des RGC est prolongée et que l'extension des axones est parfois mal orientée. L'expérience inverse (RGC morphantes dans un environnement sauvage) n'a pas montré de défauts, ce qui démontre que le phénotype morphant $\alpha 1$ n'est pas cellulaire-autonome (Randlett et al. 2011).

Les auteurs de cette étude ont ensuite testé si la Laminine est suffisante pour spécifier les axones des RGC, *in vitro* et *in vivo*. Lorsque les auteurs placent des billes recouvertes de Laminine 1 à proximité des RGC, ils observent, *in vitro* et *in vivo*, une interaction bille-RGC qui induit la translocation de *Kif5c⁵⁶⁰-YFP* et donc la polarisation neuronale de ces dernières (Randlett et al. 2011). La Laminine $\alpha 1$ est donc à la fois nécessaire et suffisante pour la polarisation neuronale des RGC chez le poisson-zèbre. En utilisant le mutant *bal^{UWI}*, une autre équipe a montré que les neurones du noyau du faisceau longitudinal médian (nucMLF) projettent de nombreuses protrusions alors qu'en condition sauvage ces neurones sont unipolaires. Ceci suggère également un rôle de la Laminine $\alpha 1$ dans la polarisation de cette population de neurones (Paulus et Halloran 2006).

I.5.5 Migration neuronale

Une des premières équipes à avoir observé que la Laminine était essentielle à la migration des neurones est l'équipe de E. Trenkner, qui a montré qu'un anticorps bloquant la Laminine inhibe la migration des neurones des microcultures de neurones de cerveau murin (Liesi, Seppälä, et Trenkner 1992).

Lors du développement des mammifères, les neurones qui forment les six couches du cortex cérébral sont générés dans le neuroépithélium ventriculaire puis migrent vers le futur cortex. Chez des souris mutées pour la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine, à partir de E14.5, des défauts d'organisation du cortex apparaissent : certaines cellules ne migrent pas suffisamment, ou de manière ectopique (plus rarement), et celles qui sont correctement localisées sont désordonnées. Ces données montrent l'importance de la Laminine dans la migration neuronale (Chen et al. 2009).

Dans le cerveau adulte des mammifères, de nouveaux neurones sont générés dans la zone sous-ventriculaire du ventricule latéral et migrent de manière tangentielle en formant des chaînes de cellules dans la voie de migration rostrale (*Rostral Migration Stream, RMS*) vers le bulbe olfactif (*Olfactory Bulb, OB*). Les cellules migrantes, appelées neuroblastes,

expriment les Laminines $\alpha 2$ et $\alpha 4$ ainsi que les Intégrines $\beta 1$ et $\beta 5$ dans le RMS. Chez des souris mutantes pour l'Intégrine $\beta 1$, le RMS est perturbé et chez des souris mutantes pour les sous-unités Laminine $\alpha 2$ ou $\alpha 4$, le RMS est également perturbé et les chaînes de cellules migrantes ne se forment pas. Les sous-unités Laminines $\alpha 2$ et $\alpha 4$ contrôlent la formation des chaînes de cellules migrantes, et donc la migration des neuroblastes dans le RMS, *via* leur récepteur Intégrine $\beta 1$ (Belvindrah et al. 2007).

Chez le poisson-zèbre, les neurones faciaux branchiomoteurs (*Facial Branchiomotor Neurons, FBMN*) naissent dans le rhombomère 4 ("rhombomère" est le nom donné aux subdivisions du cerveau postérieur) et migrent tangentiellement vers les rhombomères 6 et 7. Des injections d'un morpholino ciblant *lama1* et l'étude de mutants *bal^{b765}* (non publié, Sittaramane et al. 2009), montrent que cette migration tangentielle n'a pas lieu en l'absence de Laminine $\alpha 1$ (Sittaramane et al. 2009). Des conclusions similaires sont faites suite à l'observation de mutants *bal^{UWI}* (Paulus et Halloran 2006). L'étude par imagerie *live* des morphants confirme ces résultats : les FBMN migrent plus lentement vers le rhombomère 5. Ces défauts sont associés à une perte de directionnalité des protrusions qui se forment aléatoirement chez les morphants tandis que chez les contrôles elles sont toutes dirigées tangentiellement (Sittaramane et al. 2009). De plus, lors de la migration de ces neurones, leurs centrosomes initialement localisés ventro-médialement se relocalisent dorsalement après un contact avec la Laminine, phénomène corrélé à une accélération de la migration. En absence de Laminine $\alpha 1$ (mutant *bal^{UWI}* de la chaîne $\alpha 1$ ou morpholino), les FBMN sortent de leur chemin de migration, n'accélèrent plus et ne réorientent plus leurs centrosomes, ce qui montre l'importance de la Laminine dans la migration des FBMN chez le poisson-zèbre (Grant et Moens 2010).

I.5.6 Croissance et navigation axonale

La Laminine participe à la navigation *in vitro* des cônes de croissance des neurones de la racine dorsale du poulet (Kuhn, Schmidt, et Kater 1995) et, aussi *in vitro*, à la croissance des axones des neurones de l'hippocampe de la souris (Esch, Lemmon, et Banker 1999). Chez *C. elegans*, la Laminine contrôle la navigation des axones des neurones associés aux canaux, il s'agit d'une paire de neurones qui naissent dans la tête de l'animal puis migrent postérieurement vers le milieu de l'embryon où ils vont chacun étendre deux axones (Forrester et Garriga 1997). Chez les mutants de la chaîne α , ces axones sont désorganisés et défasciculent (Forrester et Garriga 1997). Chez la drosophile, des expériences ont montré que

Lama1 est nécessaire au guidage des axones ocellaires (García-Alonso, Fetter, et Goodman 1996).

Des expériences réalisées sur des neurones rétiniens de xénopes *ex vivo* ont montré que la Laminine favorise non seulement la croissance axonale mais peut aussi modifier le comportement des cônes de croissance en réponse à des molécules de guidages solubles. Les auteurs de ces travaux ont observé qu'en présence de Laminine, les taux d'AMPC diminuent dans les cônes de croissance, ce qui inverse leur réponse à la *Nétrine-1* (une molécule de guidage qui sera décrite dans la deuxième partie de l'introduction), qui, initialement attractive, devient une molécule répulsive (Höpker et al. 1999; Weinl et al. 2003). Ce mécanisme semble être médié par les intégrines $\beta 1$, car en présence d'anticorps anti- $\beta 1$, ce changement de réponse est aboli (Höpker et al. 1999). La Laminine module également la réponse *in vitro* d'axones des ganglions de la racine dorsale mis en présence de *Slit2*, un ligand du récepteur *Robo*, couple qui sera décrit plus tard dans le texte. En présence de Laminine, *Slit2* a un effet répulsif, ce qui n'est pas le cas en absence de Laminine (Nguyen-Ba-Charvet et al. 2001).

L1 est une molécule transmembranaire d'adhésion cellulaire exprimée dans le système nerveux, qui se lie directement à la Laminine. L1 régule la migration des cônes de croissance en adhérant (*grip phase*) et en glissant (*slip phase*) sur la Laminine (mécanisme de *molecular clutch*) comme l'ont montré des expériences réalisées sur des cultures de neurones d'hippocampes murins (Abe et al. 2018; 2021). Lorsqu'ils poussent sur des substrats rigides recouvert de Laminine, le temps de *grip phase* des cônes de croissance augmente et ces neurones font de plus longs axones. Sans Laminine il y a pas d'augmentation de cette phase et une diminution de la longueur des axones, même sur milieu rigide (Abe et al. 2021). Des expériences menées *in vivo* sur des sauterelles montrent également que la Laminine est essentielle à la croissance des axones et au guidage de leur cône de croissance (Bonner et O'Connor 2001).

Concernant maintenant plus spécifiquement le poisson-zèbre, Wolman et al 2008 ont montré que la Laminine $\alpha 1$ influence le comportement des cônes de croissance des axones provenant du nucMLF *in vivo*. En condition sauvage, les corps cellulaires de ces neurones sont localisés dans la partie ventrale du cerveau médian et envoient leurs axones dans le cerveau postérieur, de manière fasciculée (Wolman et al. 2008). Chez des mutants *bal^{UW1}*, les axones provenant du nucMLF sortent de manière aberrante de la zone du nucMLF avant de converger vers le

cerveau postérieur. Ces axones semblent défasciculer et se bloquer dans le cerveau postérieur (Paulus et Halloran 2006; Wolman et al. 2008). Globalement, les auteurs ont observé, chez les mutants *bal^{UW1}*, des défauts de comportements des cônes de croissance qui se divisent et produisent des axones qui divergent, une augmentation du *branching* et un taux de croissance réduit des axones issus du nucMLF (Wolman et al. 2008). Ces résultats suggèrent que la Laminine $\alpha 1$ pourrait agir au moins en partie en tant que substrat permissif pour les neurones du nucMLF.

Les mutants *bal^{UW1}* présentent en outre des défauts multiples de guidage axonal, affectant d'autres populations de neurones. En condition sauvage, les RGC de poissons-zèbre projettent vers le toit optique contralatéral. Chez les mutants, à 60 hpf, certains axones des RGC ne traversent pas la ligne médiane et projettent du côté ipsilatéral. Parmi ceux qui projettent du côté contralatéral, certains axones se séparent du tractus optique et se dirigent vers l'avant au lieu de suivre une direction postérieure (Paulus et Halloran 2006; Karlstrom et al. 1996). Les axones formant les tractus de différentes commissures (antérieure et ventrale post-optique) présentent également des défauts de traversée de la ligne médiane chez les mutants par rapport aux contrôles, ce qui induit des malformations de ces commissures. Les axones des neurones du noyau bilatéral du tractus ventral post-optique (nucTPOC) ont leur navigation altérée et ils ne parviennent pas à fasciculer correctement (Paulus et Halloran 2006). Concernant les axones reticulospinaux qui, en conditions sauvages traversent la ligne médiane (pour certains d'entre eux) et fasciculent le long du MLF, les auteurs ont observé que les axones restent « bloqués » au niveau de la ligne médiane, et parfois fasciculent le long de celle-ci chez les mutants *bal*. Les motoneurones spinaux présentent eux aussi des défauts de guidage axonal. Par exemple, l'axone primaire rostral (RoP) est indétectable, ce qui laisse supposer qu'il est très probablement dérouté. Cette hypothèse est appuyée par l'existence d'un axone supplémentaire qui se développe parallèlement à l'axone primaire caudal (CaP). Il y a également plus de *branching* des axones moteurs à des stades plus tardifs (Paulus et Halloran 2006). Chez les mutants *bal^{a69}*, il y a enfin des défauts de projections des axones formant le nerf optique (Semina et al. 2006).

I.5.7 Rôle de la Laminine dans le système olfactif

Ma thèse porte sur le rôle de la Laminine dans le développement du système olfactif chez le poisson-zèbre. Je m'attache donc ici à décrire ce qui est connu du rôle de la Laminine dans la formation du système olfactif chez les rongeurs.

Dans le système olfactif des souris et des rats, la Laminine 111 est présente autour du nerf olfactif, dans la membrane basale de l'épithélium olfactif et la *lamina propria*. La Laminine 111 est également présente autour de la zone qui définit le point d'entrée des axones dans le bulbe olfactif (H. B. Treloar, Nurcombe, et Key 1996; Julliard et Hartmann 1998; Shay, Greer, et Treloar 2008). Chez des souris à E9.5, de la Laminine est détectée par immunofluorescence à la limite de la placode olfactive et du cerveau et à E10.5, les premiers axones qui sortent de l'épithélium olfactif s'étendent sur la couche de Laminine. A E11.5, l'expression de la Laminine (et celle du Collagène IV) coïncide avec le nerf olfactif. Cette même équipe a ensuite étudié *in vitro* des explants d'épithélium olfactif embryonnaire et les auteurs ont observé qu'en présence de Laminine ou de Collagène IV dans le milieu de culture, les neurones olfactifs forment de longs neurites qui croissent seuls, ou en formant des fascicules, avec d'autres neurites (Whitesides et LaMantia 1996). Ces résultats sont confirmés également *in vitro*, sur des cultures d'épithéliums olfactifs embryonnaires de rats, où la présence de Laminine augmente l'extension des axones des neurones sensoriels olfactifs (Karl W. Kafitz et Greer 1997; Tisay et Key 1999). Enfin, la Laminine est fortement exprimée dans le nerf olfactif et les glomérules observés *in vivo* chez le rat, zones de projections des axones sensoriels olfactifs, ce qui suggère que la Laminine constitue un substrat favorable à l'extension de ces axones (Karl W. Kafitz et Greer 1997; 1998).

Le marquage de la Laminine chez le rat coïncide avec celui des cellules engainantes (Shay 2008), des cellules que je décrirai plus tard, qui sont présentes dans le nerf olfactif, dans la couche du nerf olfactif du bulbe olfactif et qui sont des substrats aidant la croissance des axones olfactifs *in vitro* (K. W. Kafitz et Greer 1999). *In vitro*, la présence de Laminine promeut le développement des cellules engainantes, et les axones des neurones sensoriels olfactifs se développent préférentiellement sur ces dernières. L'hypothèse est que la Laminine stimule la croissance des axones sensoriels olfactifs via les cellules engainantes chez les rats (Tisay et Key 1999) Shay & al 2008 proposent que ces dernières sécrètent la Laminine 1 (Shay, Greer, et Treloar 2008).

II Le développement du système olfactif

II.1 Description générale du système olfactif : cas des mammifères et des insectes

L'olfaction est un sens chimique qui permet de détecter des molécules présentes dans l'environnement. C'est un sens primordial chez toutes les espèces animales car il leur permet de sélectionner leur nourriture, de prévenir des dangers présents dans leur environnement et d'établir des interactions sociales et sexuelles.

Dans cette première partie très générale, je présenterai brièvement le système olfactif principal des mammifères et des insectes, deux groupes d'animaux chez lesquels ce système a été étudié en détail, et dont les caractéristiques ont permis de dégager les propriétés fondamentales et universelles de ce système sensoriel. Ces deux groupes d'animaux partagent de nombreuses similarités quant à l'organisation de leur système olfactif. On retrouve la même organisation anatomique avec un organe sensoriel périphérique qui contient les neurones sensoriels bipolaires capable de capter les odorants. Leur axone projette de manière fasciculée directement dans le système nerveux central vers le bulbe olfactif (mammifères) ou le lobe antennaire (insectes). Ce sont les premiers relais olfactifs dans lesquels les axones défasciculent pour innover les glomérules, où ils établissent des synapses avec des neurones de projection transmettant les informations sensorielles vers d'autres relais de l'olfaction.

Les mammifères possèdent également un système olfactif accessoire appelé système voméronasal. Les neurones sensoriels de ce système expriment des récepteurs voméronasaux spécifiques (VR), qui sont impliqués dans la détection des phéromones et projettent sur le bulbe accessoire. Je ne le détaillerai pas afin de me concentrer sur le système principal.

Le but de cette première partie est de donner une vue globale de l'organisation du système olfactif chez différentes taxons car, on le verra, la plupart de ces caractéristiques sont partagées avec le système olfactif des poissons-zèbres qui sera décrit plus en détail dans une seconde partie.

II.1.1 L'organe sensoriel olfactif et les récepteurs olfactifs

Chez les mammifères, l'organe sensoriel olfactif, appelé muqueuse olfactive, se situe dans la cavité nasale. La muqueuse olfactive est formée de deux couches, l'épithélium olfactif (*Olfactory Epithelium*, *OE*) comprenant notamment les corps cellulaires des neurones sensoriels olfactifs (*Olfactory Sensory Neuron*, *OSN*), et la *lamina propria* située sous l'OE,

La neurogenèse des OSN, qui commence au cours du développement embryonnaire, se poursuit tout au long de la vie et implique plusieurs facteurs de transcription tels que *Asc11* aux stades précoces puis *Neurog1* et *NeuroD* plus tardivement (Tufo et al. 2022). Les OSN sont des neurones bipolaires comprenant une dendrite apicale qui se termine par un renflement appelé bouton dendritique d'où partent des cils tapissant la surface de l'OE, et baignant dans le mucus qui recouvre tout l'OE (Fig.19 & Fig.20). En plus des OSN, sont présentes dans l'OE les cellules sustentaculaires (qui assurent un soutien), la partie apicale des glandes de Bowman qui permettent la sécrétion du mucus et les cellules souches basales et horizontales, qui permettent la production continue de nouveaux OSN (Fig.19 & Fig.20). Dans la *lamina propria*, on trouve des vaisseaux sanguins, les OEC (Akins et Greer 2006), des faisceaux d'axones d'OSN, et la partie basale des glandes de Bowman (pour revue voir (Miller et al. 2010; Nedelec, Dubacq, et Trembleau 2005; T. Imai, Sakano, et Vosshall 2010).

Suite à la découverte historique de la grande famille de gènes codants les récepteurs olfactifs (*Odorant Receptors, OR*) des mammifères (Buck et Axel 1991), qui a valu à leurs auteurs le Prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2004, de nombreuses études menées chez la souris et le rat ont montré qu'il existe environ 1 000 gènes fonctionnels codant ces OR et que chacun de ces gènes est exprimé dans une zone particulière de l'OE (Ressler, Sullivan, et Buck 1993; Vassar, Ngai, et Axel 1993; Tufo et al. 2022; Buck et Axel 1991; Mombaerts et al. 1996), de manière monogénique et mono-allélique (Mombaerts et al. 1996). Les protéines codées par ces gènes sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G qui, en liant des molécules odorantes, vont activer la protéine Gs au cours de la différenciation des OSN, puis Golf lorsque les OSN sont matures (Takeshi Imai et Sakano 2008; Lodovichi 2021). Les OR sont fortement concentrés au niveau des cils des OSNs, ce qui leur permet de capter les molécules odorantes entrant dans la cavité nasale.

Chez de nombreux insectes, les organes sensoriels olfactifs principaux sont les antennes et parfois les palpes maxillaires. Même s'il existe une multitude de formes différentes d'antennes, elles possèdent toutes des sensilles olfactives. Ces sensilles contiennent les dendrites de neurones récepteurs olfactifs (*Olfactory Receptor Neurons, ORN*), équivalents des OSN), pour lesquelles elles assurent un environnement protecteur et propice à l'interaction des molécules odorantes avec les OR (T. Imai, Sakano, et Vosshall 2010; Hansson et Stensmyr 2011; W. Pan 2013; Yan et al. 2020). A la base des sensilles on trouve également les cellules de soutien (*Supporting cells*) (Fig.20).

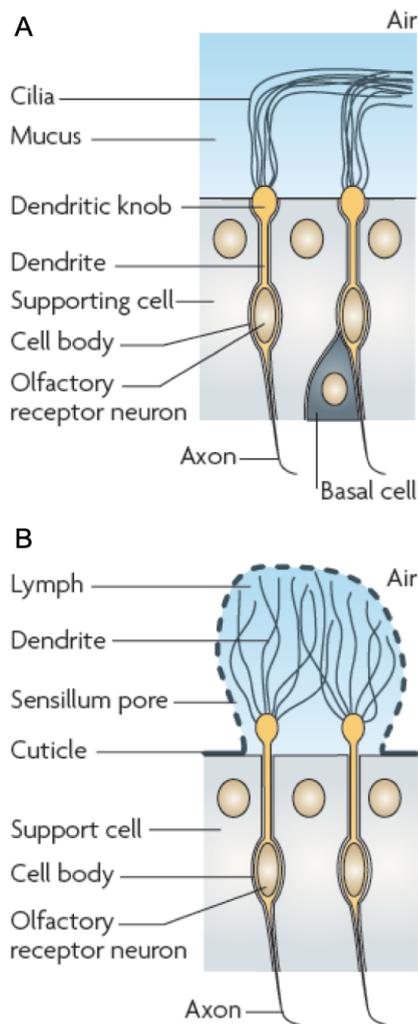


Figure 20 : Représentation schématique montrant les similarités entre l'organe sensoriel olfactif des mammifères et des insectes (tirée de (Kaupp 2010)). (A) Chez les mammifères, les cils des neurones sensoriels olfactifs baignent dans du mucus et leur axone projette vers le système nerveux central. L'épithélium olfactif contient également des cellules de soutien et des cellules basales. (B) Chez les insectes, les dendrites des neurones sensoriels olfactifs baignent également dans un milieu liquide, la lymphe, et les axones projettent vers le système nerveux central. On trouve également des cellules de soutien dans l'épithélium olfactif.

Il existe différents types de sensilles qui ne sont pas sensibles au même type de molécules odorantes. Par exemple, les sensilles trichoides sont sensibles aux phéromones tandis que les sensilles coeloconiques sont sensibles aux amines solubles dans l'eau. Les molécules odorantes pénètrent dans les sensilles et sont prises en charge, dans la lymphe sensillaire (l'équivalent du mucus chez les mammifères), par les protéines liant les odeurs (*Odorant Binding Protein, OBP*) synthétisées par les cellules de soutien (Fig.20). Les OBP transportent les molécules odorantes jusque sur les ORN à la surface desquels se trouvent les OR qui fonctionnent en dimère avec le co-récepteur Orco (T. Imai, Sakano, et Vosshall 2010; Hansson et Stensmyr 2011; W. Pan 2013). Cette famille d'OR d'insectes ne présente pas d'homologie avec la famille d'OR des vertébrés (Hansson et Stensmyr 2011).

Les OR des insectes possèdent également 7 domaines transmembranaires mais peuvent fonctionner comme des canaux ioniques. Ils ont une topologie inversée avec l'extrémité N-terminale intracellulaire et l'extrémité C-terminale extracellulaire. Ils sont toujours associés avec leur co-récepteur Orco qui leur est spécifique. Ces récepteurs traduisent le signal de façon mixte, c'est-à-dire soit métabotrope (couplé avec une protéine G) soit ionotropique. Il existe chez les insectes une autre catégorie d'OR uniquement ionotropiques, les IR (*Ionotropic Receptors, IR*). Les IR fonctionnent également en dimères, ce sont des récepteurs canaux et, de même que les OR, ils sont exprimés de façon monogénique par les ORN (T. Imai, Sakano, et Vosshall 2010; Yan et al. 2020) .

Chez la drosophile et d'autres insectes modèles bien étudiés, chaque ORN exprime seulement un OR et chaque sensille comprend un à quatre ORN d'un type spécifique. Le profil d'expression des OR chez les insectes et la distribution des sensilles dans les antennes et les palpes sont stéréotypés (W. Pan 2013).

L'organe sensoriel olfactif des mammifères et celui des insectes, bien que très différents en terme d'anatomie, obéissent cependant à des principes fondamentaux très similaires : les OSN et ORN ont leurs dendrites qui baignent dans un milieu liquide, le mucus et la lymphe respectivement, et leurs axones projettent dans le système nerveux central. Les deux épithéliums possèdent également des cellules de soutien (Fig.20). Point important sur lequel nous reviendrons dans les paragraphes suivants : ces animaux possèdent dans leur génome un grand nombre de gènes codant des OR (même si ce nombre est plus important chez les mammifères que chez les insectes), et chaque neurone sensoriel olfactif n'exprime qu'un seul de ces gènes.

II.1.2 Navigation des axones olfactifs vers le premier relai du système nerveux central

Chez les mammifères, les axones des OSN traversent la membrane basale de l'OE dès leur formation pour arriver dans la *lamina propria* où ils s'assemblent progressivement en petits faisceaux entourés par les protrusions des OEC (Helen B. Treloar et al. 2010). Ces petits faisceaux proximaux (~5µm d'épaisseur) vont ensuite fusionner en faisceaux plus épais en sortant de la LP et former les branches de diamètre plus conséquent (environ 20 µm) du nerf olfactif. Le nerf olfactif est alors composé de plusieurs grands faisceaux, chaque faisceau étant délimité par sa lame basale (Fig.19) (Miller et al. 2010; Helen B. Treloar et al. 2010).

Ces branches du nerf olfactif traversent la plaque cribreuse, un os poreux, avant de rejoindre le bulbe olfactif (*Olfactory Bulb, OB*) dans le télencéphale (cerveau antérieur). Les OSN pénètrent dans l'OB par la couche du nerf olfactif (*Olfactory Nerve Layer, ONL*), la partie la plus périphérique de l'OB, dans laquelle ils naviguent jusqu'à atteindre leurs glomérules cibles, des structures sphériques situées dans la couche glomérulaire (Fig.19 & 22) (Takeshi Imai et Sakano 2008; T. Imai, Sakano, et Vosshall 2010; Nedelec, Dubacq, et Trembleau 2005; Tufo et al. 2022) (Mombaerts et al. 1996).

Comme les axones des OSN sont principalement entourés, dans l'OB, d'autres axones d'OSN, d'OEC (Akins et Greer 2006) et de MEC, la croissance et le modèle de navigation de chaque OSN sont contrôlés par des signaux membranaires (présents à la surface des axones eux-même ou des OEC), ou sécrétés et présents dans la MEC. Beaucoup de molécules d'adhésion ou ayant des activités de guidage sont exprimées dans ce système, et leurs rôles respectifs ont fait l'objet de nombreuses études (pour revues voir (Nedelec, Dubacq, et Trembleau 2005; T. Imai, Sakano, et Vosshall 2010; Takeshi Imai et Sakano 2008; Helen B. Treloar et al. 2010).

Chez les insectes, la cible des OSN dans le système nerveux central est le lobe antennaire composé de structures sphéroïdes également appelées glomérules (Hansson et Stensmyr 2011). Les axones des ORN des antennes et des palpes fasciculent dans le nerf antennal (ou maxillaire). Ces nerfs projettent initialement dans la périphérie du lobe antennal avant de défasciculer et re-fasciculer de façon homotypique, conduisant à une innervation spécifique des glomérules par les axones des ORN (Fig.21) (Zhao et McBride 2020).

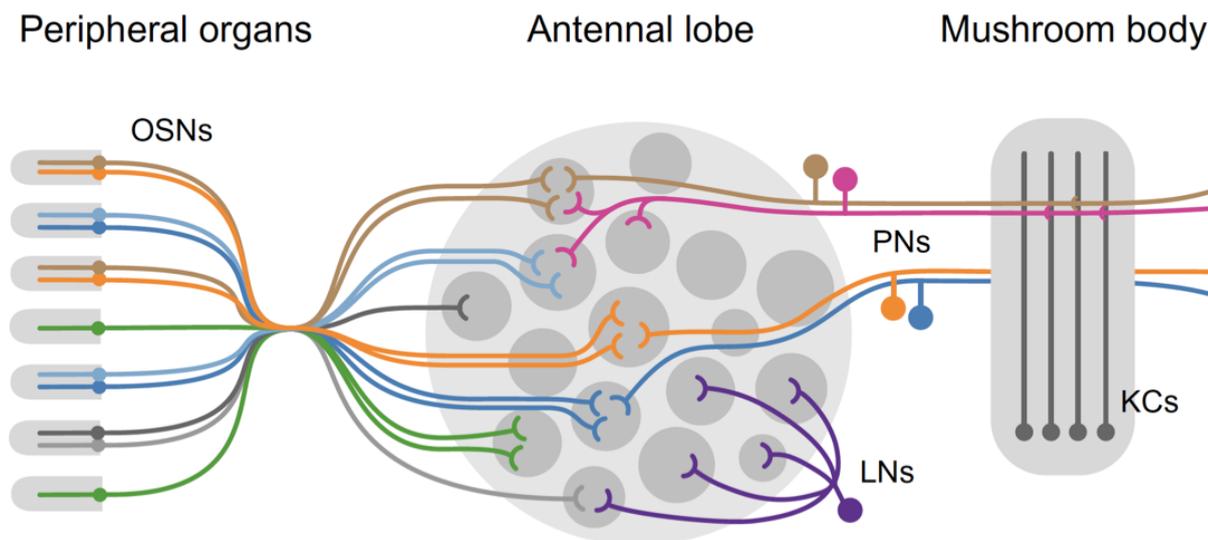


Figure 21 : Organisation du circuit olfactif des insectes (tirée de Zhao et McBride 2020). Les ORN situés dans les sensilles, projettent leur axone dans le lobe antennaire, au sein de glomérules. Tous les ORN exprimant le même récepteur olfactif innervent le même glomérule. Là, ils forment des synapses avec les neurones de projection et des interneurons locaux (LN). La plupart des neurones de projection sont connectés à seul glomérule (orange, bleu, marron), mais certains sont multi-glomérulaires (rose). Les neurones de projection transmettent alors l'information sensorielle au corps pédonculé (*Mushroom Boy*) via les cellules de Kenyon (*Kenyon Cell, KC*).

II.1.3 La règle un récepteur olfactif, un neurone sensoriel olfactif, un glomérule

Nous avons vu plus haut que, aussi bien chez les mammifères que chez les insectes, chaque neurone sensoriel olfactif n'exprime qu'un seul des gènes du répertoire caractéristique de l'espèce. Nous allons voir ici que cette règle "un récepteur olfactif, un neurone sensoriel olfactif" s'étend, en termes de projections sur le système nerveux central, aux glomérules.

Chez les mammifères, chaque OSN exprime seulement un OR. Les axones des OSN exprimant le même OR convergent dans trois glomérules par bulbe olfactif en moyenne, soit un ou deux glomérules par hémisbulbe (Richard, Taylor, et Greer 2010). Chaque glomérule reçoit les projections d'un seul type d'OSN, et traite donc les informations issues de l'activation d'un seul type d'OR (Fig.19 & 21) (Helen B. Treloar et al. 2002; Miller et al. 2010; Takeshi Imai et Sakano 2011; Tufo et al. 2022; Mombaerts et al. 1996) Il existe donc une carte topographique relativement précise de représentation des odeurs dans l'OB (Nedelec, Dubacq, et Trembleau 2005; Sakano 2010; Tufo et al. 2022; W. Pan 2013; Mombaerts et al. 1996).

La même règle s'applique chez les insectes où les axones des ORN exprimant le même OR vont converger vers les mêmes glomérules (Fig.21) (Hansson et Stensmyr 2011; Yan et al. 2020). Cette règle de convergence commune aux deux groupes d'animaux par laquelle tous les neurones exprimant le même OR ont leur axone qui converge sur un petit nombre de glomérules, est illustrée par la figure 22 ci-dessous.

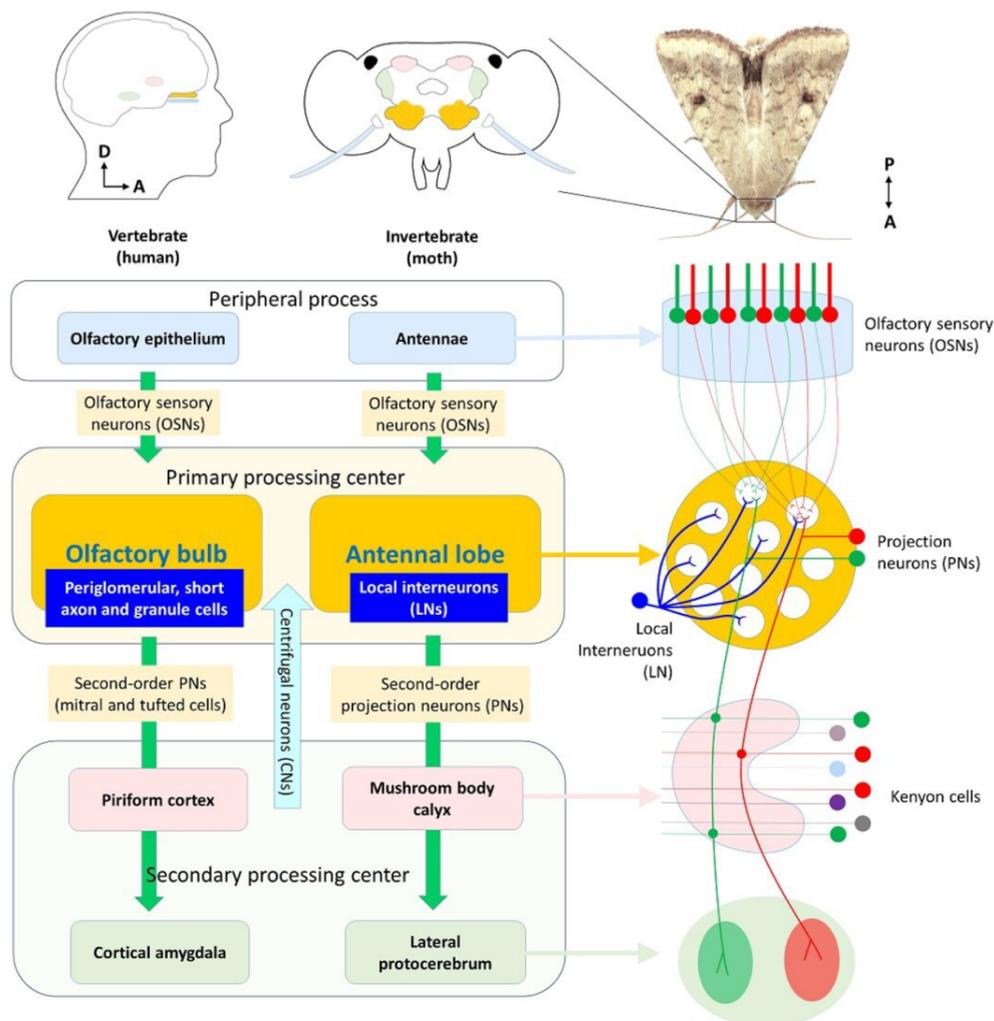


Figure 22 : Schéma montrant l'organisation similaire des projections sensorielles olfactives des vertébrés et des "invertébrés" (tirée de Brandslet, 2021). Chaque OSN de l'OE et de l'antenne exprime un OR spécifique (représenté par le code couleur) et tous les OSN exprimant le même OR innervent le même glomérule dans le système nerveux central ; le bulbe olfactif chez les mammifères et le lobe antennaire chez le papillon. Les neurones de second ordre de l'OB et du lobe antennaire (cellules mitrales et à panache chez les vertébrés, neurones de projection chez les insectes) projettent ensuite vers des régions corticales dont le cortex piriforme, ou les corps pédonculés (= *Mushroom Body*) respectivement puis vers l'amygdale chez les vertébrés et le *protocerebrum* latéral chez les "invertébrés".

II.1.4 Les neurones post-synaptiques du premier relai olfactif dans le système nerveux central

Les principales cibles des OSN dans l'OB des mammifères sont les cellules mitrales et cellules à panache. Ce sont les cibles excitatrices des axones des OSN dans la couche glomérulaire qui, en tant que neurones de projection, projettent à distance et transmettent donc les informations olfactives à des centres supérieurs. Ces cellules possèdent une dendrite apicale qui projette dans le neuropile glomérulaire et plusieurs dendrites latérales qui s'étendent dans la couche plexiforme externe (*External Plexiform Layer, EPL*) de l'OB. On trouve un autre type de neurones, les cellules à panache externes avec leurs corps cellulaires proches de la couche glomérulaire, qui possèdent un panache apical dans le neuropile glomérulaire et parfois des dendrites latérales qui projettent dans l'EPL (Lodovichi 2021; Tufo et al. 2022).

De même qu'un glomérule n'est innervé que par des axones sensoriels olfactifs d'une même identité en terme d'OR, la dendrite apicale d'une cellule mitrale ou à panache n'est en connexion qu'avec un seul glomérule. Les cellules mitrales et à panaches subissent au cours de leur développement un processus de maturation, durant lequel les cellules mitrales et à panache innervent au départ plusieurs glomérules avec leurs dendrites apicales, qui vont ensuite toutes se rétracter, sauf une, pour n'avoir plus qu'une seule projection glomérulaire. Un glomérule va alors définir une unité fonctionnelle appelée "colonne d'odeur". Chaque colonne d'odeur transporte les informations sensorielles issues d'un seul OR. Les cellules à panache projettent essentiellement sur le noyau olfactif antérieur et le tubercule olfactif, tandis que les cellules mitrales projettent plus largement sur différentes régions corticales (dont le cortex piriforme, le noyau olfactif antérieur, le tubercule olfactif et le cortex entorhinal latéral), ainsi que sur l'amygdale (Figure 22) (Takeshi Imai 2014; Lodovichi 2021).

Chez les insectes, les ORN innervent les neurones de projection dans les glomérules (W. Pan 2013). On retrouve des neurones de projection uniglomérulaires qui transfèrent l'information issue d'un seul glomérule et les neurones de projection multi-glomérulaires qui transfèrent l'information de plusieurs glomérules vers les corps pédonculés (= *Mushroom bodies* en anglais) puis vers le *protocerebrum* latéral (Fig.22) (Zhao et McBride 2020; Steele, Lanz, et Nagel 2023).

Dans l'OB mature des mammifères, on trouve également, et très majoritairement d'ailleurs, des interneurons GABAergiques (Tufo et al. 2022). Ce sont les cellules périglomérulaires situées dans la couche glomérulaire, sur lesquelles les axones des OSN établissent également des synapses, et également les cellules granulaires localisées dans la couche des cellules granulaires. Les dendrites des cellules granulaires contactent les dendrites latérales des cellules mitrales et à panache dans l'EPL formant ainsi des synapses dendro-dendritiques qui assurent une balance entre excitation et inhibition (Tufo et al. 2022). Des neurones inhibiteurs locaux (ou interneurons locaux) sont également présents dans le lobe antennaire des insectes pour moduler les signaux olfactifs (Fig. 22) (Zhao et McBride 2020).

Pour conclure cette partie, les études très détaillées qui ont été faites chez le rat et la souris d'une part (modèles mammifères), et chez les insectes d'autre part, ont montré de grands principes d'organisation similaire. Il est remarquable de noter qu'il existe un grand nombre de gènes codant pour les OR dans ces deux taxons, que les OSN/ORN expriment chacun un seul de ces OR et que tous ceux qui expriment le même OR vont converger vers les mêmes cibles glomérulaires dans le premier relai de l'information sensorielle olfactive. Même si les mécanismes à la base de ce processus diffèrent entre les mammifères et les insectes, on observe dans les deux groupes d'animaux la formation d'une carte glomérulaire dans le premier relai de projection des neurones sensoriels olfactifs (pour revue voir (T. Imai, Sakano, et Vosshall 2010)).

Bien que de nombreuses connaissances aient été acquises sur le développement et l'organisation fonctionnelle du système olfactif des vertébrés, avec le modèle souris, et des insectes, il demeure encore beaucoup d'inconnues sur les étapes précoces et les mécanismes permettant la mise en place de ce système stéréotypé. Chez les vertébrés, le modèle souris est mal adapté pour étudier les stades précoces de la mise en place du système olfactif ainsi que sa dynamique. C'est pourquoi j'ai étudié, dans le cadre de ma thèse, le développement du système olfactif du poisson-zèbre que je vais maintenant aborder dans une seconde partie.

II.2 Le développement du système olfactif du poisson-zèbre

Même si le milieu de vie des poissons-zèbres est très différent de celui de la majorité des mammifères et des insectes, leurs systèmes olfactifs sont très ressemblants.

Le système olfactif des poissons-zèbres adultes est composé de deux structures principales, l'OE périphérique, situé dans la cavité nasale, qui contient notamment les différentes populations d'OSN, et l'OB dans le télencéphale qui reçoit les projections axonales des OSN. Dans l'OE, l'extrémité des dendrites des OSN est en contact direct avec le milieu aquatique extérieur. Les odeurs sont détectées par les OSN au niveau de ces dendrites et le signal produit doit ensuite être acheminé par les axones vers les glomérules de l'OB. L'OB est composé de trois zones, l'ONL par laquelle les axones pénètrent l'OB, la couche glomérulaire où se trouve les glomérules, là où les axones des OSN établissent des synapses avec les dendrites des cellules mitrales et à panache, des cellules périglomérulaires et enfin la couche cellulaire interne qui contient les corps cellulaires des cellules mitrales et à panache et les dendrites des cellules granulaires. Chez le poisson-zèbre, la règle un OSN = un OR est également vérifiée et tous les OSN exprimant le même OR projettent leurs axones dans le même glomérule (Fig.23).

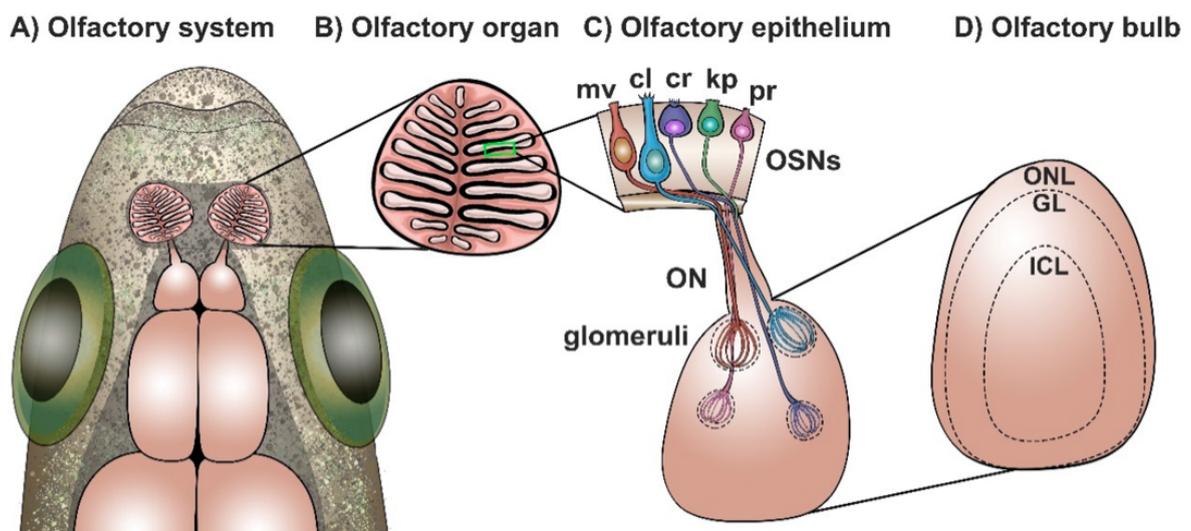


Figure 23 : Schéma représentant le système olfactif chez le poisson-zèbre adulte (tirée de (Calvo-Ochoa et Byrd-Jacobs 2019)). (A) Localisation du système olfactif du poisson-zèbre. (B) L'organe olfactif est organisé en lamelles. (C) L'OE est composé de différents types d'OSN : à microvillosité (mv), ciliés (cl), à crypte (cr), kappés (kp), en poire (pr); dont les axones fasciculent en sortant de l'OE, pour former l'ON et innervent l'OB. (D) L'OB est formé de trois compartiments, l'ONL, la couche glomérulaire (GL) et la couche cellulaire interne (ICL).

L'établissement de ce système très stéréotypé nécessite la participation de différents facteurs à différentes étapes, de la morphogenèse de la placode olfactive (*Olfactory Placode, OP*), le

tissu embryonnaire qui préfigure le futur OE, jusqu'à la maturation d'un système fonctionnel. Dans cette partie, je vais détailler trois grandes étapes de la mise en place du système olfactif chez le poisson-zèbre : (1) la morphogenèse de l'OP, (2) le cheminement des axones olfactifs vers l'OB et (3) l'innervation de l'OB.

II.2.1 Morphogenèse de la placode olfactive

Chez les poissons, l'étude des cartes des destins cellulaires a permis de localiser les précurseurs de plusieurs tissus très précocement au cours du développement. Kozłowski et ses collègues ont par exemple étudié ces destinées cellulaires en injectant des embryons au stade une cellule avec du dextran couplé avec de la fluorescéine cagée. Ils ont illuminé avec un faisceau ultraviolet différents groupes de cellules à un stade donné pour activer le fluorophore et suivre au cours du temps le devenir de ces groupes de cellules devenues fluorescentes. Ils ont ainsi découvert que les cellules localisées ventro-latéralement mais proche du pôle animal ou directement au pôle animal au moment de l'illumination (au stade 50% épibolie/*shield*) faisaient ensuite partie de l'OP et du télencéphale adjacent à 24 hpf (Kozłowski et al. 1997).

Le terme placode est classiquement défini comme un épaissement de l'ectoderme des embryons qui donne naissance à différentes structures du système nerveux périphérique. La paire de placodes la plus rostrale a été décrite comme donnant naissance aux organes sensoriels olfactifs chez les mammifères, les oiseaux, les amphibiens et les poissons (Hansen et Zeiske 1993).

Le développement de l'OP peut être lui-même divisé en 4 étapes : (1) spécification du domaine de l'OP dans l'ectoderme neural, (2) mouvements cellulaires donnant lieu à la condensation/coalescence des cellules formant l'OP, (3) différenciation/neurogenèse des différents sous-types de neurones dans l'OP et (4) morphogenèse tardive de l'OP. Je vais maintenant aborder en détail ces quatre étapes de développement.

II.2.1.a Origine/spécification des placodes sensorielles

Chez les vertébrés, un certain nombre d'organes et de neurones sensoriels proviennent de placodes crâniennes qui partagent des caractéristiques communes. Il est généralement admis que l'ensemble de l'organe sensoriel olfactif des poissons-zèbres se développe à partir des OP, mais une contribution des NCC a aussi été proposée (Saxena, Peng, et Bronner 2013), qui fait débat encore aujourd'hui (Raphaël Aguillon et al. 2018). Les cellules des OP sont localisées de part et d'autre du cerveau antérieur, sous l'épiderme (Hansen et Zeiske 1993).

Les cellules précurseurs de l'OP proviennent de la région pré-placodale (*Pre Placodal Region, PPR*) appelée également le primordium pan-placodal. C'est un domaine en forme de fer à cheval qui entoure la partie antérieure de la plaque neurale et qui est composé des précurseurs des différents placodes contenus dans des régions qui se chevauchent (S. Sato et al. 2010; Raphaël Aguillon et al. 2018; R. Aguillon, Blader, et Batut 2016; Marie Anne Breau et Schneider-Maunoury 2014). La partie antérieure de la PPR qui deviendra l'OP est caractérisée par l'expression des familles de facteurs de transcription *six*, *eya*, *dlx* et *irx*. Le gène *distal-less 3 (dlx3b)* est le premier marqueur de l'OP à être exprimé dans la PPR à 8 hpf. Au stade de 10 hpf, c'est au tour de *six4b*, d'*eyal* et d'*irx* d'être exprimés (R. Aguillon, Blader, et Batut 2016). Chez le poisson-zèbre, *six4b* et *dlx3b* (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000; K.E. Whitlock 2008; Harden et al. 2012; Torres-Paz et Whitlock 2014; R. Aguillon, Blader, et Batut 2016; Torres-Paz, Tine, et Whitlock 2021) sont exprimés dans la PPR et persistent pendant la formation de plusieurs placodes dont l'OP (Harden et al. 2012). La PPR est spécifiée grâce à différentes voies de signalisation, notamment les signalisations induites par FGF, BMP et Wnt (Schlosser 2006; Streit 2004). Plus récemment, il a été montré que *dlx3b/4b* participent à cette spécification en diminuant l'activité de BMP (Esterberg et Fritz 2009).

Le domaine de l'OP se développe de manière coordonnée avec les NCC céphaliques, localisées postérieurement à la PPR (Fig.24) (Kozlowski et al. 1997; K.E Whitlock, Wolf, et Boyce 2003; K.E. Whitlock 2008; Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000; Torres-Paz et Whitlock 2014). Les NCC céphaliques sont multipotentes et quittent la partie dorsale du tube neural pour migrer dans l'embryon et se différencier en une grande diversité de types cellulaires incluant les neurones et les cellules gliales du système nerveux périphérique, et une partie des os et des cartilages de la face (Harden et al. 2012).

Initialement, les précurseurs des placodes crâniennes sont situés dans des régions de la PPR qui se chevauchent. Le processus de coalescence permet ensuite aux cellules des placodes de se rassembler en structures placodales compactes et bien séparées les unes des autres (Marie Anne Breau et Schneider-Maunoury 2014). Dans mon introduction je me concentrerai uniquement sur la coalescence de l'OP.

II.2.1.b Mouvements de coalescence des placodes olfactives

- ***Mise en évidence des mouvements de coalescence***

L'analyse du profil d'expression de plusieurs marqueurs par hybridation *in situ*, ainsi que l'établissement de cartes des destins cellulaires ont suggéré l'existence de remaniements/mouvements cellulaires au sein du domaine de l'OP, donnant lieu aux placodes compactes et sphériques de part et d'autre du cerveau antérieur.

Durant les stades de gastrulation (à partir de 8 hpf, (Kimmel et al. 1995)), les cellules qui deviendront la future OP expriment le facteur de transcription *dlx3* (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000; Harden et al. 2012; Torres-Paz et Whitlock 2014; Torres-Paz, Tine, et Whitlock 2021; R. Aguillon, Blader, et Batut 2016). A 12 hpf, un groupe de cellules *dlx3* positives forme une bande continue d'environ quatre cellules de large qui "entoure" latéralement la partie antérieure de la plaque neurale. Dans ce groupe de cellules, le marquage de *dlx3b* diminue en intensité lorsque l'on se rapproche du centre de la plaque neurale (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000; Torres-Paz et Whitlock 2014; Torres-Paz, Tine, et Whitlock 2021). A 14-16 hpf, les cellules *dlx3* positives de l'OP commencent à s'agréger pour former à 24 hpf un agrégat ovale de cellules selon l'axe antéro-postérieur (AP) et circulaire selon l'axe dorso-ventral (DV), on parle de coalescence de l'OP (Fig.24) (Hansen et Zeiske 1993; Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000). Les cellules qui expriment moins *dlx3* vers le centre de la plaque neurale deviennent télencéphaliques (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000; Torres-Paz et Whitlock 2014; Torres-Paz, Tine, et Whitlock 2021). C'est donc une large région du domaine d'expression de *dlx3* qui donne naissance aux OE et aux OB (K.E. Whitlock 2008).

L'équipe de K. Whitlock a caractérisé plus en détail cette coalescence le long de la plaque neurale et le devenir des cellules qui expriment *dlx3*. Dans le but d'établir une carte des destins cellulaires, ils ont marqué des cellules individuelles faisant partie de la région antérieure de la plaque neurale à 12 hpf et ont observé à 50 hpf que ces cellules donnent naissance au système olfactif, incluant les deux OP condensées de part et d'autre du télencéphale (Fig.24). Ils ont également observé qu'en fonction de leur position le long de la plaque neurale, les cellules participent à différentes parties de l'OP. Les cellules antérieures de la plaque neurale deviendront les cellules antérieures de l'OP (Fig.24, cellules oranges) alors que les cellules postérieures de la plaque neurale se positionneront à proximité de l'œil, dans la partie latérale et dorsale de l'OP (Fig.24, cellules rouges et vertes). Les cellules

exprimant plus faiblement *dlx3* donnent naissance au télencéphale qui comprend l'OB (Fig.24, cellules jaune) (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000; Torres-Paz et Whitlock 2014; Torres-Paz, Tine, et Whitlock 2021). Leurs résultats suggèrent donc que dès 12 hpf, les cellules formant l'OP sont prédestinées (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000).

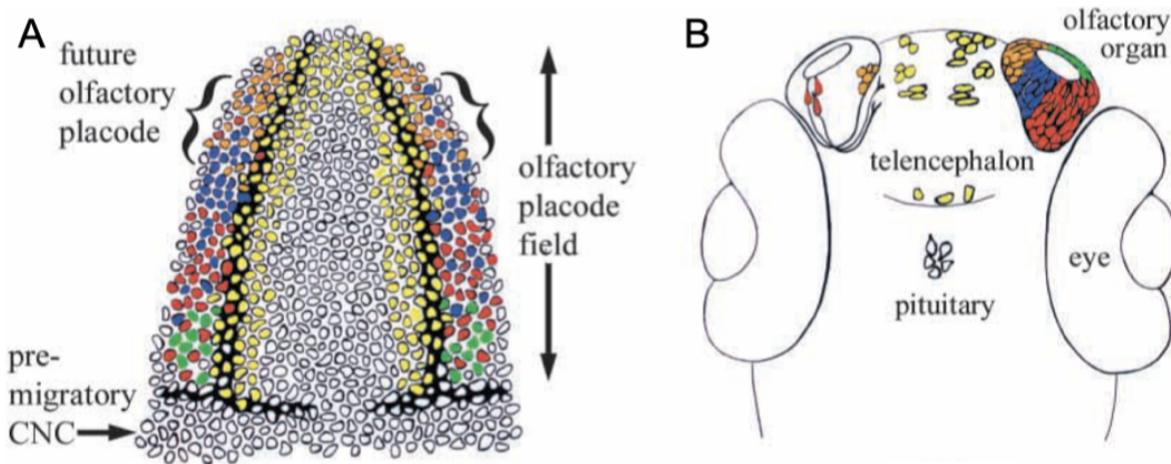


Figure 24 : Représentation schématique du système olfactif avant puis après la coalescence de la placode (tirée de Whitlock et Westerfield 2000). (A) Vue dorsale schématique d'un embryon à 12 hpf. Les bords noirs délimitent le groupe de cellules qui donnera naissance à l'OP, celui qui donnera naissance au télencéphale (jaune) et les NCC pré-migratrices (postérieures). Le code couleur des cellules correspond à leur devenir à 50 hpf. (B) Vue ventrale schématique de la tête d'un embryon à 50 hpf. L'OP de droite suit le code couleur de la figure A, l'OP de gauche schématise les axones des OSN qui migrent de l'OP vers l'OB dans le télencéphale.

Ces analyses suggèrent que des mouvements cellulaires remanient les domaines contenant les précurseurs des OP, initialement allongés de part et d'autre du cerveau antérieur, pour donner les tissus compacts et sphériques des OP. Ces mouvements de coalescence ont été visualisés une première fois par imagerie *live* en utilisant une lignée transgénique *tg(six4b:mCherry)*, permettant de suivre les cellules précurseurs de l'OP et de mettre en évidence notamment leur mouvement antéro-postérieur (Harden et al. 2012). D'autres expériences d'imagerie *live* réalisées sur la lignée transgénique *tg(ngn1:gfp)* (Blader, Plessy, et Strähle 2003), permettant de visualiser les premiers neurones à se différencier dans l'OP (Madelaine, Garric, et Blader 2011), ont montré que des cellules *gfp* positives réparties le long de la plaque neurale antérieure à 14-16 hpf s'agrègent le long de l'axe antéro-postérieur (Fig.24 & Fig.25) tout en s'épaississant médio-latéralement et dorso-ventralement (M. A. Breau et al. 2017; Raphaël Aguillon et al. 2019). Des analyses de *tracking* (suivi des trajectoires) de cellules

individuelles sur ces films ont révélé que les cellules de l'OP se déplacent d'abord de manière antéro-postérieure et parallèle à la surface du télencéphale pour converger vers le centre de la future placode (mouvements de convergence), puis latéralement pour s'éloigner de la surface du cerveau (mouvements latéraux). Les cellules centrales présentent un mouvement majoritairement latéral. La phase de mouvement latéral de ces neurones s'accompagne d'une extension rétrograde de leurs axones qui restent accrochés à la surface du cerveau (Fig.25) (M. A. Breau et al. 2017). À 22 hpf, la coalescence de l'OP est terminée (M. A. Breau et al. 2017).

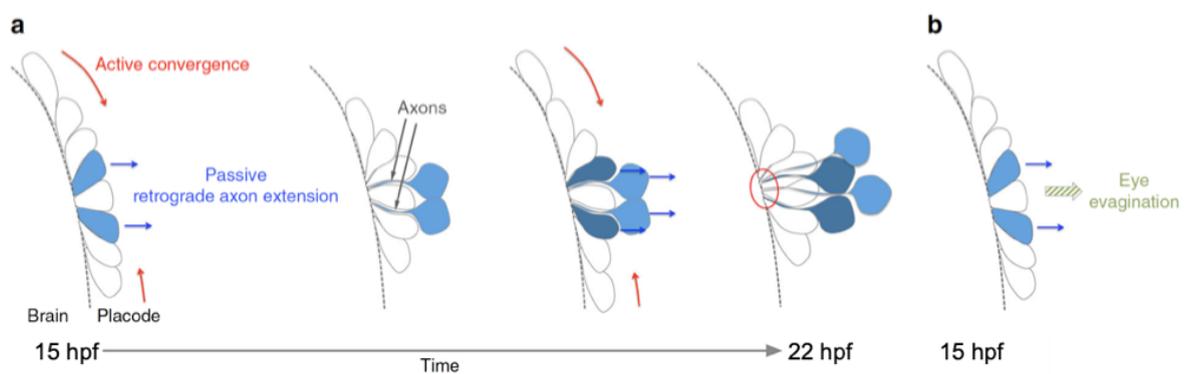


Figure 25 : Le déplacement antéro-postérieur (mouvement de convergence) des cellules de l'OP se fait de manière active tandis que le déplacement latéral est passif (adaptée de Breau et al. 2017). (a) Les cellules aux extrémités antéro-postérieures de l'OP convergent activement vers le centre de la future OP (flèches rouge, convergence active). Les cellules centrales migrent latéralement de façon passive tandis que leur protrusion axonale reste accrochée à la surface du cerveau, menant à un processus d'extension rétrograde de leurs axones (cellules bleues et flèches bleues). (b) La morphogenèse de l'œil exerce des forces de traction qui provoquent le mouvement latéral des cellules de l'OP (flèche verte) (Monnot et al. 2022).

Durant la coalescence de l'OP, on détecte peu de cellules apoptotiques ou en division dans le domaine placodal. Lorsque l'on perturbe individuellement ces processus, cela n'impacte pas la forme finale de l'OP. Ceci montre que ni l'apoptose (M. A. Breau et al. 2017) ni la prolifération cellulaire jouent un rôle dans la coalescence de l'OP (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000; K.E. Whitlock 2008; M. A. Breau et al. 2017), qui est donc principalement médiée par les mouvements cellulaires décrits plus haut.

- ***Mouvements cellulaires ayant lieu dans les tissus adjacents à la placode olfactive***

La coalescence de l'OP s'accompagne de mouvements cellulaires dans les autres tissus ou populations de cellules présents dans la tête des embryons de poisson-zèbre, notamment le cerveau antérieur, l'œil et les NCC céphaliques. Ces mouvements sont susceptibles d'influencer la coalescence de l'OP (et inversement).

Pour mieux comprendre les mouvements de morphogenèse précoce menant au développement de l'OP et de l'OB, Torres-Paz et al. 2014 ont filmé des embryons transgéniques *tg(β-actin:GAP43-GFP)* permettant de visualiser les membranes de toutes les cellules, injectés avec de l'ARNm H2B:RFP afin de marquer de manière aléatoire et mosaïque le noyau de certaines cellules. Ils ont ensuite analysé les mouvements de différentes cellules en fonction de leur identité/position finale. Les films ont été réalisés de 11 à 14 hpf, une période qui précède la coalescence de l'OP. Ils ont observé un mouvement directionnel antérieur coordonné des précurseurs de l'OP et du télencéphale, ce qui soutient l'idée d'un développement coordonné des deux tissus (Torres-Paz et Whitlock 2014). A des stades plus tardifs, le suivi de cellules du télencéphale exprimant le transgène *tg(ngn1:gfp)* a montré qu'elles continuent ce mouvement directionnel antérieur pendant la coalescence de l'OP, alors que les cellules de l'OP montrent un profil de mouvements différent (convergence et mouvements latéraux) (M. A. Breau et al. 2017; Monnot et al. 2022).

L'OP est également adjacente à l'œil, localisé ventro-postérieurement, qui subit une réorganisation morphologique importante pendant la coalescence de l'OP. En effet, les précurseurs de l'œil vont d'abord s'évagner pour former la vésicule optique, qui s'invagine ensuite pour former la coupe optique entourant le cristallin. Les mouvements cellulaires associés à cette réorganisation ont une forte composante médio-latérale et ont lieu en même temps que le déplacement latéral des cellules de l'OP (Kwan et al. 2012; Martinez-Morales, Cavodeassi, et Bovolenta 2017; Cavodeassi 2018; Monnot et al. 2022). Je présenterai plus loin les expériences qui ont montré que les mouvements de morphogenèse de l'œil influencent la coalescence de l'OP et notamment la phase des mouvements latéraux (Monnot et al. 2022).

Postérieurement à la PPR, on trouve les NCC (Fig.24) (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000; Torres-Paz et Whitlock 2014), cette population de cellules émanant du tube neural et

migrant extensivement dans l'embryon pour donner divers types cellulaires. Grâce à la lignée *tg(sox10:EGFP)*, la migration des NCC peut être suivie dans des expériences d'imagerie *live*. Des films réalisés avec des embryons double transgéniques *tg(sox10:EGFP); tg(six4b:mCherry)*, qui permettent de suivre à la fois les NCC et les cellules de l'OP, ont montré que les NCC céphaliques migrent antérieurement à partir de 15 hpf pour venir entourer l'OP à 19 hpf, pendant sa coalescence. Dans ces films, on n'observe pas de mélange des deux types de cellules durant la migration (Harden et al. 2012). D'autres films réalisés de 16 à 19 hpf sur des embryons *tg(β -actin:GAP43-GFP); tg(sox10:RFP)* ont confirmé que la coalescence de l'OP est concomitante des mouvements de migration des NCC (Harden et al. 2012; Torres-Paz et Whitlock 2014). Les NCC semblent également réguler en partie la coalescence de l'OP, car chez les mutants *foxd3*, dans lesquels le développement des NCC est affecté, il y a une légère augmentation de la dimension ML de l'OP (Monnot et al. 2022).

II.2.1.c Mécanismes régulant la coalescence des placodes olfactives

On sait que la formation de l'OP implique deux types de mouvements : la convergence des cellules provenant des extrémités antéro-postérieures du domaine placodal, et le mouvement latéral des cellules centrales (Fig.25). Quels sont les mécanismes qui régulent ces mouvements cellulaires ?

Des études réalisées dans mon laboratoire d'accueil ont cherché à déterminer si les mouvements de convergence et les mouvements latéraux des cellules de l'OP représentent des processus de migration cellulaire active, c'est-à-dire impliquant le cytosquelette (actine, myosine II et/ou microtubules) interne à ces cellules. La perturbation pharmacologique de la contractilité de l'actomyosine, la machinerie moléculaire qui produit les forces mécaniques au sein des cellules et des tissus, entraîne des défauts de coalescence de l'OP qui reste allongée le long de l'axe antéro-postérieur, et est plus fine médio-latéralement, ce qui suggère que la convergence et/ou les mouvements latéraux sont impactés. Pour comprendre si le rôle de l'actomyosine dans les mouvements de convergence et les mouvements latéraux est cellulaire autonome, des expériences de transplantations ont été réalisées, permettant d'exprimer de manière mosaïque dans les OP un dominant négatif (DN) de la Rho-GTPase RhoA, un régulateur en amont de la myosine II (DN-RhoA). Cette expression mosaïque entraîne un positionnement ectopique antérieur et postérieur de certaines cellules DN-RhoA-positives, ce qui montre un rôle au moins partiel et cellulaire autonome de RhoA

dans la convergence antéro-postérieure. Par contraste, la distribution des cellules exprimant DN-RhoA n'est pas modifiée le long de l'axe médiolatéral, ces cellules semblent effectuer normalement le mouvement latéral. Des observations similaires ont été réalisées avec l'expression d'un dominant négatif de Rac1, une autre Rho-GTPase régulant la polymérisation de l'actine. Ces résultats sont renforcés par des expériences d'imagerie *live* qui permettent de détecter des accumulations de myosine II et d'actine dans le soma des cellules, qui coïncident avec les mouvements de convergence, mais qui ne sont pas retrouvées lors des déplacements latéraux. Ces données suggèrent que la convergence antéro-postérieure des cellules de l'OP se fait de manière active sous l'influence de la contraction intrinsèque de l'actomyosine, tandis que les déplacements latéraux sont passifs, médiés par des forces extrinsèques (Fig.25) (M. A. Breau et al. 2017).

Deux études ont montré que la convergence active des cellules de l'OP se fait sous le contrôle de la voie chimiotactique *cxcl12a/cxcr4b* (Nobuhiko Miyasaka, Knaut, et Yoshihara 2007; Raphaël Aguilon et al. 2019).

Dans une première étude, Miyasaka et ses collègues ont commencé par analyser par hybridation *in situ* l'expression de la chimiokine *cxcl12a* et de son récepteur *cxcr4b*. *cxcr4b* est exprimé dans des cellules situées sur les bordures latérales de la plaque neurale antérieure, qui correspondent aux cellules qui forment l'OP, puis dans l'OP à 20 hpf. *cxcl12a* est exprimé au niveau du tube neural antérieur (localisé entre les deux bandes exprimant *cxcr4b*) à partir de 14 hpf, puis son expression se restreint au télencéphale antérieur. Le domaine d'expression de *cxcr4b* semble se rapprocher des sources de *cxcl12a*. Ces observations suggèrent que le couple *cxcl12a/cxcr4b* joue un rôle dans l'assemblage de l'OP (Nobuhiko Miyasaka, Knaut, et Yoshihara 2007). Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont utilisé le mutant *odysseus* (*ody*), qui exprime une version tronquée, non fonctionnelle, de *cxcr4b*. Les embryons homozygotes mutants présentent des défauts de morphogenèse de l'OP avec notamment des cellules ectopiques ventro-médiales. Le positionnement des cellules est altéré sans que la prolifération ne soit affectée (Nobuhiko Miyasaka, Knaut, et Yoshihara 2007). Le même résultat est observé avec des morpholinos ciblant *cxcr4b* ou *cxcl12a*, et un mutant *cxcl12a* (Nobuhiko Miyasaka, Knaut, et Yoshihara 2007). De plus, en induisant par choc thermique une surexpression globale ou locale de *cxcl12a*, les auteurs observent des défauts d'assemblage de l'OP avec un phénotype qui ressemble à celui des morphants *cxcr4b* ou des mutants *ody*. Dans le cas d'une surexpression locale de *cxcl12a* (obtenue par injection d'ADN), des cellules de l'OP se retrouvent proches des sources ectopiques de *cxcl12a*,

indiquant un effet chimioattractant de *cxcl12a* (Nobuhiko Miyasaka, Knaut, et Yoshihara 2007). Ces expériences montrent que la signalisation exercée par *cxcl12a/cxcr4b* est nécessaire pour la convergence active de l'OP le long de l'axe antéro-postérieur (Fig.26) (Nobuhiko Miyasaka, Knaut, et Yoshihara 2007; Raphaël Aguillon et al. 2019).

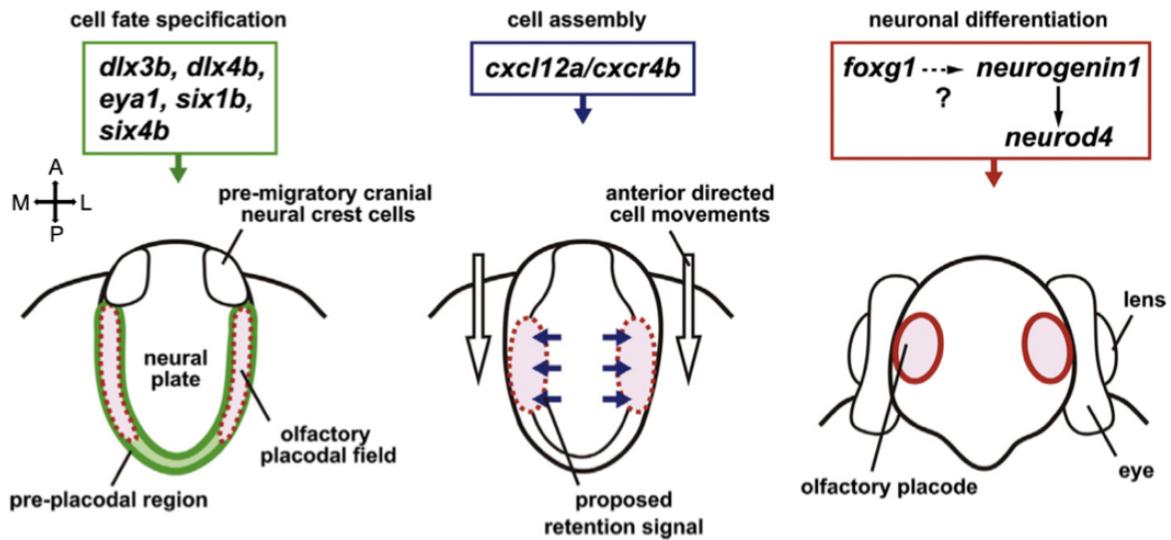


Figure 26 : Schéma récapitulatif du développement de la placode olfactive (OP) (tirée de Miyasaka et al. 2013). A gauche, les domaines placodaux se développent dans la partie antérieure de la plaque neurale, la PPR (vert). Leur spécification est permise par l'expression de plusieurs facteurs de transcriptions (cadre vert). Au milieu, la coalescence des cellules précurseurs de l'OP se fait sous le contrôle du couple *Cxcl12a/Cxcr4b* entre autres. Les flèches représentent des mouvements antérieurs, mais on sait aujourd'hui que les mouvements impliqués sont plus complexes (convergence et mouvements latéraux). A droite, la neurogenèse des neurones olfactifs est régulée par différents facteurs de transcription comme *foxg1*, et *neurog1/neurod4* qui agissent de manière redondante.

Dans une étude récente, Aguillon et ses collègues ont analysé plus précisément le rôle de la voie *cxcl12a/cxcr4b* dans les mouvements de coalescence, et la régulation de cette voie par le facteur de transcription *neurogenin 1* (*neurog1*). Je résume ici leurs principaux résultats (Raphaël Aguillon et al. 2019). Des expériences d'imagerie *live* montrent que chez les mutants *neurog1*, il y a un retard dans la convergence antéro-postérieure au cours de la coalescence de l'OP (alors que le mouvement latéral ne semble pas ou peu diminué, d'après les trajectoires présentées). La migration des cellules de l'OP postérieures et centrales est peu affectée tandis que celle des cellules antérieures est très modifiée. Ce phénotype récapitule celui des mutants *cxcl12a* et *cxcr4b*, suggérant un possible lien entre *neurog1* et la voie

cxcl12a/cxcr4b. Chez les mutants *neurog1*, on observe que l'expression de *cxcr4b* (mais pas celle de *cxcl12a*) est réduite à 12 et 15 hpf puis reprend à 18 hpf, lorsque *neurod4* (qui sera décrit plus tard dans le texte) s'exprime (Madelaine, Garric, et Blader 2011; Raphaël Aguillon et al. 2019). Lorsque l'on réintroduit *cxcr4b* par une expression transgénique chez les mutants *neurog1*, on restaure la migration correcte des cellules antérieures. Enfin, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et d'analyse du promoteur de *cxcr4b* par transgénèse/mutagenèse ont confirmé que *cxcr4b* est régulé par *neurog1* et en est une cible directe (Raphaël Aguillon et al. 2019). Ces résultats montrent que *neurog1* contrôle la coalescence de l'OP, et notamment la convergence active, en régulant l'expression de *cxcr4b* (Fig.26) (Raphaël Aguillon et al. 2019).

Les cellules de l'OP se déplacent ensuite latéralement tandis que leurs protrusions axonales restent attachées à la surface du cerveau (extension rétrograde des axones). Comme décrit plus haut, ce déplacement latéral semble se faire de manière passive, sous l'effet de forces mécaniques extrinsèques qui pourraient pousser ou tirer les cellules latéralement (Fig.25) (M. A. Breau et al. 2017). Quelle est l'origine de ces forces extrinsèques ?

Les forces qui permettent le déplacement latéral passif des cellules de l'OP pourraient par exemple provenir de la compression des cellules qui convergent activement le long de l'axe antéro-postérieur, ou d'une traction latérale opérée par un tissu adjacent (M. A. Breau et al. 2017). Afin de tester l'hypothèse de la compression, mon laboratoire d'accueil a tout d'abord réalisé des expériences d'ablation des cellules les plus antérieures et postérieures de l'OP. Ces ablations n'ont pas perturbé les mouvements latéraux des cellules restées au centre, réfutant l'hypothèse de forces issues d'une compression par des cellules placodales en cours de convergence. Un candidat pouvant exercer une force de traction latérale sur ces cellules est le tissu de l'œil, qui se forme pendant la coalescence de l'OP, à proximité immédiate. L'analyse quantitative des mouvements cellulaires latéraux de l'œil et de l'OP montrent qu'ils sont fortement corrélés. Le déplacement latéral des cellules de l'OP est affecté chez des mutants sans yeux (mutants *rx3*), ce qui suggère que la formation de l'œil est nécessaire pour la coalescence de l'OP, et notamment pour les mouvements latéraux. Par ablation laser, Monnot et ses collègues ont pu estimer la tension à laquelle les cellules de l'OP sont soumises au niveau du bord latéral de la placode, et ont observé que chez les mutants sans yeux, elle était plus faible que chez les contrôles. L'ensemble de ces résultats suggère que l'œil exerce des forces latérales de traction qui provoquent le mouvement latéral des cellules de l'OP et

l'extension rétrograde de leurs axones (Fig.25) (Monnot et al. 2022). Enfin, des expériences de digestion enzymatique de la MEC localisée entre l'œil et l'OP indiquent un rôle potentiel de cette matrice dans la propagation des forces de l'œil vers les cellules de l'OP (Monnot et al. 2022).

Ainsi, selon le modèle actuel, la voie *cxcl12a/cxcr4b* régule la convergence active de l'OP dans la direction antéro-postérieure, probablement en stimulant la contractilité de l'actomyosine, et les forces mécaniques induites par la morphogenèse de l'œil régulent le mouvement latéral passif (Nobuhiko Miyasaka, Knaut, et Yoshihara 2007; M. A. Breau et al. 2017; Raphaël Aguillon et al. 2019; Monnot et al. 2022) (Miyasaka 2007, Breau 2017, Aguillon, 2020; Monnot 2022). Comment la voie *cxcl12a/cxcr4b* et les forces mécaniques exercées par l'œil coopèrent pour contrôler la morphogenèse de l'OP reste à découvrir.

II.2.1.d Neurogenèse des OSN

La neurogenèse est un mécanisme essentiel dans l'établissement du système nerveux, qui permet la production des bons neurones au bon endroit et au bon moment, et en nombre approprié. Comment s'effectue la neurogenèse dans l'OP et comment est-elle couplée aux mouvements de morphogenèse/coalescence ?

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la neurogenèse de l'OP. C'est le cas de *foxg1*, un facteur de transcription de la famille "forkhead", qui est fortement exprimé à 16 hpf dans le télencéphale, à proximité des futures OP, et plus faiblement dans l'OP (Duggan et al. 2008) et de *neurog1*, exprimé dans la partie antérieure de la plaque neurale qui fonctionne de manière redondante avec *neurod4* (Park et al. 2003; Madelaine, Garric, et Blader 2011). L'étude de morphants *foxg1* montre qu'il y a moins d'OSN ciliés et d'OSN à microvillosité (Duggan et al. 2008), ce qui indique que ce facteur est nécessaire pour la neurogenèse des OSN (Fig.26).

Les neurones exprimant *neurog1*, visualisés grâce à la lignée *tg(ngn1: GFP)*, expriment HuC/D, un marqueur de neurones post-mitotiques (Madelaine, Garric, et Blader 2011; M. A. Breau et al. 2017) et sont également marqués par l'anticorps *zns-2*, reconnaissant les neurones pionniers qui sont considérés comme les premiers à allonger leur axone dans le cerveau (Madelaine, Garric, et Blader 2011). Les neurones exprimant *tg(ngn1: GFP)* sont donc les premiers neurones à se différencier dans l'OP (*Early Olfactory Neurons, EON*) (Madelaine, Garric, et Blader 2011). *neurod4* est également exprimé dans l'OP et le télencéphale aux

stades précoces de morphogenèse de l'OP. Chez les mutants *neurog1*, on ne voit pas d'expression de *neurod4* jusqu'à 19 hpf. Chez les mutants *neurog1* et les morphants *neurod4* il y a une diminution du nombre d'EON. L'injection d'un morpholino dirigé contre *neurod4* chez des embryons mutants *neurog1* provoque une réduction encore plus importante du nombre d'EON, et un sauvetage partiel de *neurod4* permet de restaurer le nombre d'EON. En utilisant le BrdU pour suivre les divisions cellulaires, les auteurs observent que cette diminution est causée par un arrêt du dernier cycle cellulaire des EON (Madelaine, Garric, et Blader 2011). Ces expériences montrent que la neurogenèse des EON est contrôlée par l'action redondante de *neurog1* et *neurod4* (Fig.26). De plus, chez les double morphants/mutants, il n'y a pas d'expression d'*omp* (*Olfactory Marker Protein*) avant 48 hpf ce qui montre que la formation des OSN matures dépend également de la fonction redondante de *neurog1* et de *neurod4* (Fig.26) (Madelaine, Garric, et Blader 2011). Le facteur de transcription *neurog1* semble donc contrôler à la fois la neurogenèse et la coalescence de l'OP, ce qui en fait un élément clef dans le couplage entre les deux processus.

- ***Développement coordonné de la placode et du bulbe olfactif***

Les facteurs de transcription *dlx3b/4b* jouent un rôle dans la différenciation des précurseurs de l'OP et de l'OB, assurant leur développement coordonné. En effet, l'utilisation de morpholinos ciblant *dlx3b* et *dlx4b* dans des embryons double transgéniques *tg(six4b:mCherry); tg(sox3:GFP)* permettant de visualiser les précurseurs de l'OP et de l'OB respectivement, montre qu'à 24 hpf la taille de l'OP est réduite et qu'il y a une expression ectopique temporaire de *tg(sox3:GFP)* dans la région de l'OB/télocéphale. Chez les morphants, on observe aussi que le télocéphale est plus grand et qu'il y a plus d'interneurones dans l'OB. Ces résultats suggèrent que la perte de fonction de *dlx3b/4b* induit un changement de spécification des cellules qui normalement se différencient en cellules de l'OP : elles deviennent des cellules de l'OB/télocéphale. Ceci renforce l'idée que les cellules exprimant moins de *dlx3b* au centre de la plaque neurale antérieure deviennent des cellules de l'OB/télocéphale (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000; Torres-Paz et Whitlock 2014; Torres-Paz, Tine, et Whitlock 2021), alors que les cellules qui expriment plus fortement *dlx3b* deviennent des cellules de l'OP. Cela montre que le développement du système olfactif central (OB) et périphérique (OP) est lié (Torres-Paz, Tine, et Whitlock 2021), et que le destin des cellules de l'OP et de l'OB est régulé par le niveau d'expression des gènes *dlx3b/4b*.

II.2.1.e Étapes plus tardives de la morphogenèse de la placode olfactive

- ***Formation de la rosette de neurones et ouverture de la narine***

Chez les poissons-zèbres, les OSN sont directement en contact avec le milieu extérieur par une ouverture qui se forme dans l'épithélium de la peau et qui préfigure la future narine (Hansen et Zeiske 1993; Kathleen E. Whitlock et Westerfield 1998). C'est grâce à l'ouverture de la narine que les OSN vont pouvoir détecter les molécules odorantes via leurs OR.

Mon équipe a récemment mis en évidence les mécanismes qui sous-tendent l'ouverture de cet orifice dans l'épithélium de la peau (Baraban et al. 2023). Il était précédemment connu que les neurones apicaux de l'OP, et notamment les OSN matures, s'organisent de manière circulaire, en rosette (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 1998; Yoshida et al. 2002; N. Miyasaka 2005; Madelaine, Garric, et Blader 2011). Ce sont leurs dendrites situées au centre de la rosette qui sont en contact avec l'environnement extérieur.

Grâce à la lignée *tg(-8.0cldnb:LY-EGFP)* permettant de visualiser les cellules de l'OP ainsi que les cellules de la peau (le périoderme), mon laboratoire d'accueil a montré qu'à 26 hpf l'OP est recouverte d'une monocouche de cellules de peau et que la narine n'est pas ouverte. La rosette apicale de neurones est apposée à cette couche de cellules de peau à ce stade et une petite cavité est présente au centre de la rosette. Mon équipe a montré par imagerie *live* que la narine s'ouvre entre 28 et 34 hpf, juste au-dessus de cette cavité, par une perte locale de contact entre les cellules de peau. Ni la mort cellulaire ni les divisions cellulaires ne semblent impliquées dans ce processus d'ouverture. Mon équipe a enfin observé que perturber l'activité de la myosine II spécifiquement dans les neurones de l'OP (grâce au système Gal4/UAS), inhibe l'ouverture de l'orifice de la narine dans la peau. Ceci démontre le rôle mécanique des neurones de la rosette dans l'ouverture de la narine dans l'épithélium de la peau (Baraban et al. 2023).

- ***Flexure céphalique***

Suite à la coalescence de l'OP, la flexure du cerveau antérieur (ou flexure céphalique), un processus morphogénétique majeur qui génère la forme pliée de la partie antérieure du cerveau des vertébrés, commence à remodeler les tissus de la tête. Des analyses d'expression (par hybridation *in situ*) de différents gènes de *patterning* exprimés dans le cerveau ont identifié que cette flexure a lieu entre les stades 24 et 48 hpf chez l'embryon de poisson-zèbre

(Fig.27) (Hauptmann et Gerster 2000). Les conséquences de ce processus morphogénétique sur les tissus qui entourent le cerveau antérieur, incluant les OP, sont pour le moment totalement inconnues, mais il est très probable qu'il affecte le développement, la forme et/ou la position de l'ensemble des tissus de la tête.

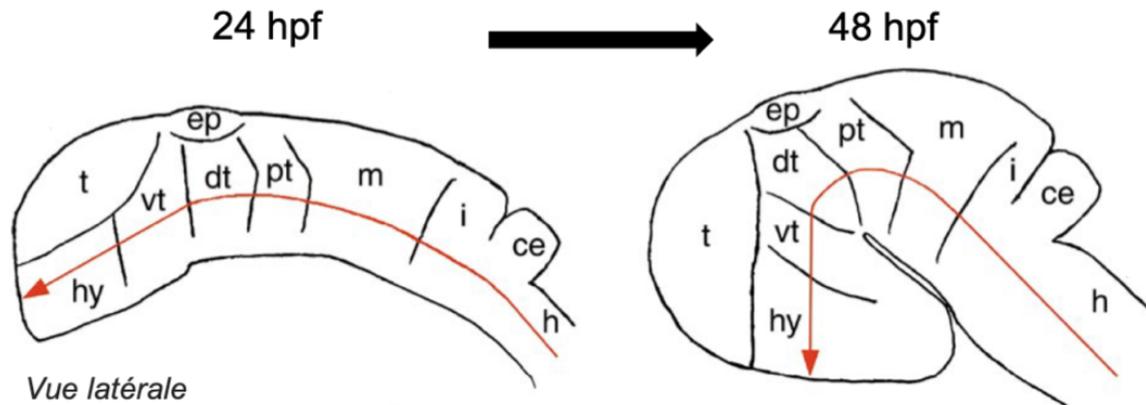


Figure 27 : Schéma représentant le mouvement de flexure céphalique chez le poisson-zèbre (adaptée de Hauptmann et Gerster 2000). *t*, télencéphale ; *hy*, hypothalamus ; *vt*, thalamus ventral ; *dt*, thalamus dorsal ; *pt*, prétectum, *m*, mésencéphale ; *i*, isthme, *ce*, cervelet ; *h*, cerveau postérieur.

II.2.2 Croissance et navigation axonale

Le cheminement des axones vers leurs cellules cibles est un processus crucial pour la formation correcte des circuits neuronaux. La navigation axonale est contrôlée par de nombreux signaux intra-ou extracellulaires, afin que ces derniers atteignent leur cible, et qu'une bonne transmission des signaux neuronaux soit assurée.

Les projections axonales des neurones de la placode olfactive se mettent en place selon quatre grandes étapes que je détaillerai plus tard dans le texte : (1) les corps cellulaires migrent latéralement tandis que leurs axones restent ancrés à la surface du cerveau, on parle d'extension rétrogrades des axones. (2) Les axones sortent de l'OP au niveau du point de sortie (*Exit Point, EP*), localisé dans la zone médio-ventrale de l'OP (Dynes et Ngai 1998), et naviguent dans le cerveau de manière fasciculée. (3) Une fois arrivés dans l'OB, les axones défasciculent et projettent vers les protoglomérules, qui sont leurs cibles intermédiaires dans l'OB. (4) Enfin, un réarrangement des projections axonales permet que tous les axones dont les OSN expriment le même OR innervent les mêmes glomérules (Fig.28). Dans la suite de

mon introduction je me concentrerai plus particulièrement sur les étapes (1) à (3) qui sont celles que j'ai étudiées lors de mes travaux de thèse.

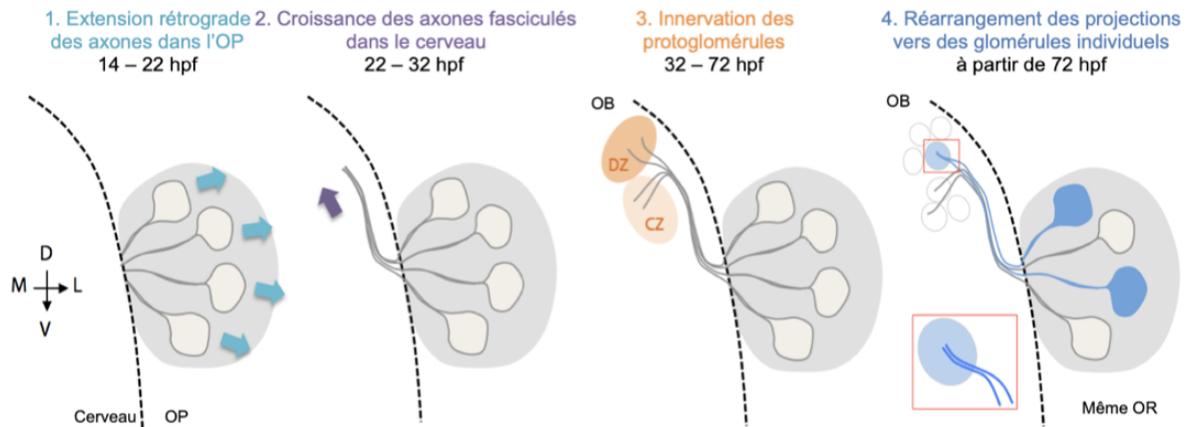


Figure 28 : Les étapes du développement du système olfactif du poisson-zèbre. (1) Les corps cellulaires des neurones de l'OP s'éloignent latéralement de la surface du cerveau tandis que leurs axones restent accrochés à cette surface. La partie proximale des axones s'allonge donc dans l'OP via ce processus d'extension rétrograde. (2) Les axones pénètrent dans le cerveau et migrent de manière fasciculée vers l'OB. (3) Une fois arrivés dans l'OB, les axones défasciculent et projettent vers les protoglomérules, leurs cibles intermédiaires dans l'OB. (4) Les projections se réarrangent pour que les axones dont les OSN expriment les mêmes OR innervent les mêmes glomérules (fasciculation homotypique).

Il existe différents types de neurones dans l'OP, qui se différencient dans des régions différentes de l'OP, et à des stades différents. Les premiers à se différencier sont les neurones dits pionniers, qui sont unipolaires et localisés dans la région ventro-médiale de l'OP aux stades embryonnaires, et dont les axones sont les premiers à sortir de l'OP (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 1998). La sous-population la plus représentée et la mieux caractérisée est celle des OSN ciliés, qui expriment OMP (le promoteur *omp* est aussi exprimé dans au moins une partie des neurones pionniers) et des OR classiques, ont de longues dendrites et sont localisés dans les couches profondes de l'OE à l'âge adulte (Hansen et Zeiske 1993; Y. Sato 2005). L'expression du gène *omp* est détectable dans la rosette apicale de l'OP à 28 hpf par hybridation *in situ* (Yoshida et al. 2002). L'OE contient également les OSN à microvillosités qui expriment TRPC2 (*Transient Receptor Potential Cation channel, subfamily C, member 2b, TRPC2*) et des récepteurs olfactifs de type voméronasal V2R. Ces OSN ont une dendrite plus courte et sont également localisés dans la rosette apicale aux stades embryonnaires, et plus superficiellement que les OSN ciliés dans l'OE adulte (Hansen

et Zeiske 1993; Y. Sato 2005). Ces deux classes d'OSN projettent dans des régions différentes de l'OB (Y. Sato 2005; Lakhina et al. 2012). L'OE contient par ailleurs les OSN à crypte dont je ne parlerai pas car ils sont peu détaillés dans la littérature.

De nombreuses équipes ont développé des outils pour visualiser de façon spécifique ces différentes populations de neurones et/ou leurs axones, et ont ainsi participé à la caractérisation de la croissance et de la navigation des axones olfactifs chez le poisson-zèbre (Tableau 3). Parmi ces outils, on trouve de multiples lignées transgéniques mais aucune d'elle n'a été utilisée en imagerie *live* avec des intervalles de temps courts permettant d'analyser le comportement dynamique des axones. Ainsi, la dynamique précise de la croissance et de la navigation de ces axones restent encore peu caractérisées. Néanmoins, de nombreux mécanismes moléculaires de guidage axonal ont été mis en évidence grâce à ces outils, je décrirai ces mécanismes plus loin dans le texte.

Type d'outils	Nom	Population d'OSN ciblée	Localisation du marquage	Découvertes majeures	1 ^{er} utilisateur dans le système olfactif du poisson-zèbre
Lignées transgéniques	Tg (omp::tau-EGFP)	Marquage des microtubules d'OSN ciliés	Microtubules	Implication de la PKA dans le guidage axonal (Yoshida 2002)	Yoshida 2002
	Tg(-8.4ngal:lgfp)	Marquage des OSN de l'OP et de cellules du cerveau à des stades précoces	Cytoplasmique et axonal	Fonction redondante de <i>neogal</i> et <i>acromod</i> (Madalaine 2011) Extension rétrograde des OSN dans l'OP (Brau 2017) Implication de l'actine dans la morphogénèse de l'OP (Memot 2022)	Blader 2003
	Tg(OMP ² ::gap-YFP) ^{01a}	Marquage des OSN ciliés	Membranaire	Implication de la signalisation de Robo/Sli dans la navigation axonale (Miyazaka 2005)	Miyazaka 2005
	Tg(OMP ² ::gap-YFP) ^{01b}	Marquage des OSN ciliés	Membranaire	Implication de la signalisation de Robo/Sli dans la navigation axonale (Miyazaka 2005) Rôle de <i>cxcr12a/Cxcr2</i> dans le guidage des OSN (Miyazaka 2007)	Miyazaka 2005
	Tg(OMP ² ::gap-CFP) ^{01a}	Marquage des OSN ciliés	Membranaire	Innervation de protoglomérules spécifiques en fonction du type d'OSN (Sato 2005)	Sato 2005
	Tg(OMP ² :: <i>β</i> -gal-RFP) ^{01a}	Marquage des OSN ciliés	Membranaire	Innervation de protoglomérules en fonction du type d'OSN (Sato 2005) Caractérisation des projections axonales des OSN exprimant un OR identifié (Sato 2007) Implication de la signalisation de Netrin/DCC dans la navigation des OSN vers l'OB ainsi que dans l'innervation d'un glomérule spécifique (Lakshmin 2012)	Sato 2005
	Tg(IRPC ² ::gap-Venus) ^{010a}	Marquage des OSN à Microvillosités	Membranaire	Rôle de <i>Neuropilin-Scamp3</i> dans l'OP (Shao 2017) Rôle de <i>Neuropilin-Scamp3</i> dans le guidage et le ciblage des axones des OSN dans l'OB (Cheng 2022) Rôle des différents récepteurs de la Netrine dans la navigation des OSN (Dang 2023)	Sato 2005
	Tg(IRPC ² :: <i>β</i> -gal-Venus) ^{010a}	Marquage des OSN à Microvillosités	Membranaire	Innervation de protoglomérules en fonction du type d'OSN (Sato 2005) Implication de la signalisation de Netrin/DCC dans la navigation des axones des OSN vers l'OB ainsi que dans l'innervation d'un glomérule spécifique (Lakshmin 2012) Innervation de protoglomérules spécifiques dans l'OB (Shao 2017) Innervation de protoglomérules spécifiques dans l'OB (Shao 2017) Rôle de <i>Neuropilin-Scamp3</i> dans le guidage et le ciblage des OSN dans l'OB (Cheng 2022) Rôle des différents récepteurs de la Netrine dans la navigation des OSN (Dang 2023)	Sato 2005
	Tg(BACOR111:7::gap-YFP/OR103-1::gap-CFP) ^{010a}	Marquage des OSN ciliés exprimant les OR111-7 et OR103-1	Membranaire	Innervation de protoglomérules en fonction du type d'OSN (Sato 2005) Implication de la signalisation de Netrin/DCC dans la navigation des OSN vers l'OB ainsi que dans l'innervation d'un glomérule spécifique (Lakshmin 2012) Rôle des différents récepteurs de la Netrine dans la navigation des OSN (Dang 2023)	Sato 2007
	Tg(OR111:7::IRES::Gal4::uas::Gap43-Chitrine)	Marquage des OSN ciliés exprimant l'OR111-7	Membranaire	Expression d'un OR spécifique et caractérisation des projections axonales des OSN exprimant ce récepteur (Sato 2007)	Sato 2007
Autres outils	Tg(-2.0ompb::Gal4)	Marquage des OSN ciliés	Dépend de la lignée UAS utilisée	Implication de la signalisation Netrin/DCC dans la navigation des OSN vers l'OB ainsi que dans l'innervation d'un glomérule spécifique (Lakshmin 2012) Innervation de protoglomérules spécifiques dans l'OB (Shao 2017) Rôle de <i>Neuropilin-Scamp3</i> dans le ciblage des OSN dans l'OB (Cheng 2022) Rôle des différents récepteurs de la Netrine dans la navigation des OSN (Dang 2023)	Lakshmin 2012
	Tg(BACor111:7::IRES::Gal4)	Marquage des OSN ciliés exprimant l'OR111-7	Dépend de la lignée UAS utilisée	Innervation de protoglomérules spécifiques dans l'OB (Shao 2017)	Shao 2017
	Tg(BACor130:1::IRES::Gal4)	Marquage des OSN ciliés exprimant l'OR130-1	Dépend de la lignée UAS utilisée	Innervation de protoglomérules spécifiques dans l'OB (Shao 2017)	Shao 2017
	Dil (carboxyamine)	Marquage antérograde des OSN en général	Cytoplasmique et axonal	Observation des premiers OSN (Hansen & Zschie 1993) Établissement de la première carte des glomérules (Bauer & Korsching 1994) Observation du cheminement des axones des OSN vers l'OB (Dynes & Ngai 1998)	Hansen & Zschie 1993
	ADN unc-76:GFP	Marquage mosaïque d'OSN	Cytoplasmique et axonal	Cheminement des axones des OSN vers l'OB (Dynes & Ngai 1998)	Dynes & Ngai 1998
	Anticorps anti-Zns-2 (monoclonal)	Marquage des neurones pionniers et des OSN en général	Cytoplasmique et axonal	Caractérisation des axones pionniers (Whitlock 1998)	Whitlock 1998
	Anticorps anti-Cairéline (monoclonal)	Sous-population d'OSN qui ciblent deux glomérules	Cytoplasmique et axonal	Implication de la signalisation de Robo/Sli dans la navigation axonale (Miyazaka 2005) Organisation de l'OB (Bratbach 2012 & 2013)	Miyazaka 2005
	Anticorps anti-FCAM (polyclonal)	Marquage des OSN ciliés et à microvillosités	Axonal	Implication de la signalisation de Robo/Sli dans la navigation axonale (Miyazaka 2005) Rôle de <i>cxcr12a/Cxcr2</i> dans le guidage des OSN (Miyazaka 2007)	Miyazaka 2005

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents outils permettant de visualiser les OSN et/ou leurs axones, ainsi que des mécanismes mis en évidence grâce à ces outils.

II.2.2.a L'extension rétrograde des axones dans la placode olfactive

En effectuant des marquages mosaïques des cellules de l'OP, soit par injection d'ADN soit par transplantation, mon laboratoire d'accueil a observé que, pendant leur convergence antéro-postérieure, les cellules de l'OP ont une forme de goutte avec une protrusion orientée dans la direction de leur migration et en contact avec le cerveau. Ce contact se stabilise lorsque les cellules arrivent au centre de l'OP (Fig.25). Lors de la seconde phase de mouvement latéral, ces protrusions restent en contact avec la surface du cerveau tandis que les corps cellulaires s'en éloignent latéralement (Fig.25). Les protrusions s'assemblent ensuite pour former un faisceau apposé à la surface du cerveau. Ces protrusions présentent les caractéristiques d'axones ou de futurs axones. En effet, en utilisant les sondes *Doublecortin-GFP* (permettant de visualiser les microtubules) et *Utrophin-GFP* (permettant de visualiser l'actine) Breau et al. ont observé que les protrusions ont une architecture du cytosquelette typique des axones. Le *shaft* des protrusions contient des microtubules qui s'étendent durant le mouvement latéral et de l'actine est présente à l'extrémité des protrusions, proche de la surface du cerveau, dans des structures ressemblant à des filopodes qui explorent l'environnement. On retrouve donc une organisation du cytosquelette similaire à celle caractérisant l'extrémité d'axones en cours d'extension via leur cône de croissance (M. A. Breau et al. 2017). L'identité axonale de ces protrusions a également été confirmée par le fait que le faisceau de protrusions apposé à la surface du cerveau exprime *zns-2*, un marqueur des neurones pionniers de l'OP (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 1998), et également *Kif5c⁵⁶⁰-YFP* (analysée par expression mosaïque induite par injection d'ARNm suivie dans certains cas de transplantations), un marqueur de spécification axonale précédemment décrit (Jacobson, Schnapp, et Banker 2006; Randlett et al. 2011), qui s'accumule à l'extrémité des protrusions pendant le déplacement latéral de leur corps cellulaire. Ces résultats montrent que la croissance initiale des axones s'effectue lors du mouvement latéral des corps cellulaires des neurones dans l'OP, selon un mode très original d'extension rétrograde, au cours duquel le mouvement latéral du corps cellulaire (et non celui du cône de croissance) permet l'extension de la partie proximale de l'axone (M. A. Breau et al. 2017). Cette extension rétrograde est au moins en partie provoquée par la morphogenèse de l'œil car chez les mutants *rx3*, dont les yeux ne se développent pas, les axones sont plus courts (Monnot et al. 2022).

II.2.2.b L'hypothèse des axones pionniers

L'une des premières observations des axones navigants de l'OP vers l'OB chez le poisson-zèbre a été faite en microscopie électronique et avec un marquage au DiI lors d'une étude menée par Hansen & Zeiske en 1993. Ils ont observé des faisceaux d'axones reliant l'OP à l'OB à partir de 25 hpf (Hansen et Zeiske 1993).

Le modèle actuel décrivant la croissance des axones olfactifs de la placode vers le bulbe fait intervenir une population de neurones pionniers dont les corps cellulaires, dépourvus de dendrites, sont situés dans la zone ventrale et médiane de l'OP, et dont les axones sont les premiers à émerger de l'OP et à migrer dorsalement au stade 24 hpf. Ces corps cellulaires et leurs axones sont marqués spécifiquement par l'anticorps *zns-2* (Fig.29) (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 1998).

D'après ce modèle, une deuxième vague de neurones se différencie autour de 44 hpf, après l'ouverture de la narine, dans la rosette apicale qui borde l'orifice de la narine. Ces derniers possèdent une dendrite et peuvent être visualisés par un marquage externe au DiI. Il s'agit des OSN matures (Fig.29). En co-marquant les neurones pionniers avec *zns-2* et les OSN matures avec du DiI, on observe que les deux populations d'axones se superposent dans le télencéphale et au point de sortie de l'OP (Fig.29). Ces observations suggèrent que les cônes de croissance (*Growth Cone GC*) des OSN matures suivent la trajectoire des axones pionniers vers l'OB (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 1998).

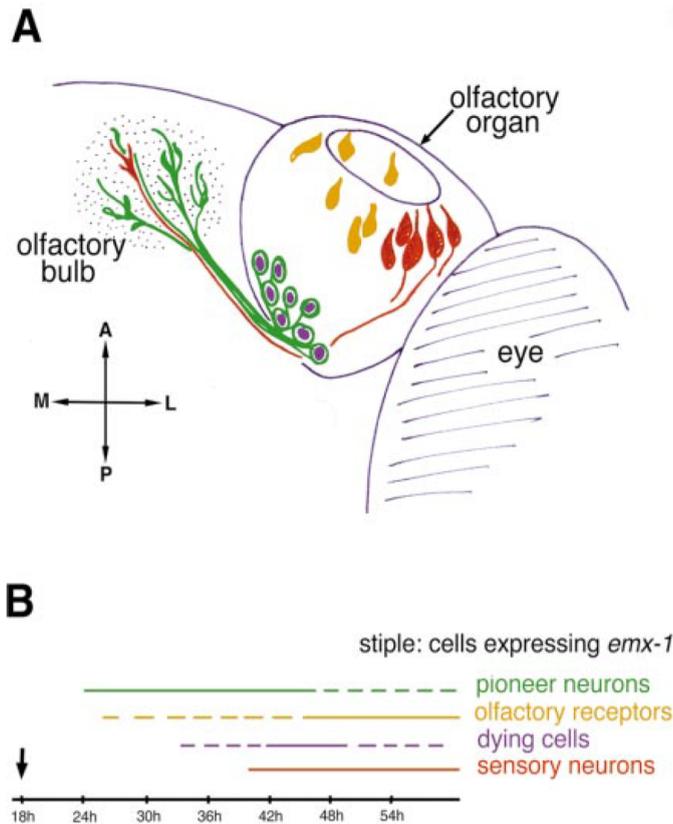


Figure 29 : Schéma du modèle actuel décrivant la mise en place des projections des axones sensoriels olfactifs entre 24 et 54 hpf (tirée de Whitlock et Westerfield 1998). (A) Les neurones pionniers, au corps cellulaire sphérique et dépourvu de dendrite, expriment *zns-2* (vert). Leur axone contacte la région de l'OB dans le télencéphale qui exprime *emx1* (pointillés). Les axones des OSN matures (rouge) suivent les axones pionniers pour innervier l'OB. Les neurones pionniers subissent ensuite de l'apoptose (violet). Les neurones qui expriment des OR sont localisés à la surface apicale de l'OP (orange). (B) Chronologie de ces événements développementaux. Le code couleur correspond à celui de (A).

Pour tester cette hypothèse, Whitlock et Westerfield (1998) ont étudié la fonction des neurones pionniers en réalisant leur ablation avec une micropipette à 18-20 hpf, c'est-à-dire pendant la coalescence de l'OP. Ils ont ensuite analysé les conséquences de cette ablation sur l'innervation du bulbe par les axones pionniers et les axones des OSN matures. Chez des embryons ayant subi l'ablation des neurones pionniers, les OSN projettent leur axone de manière anormale, en territoire postérieur, vers les commissures post-optiques. Lorsque l'ablation des neurones pionniers n'est pas complète, certains axones d'OSN matures migrent correctement, et d'autres ont la même migration ectopique postérieure que celle précédemment décrite. En faisant l'ablation des neurones pionniers après que leur axone ait migré dans l'OB, il n'y a pas d'erreur d'acheminement des OSN matures. Ces résultats suggèrent que les axones pionniers sont nécessaires pour le guidage des axones des OSN matures vers l'OB (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 1998). Cependant, nous savons maintenant que dès 18-20 hpf, au stade où ont été prélevés les neurones pionniers avec la micropipette, la partie proximale des axones des neurones exprimant *tg(ngn1:gfp)* s'allonge par extension rétrograde au sein de la placode, près du cerveau (Fig.25) (M. A. Breau et al. 2017). Nous savons de plus que certains neurones exprimant *tg(ngn1:gfp)* s'incorporent dans

la rosette apicale après cette extension rétrograde et se différencie très probablement en OSN (observations non publiées réalisées dans mon laboratoire). Les neurones pionniers ne sont donc pas les seuls à initier la croissance de leurs axones par extension rétrograde dans l'OP. Ainsi, il est possible que l'ablation par micropipette ait endommagé la partie proximale de nombreux axones, incluant celle des axones des OSN. Les défauts de développement des axones des OSN observés après ablation ne sont donc peut-être pas directement causés par l'absence des neurones pionniers, mais par l'ablation de la partie proximale de ces axones. Il serait nécessaire d'effectuer de nouvelles expériences pour tester plus directement l'existence et le rôle de ces neurones pionniers et leur lien avec les OSN.

II.2.2.c Rôle des molécules de guidage pendant la navigation des axones vers le bulbe olfactif

Une fois la partie proximale des axones formée par extension rétrograde, l'extrémité de ces derniers, qui prend alors l'apparence d'un cône de croissance, pénètre dans le cerveau puis migre dorsalement jusqu'à atteindre son territoire cible dans l'OB. La visualisation des axones par marquage antérograde au DiI, par immunomarquage ou avec des constructions ou lignées transgéniques spécifiques de certaines populations de neurones de l'OP (ces outils sont listés dans le Tableau 3) a permis d'obtenir une première description de leur comportement pendant leur migration dorsale, depuis la placode vers l'OB : lors de leur navigation, les axones fasciculent à la sortie de l'OP, naviguent en faisceau vers l'OB puis défasciculent afin d'innover les protogglomérules. Les premiers scientifiques à avoir étudié la dynamique des GC par imagerie *live* sont Dynes et Ngai (1998) et Yoshida (2002), qui ont notamment observé, grâce à un marquage mosaïque des axones obtenu par injection d'ADN, que les axones projettent directement vers leur protogglomérule, sans effectuer de virages ou pauses, ce qui implique que les GC suivent des signaux précis lors de leur navigation vers l'OB (Dynes et Ngai 1998; Yoshida et al. 2002). Dans cette partie, je détaillerai quatre exemples de couples récepteur/ligand ayant un rôle connu dans le guidage des axones de neurones pionniers ou d'OSN.

- ***Voie Cxcl12a/Cxcr4b***

L'expression de *cxcr4b* persiste dans l'OP lors de la phase de croissance des axones dans le cerveau, et *cxcl12a* est exprimé le long de la route suivie par les axones des OSN. On peut donc se demander si la voie *cxcl12a/cxcr4b* joue un rôle dans la croissance et le ciblage des

OSN vers l'OB (Nobuhiko Miyasaka, Knaut, et Yoshihara 2007). L'analyse des mutants homozygotes *ody* exprimant le transgène *tg(omp:yfp)* montre que le faisceau d'axones ne se forme pas dans 41% des placodes. En marquant les axones olfactifs des mutants *ody* à 72 hpf, avec un anticorps PCAM (permettant de visualiser à la fois les axones des OSN ciliés et à microvillosités), les auteurs ont observé qu'un certain nombre d'embryons (28 %) ont des défauts de projections axonales issues d'une (28%) ou des deux (28%) placodes, alors que d'autres ont des projections normales (44 %). Chez les mutants présentant des défauts, les axones ne parviennent pas à sortir de l'OP ou s'arrêtent dès leur sortie. Cela montre que la signalisation médiée par le couple *cxcl12a/cxcr4b* est nécessaire à au moins une sous-population d'axones, pour sortir de l'OP et naviguer vers l'OB (Fig.30) (Nobuhiko Miyasaka, Knaut, et Yoshihara 2007).

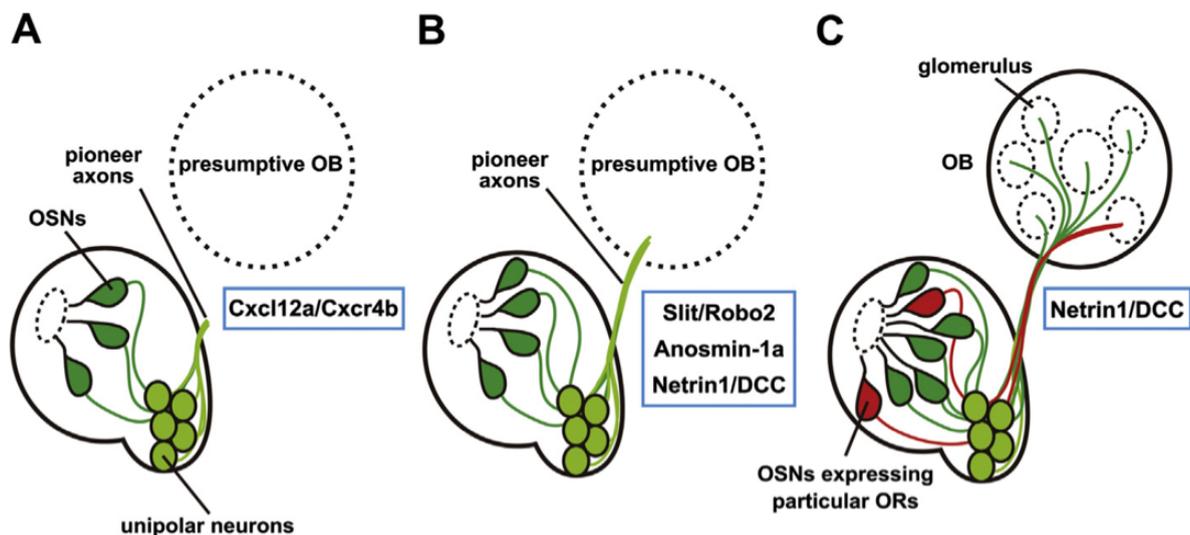


Figure 30 : Schéma représentant la navigation des axones des neurones pionniers et des OSN vers l'OB et les mécanismes moléculaires impliqués (tirée de Miyasaka et al. 2013). (A) La signalisation induite par le couple *cxcl12a/cxcr4b* guide les axones pionniers hors de l'OP. (B) La signalisation induite par *Slit/robo2* et *anosmine-1a* est nécessaire pour la fasciculation des axones. Les signaux *Slit*, des molécules à action répulsive lorsqu'elles interagissent avec le récepteur *Robo2*, permettent de guider les axones vers l'OB en les empêchant de dévier leurs trajectoires dans les domaines d'expression de *Slit*. Enfin, le couple *Nétrine/DCC* permet également de guider les axones pionniers et ceux des OSN. (C) La signalisation *Nétrine/DCC* est par ailleurs nécessaire à une bonne projection glomérulaire de sous-populations d'OSN ciliés exprimant certains OR spécifiques (comme par exemple l'OR111-7).

- **Voie *Slit/Robo2***

La même équipe s'est également intéressée au rôle du couple répulsif comprenant le récepteur *Roundabout2* (*Robo2*) et ses ligands *Slit* (N. Miyasaka 2005). Les protéines *Robo2* et *Slit* sont des glycoprotéines; *Robo2* est un récepteur transmembranaire qui appartient à la superfamille des immunoglobulines, *Slit* est une protéine sécrétée. De nombreuses études ont montré le rôle répulsif de la voie *Slit/Robo2* dans la navigation d'une variété d'axones chez différentes espèces. Ce couple empêche par exemple certaines populations d'axones de se diriger vers la ligne médiane chez la drosophile (Kidd, Bland, et Goodman 1999; Seeger et al. 1993) et chez les mammifères (Bagri et al. 2002), notamment les axones commissuraux (H. Long et al. 2004) et rétiniens (Plump et al. 2002). Il participe également au contrôle de la mise en place du tractus olfactif latéral (faisceau d'axones formé par les cellules mitrales, projetant vers le cortex piriforme) chez la souris (Nguyen-Ba-Charvet et al. 2002).

Chez le poisson-zèbre, l'ARNm de *robo2* est détecté à partir de 20 hpf dans l'OP. Entre 24 et 36 hpf, *robo2* est toujours exprimé dans l'OP mais aussi dans le cerveau (incluant l'OB). A 48 hpf, l'expression de *robo2* diminue dans l'OP mais reste forte dans le cerveau. Dans les mutants homozygotes *astray* (*ast*), qui sont mutés pour *Robo2* (Fricke et al. 2001), le marquage des OSN et de leurs axones par DiI, et leur analyse à 84 hpf montre que certains axones atteignent l'OB mais que d'autres projettent postérieurement, dans le diencéphale, et peuvent même traverser la ligne médiane. Pour analyser la dynamique de ces défauts de migration axonale, les auteurs ont produit une lignée rapportrice de la sous-population de neurones exprimant OMP (*tg(omp:gap-YFP* appelé *omp:yfp*)), qu'ils ont croisée avec le mutant *ast* pour faire de l'imagerie *live*. Notons ici que cette lignée marque les OSN ciliés et une population ventro-médiale de neurones unipolaires qui semblent être les neurones pionniers décrits par Withlock et Westerfield en 1998, (voir Miyasaka 2005), alors qu'en hybridation *in situ* l'expression d'*omp* n'est détectée que dans la rosette d'OSN. Dans ces embryons, l'émergence des axones YFP positifs est retardée, certains axones migrent médio-ventralement plutôt que dorsalement puis atteignent le diencéphale et parfois croisent la ligne médiane, les OB sont plus petits et le protoglomérule dorso-latéral disparaît. On observe également l'apparition de projections ventrales avec des structures ectopiques ressemblant à des glomérules. En marquant les axones pionniers avec l'anticorps *zns-2*, les auteurs observent que ces derniers défasciculent directement en sortant de l'OP et projettent médio-ventralement vers la ligne médiane chez les mutants *ast*. Ces projections ventrales

innervent des glomérules ventro-antérieurs et ventro-postérieurs, et on voit que des fascicules aberrants forment des glomérules dans une région dorso-postérieure (N. Miyasaka 2005). Ces résultats montrent que, chez les mutants *ast*, les axones des neurones pionniers et des OSN ont des défauts de navigation et de ciblage des protoglomérules. Grâce à l'anticorps anti-calrétinine (une protéine de liaison au calcium, impliquée dans la signalisation calcique), on peut visualiser une sous-population d'OSN et leurs axones qui projettent dans deux protoglomérules distincts. Chez les mutants *ast*, un seul protoglomérule, plus grand que chez les contrôles, est marqué. Ce résultat peut être interprété comme un défaut de différenciation des protoglomérules en l'absence de *robo2* (N. Miyasaka 2005). L'implication de ce gène dans le développement des projections axonales olfactives est renforcée par la visualisation de l'ensemble des axones avec un anticorps anti-PCAM à 72 hpf : chez les mutants, les axones défasciculent avant d'atteindre l'OB et quelques axones seulement pénètrent aléatoirement dans l'OB. *robo2* est donc nécessaire pour la fasciculation des axones lors de leur navigation vers l'OB et pour l'innervation correcte de leurs protoglomérules (Fig.30) (N. Miyasaka 2005).

L'expression de *robo2* chevauche celle du transgène *tg(ngn1:gfp)* à 24 hpf et 36 hpf, qui lui-même récapitule l'expression du gène *neurog1* endogène (Blader, Plessy, et Strähle 2003; Madelaine, Garric, et Blader 2011). Chez les mutants *neurog1*, l'expression de *robo2* est perdue, et les axones sont souvent défasciculés comme dans les mutants *ast* (N. Miyasaka 2005; Madelaine, Garric, et Blader 2011). On détecte des projections aberrantes dès que les axones sortent de l'OP, ainsi que certains axones semblant rester bloqués dans l'OP. En plus des défauts de fasciculation, l'organisation des protoglomérules de l'OB est perturbée chez ce mutant. Cela suggère que *robo2* est une cible du facteur de transcription *neurog1*, et que c'est l'absence d'expression de *robo2* qui impacte la navigation et le ciblage des axones chez les mutants *neurog1* (Madelaine, Garric, et Blader 2011).

Qu'en est-il de l'expression et de la fonction des Slits dans ce système? L'analyse de l'expression des ligands de *robo2* a montré que les ARNm des quatre membres de la famille de gènes *Slit* (*slit1a*, *slit1b*, *slit2* et *slit3*) sont exprimés dans des régions proches de la trajectoire des axones sensoriels olfactifs (Fig.31A). Entre 24 et 36 hpf, *slit1a*, *slit1b* et *slit2* sont exprimés en clusters bilatéraux proches de la limite télencéphale/diencéphale. *slit1a* et *slit1b* sont également exprimés dans le télencéphale, *slit2* et *slit3* sont présents dans le télencéphale ventral le long de la ligne médiane (Fig.31A). Ces profils d'expression

suggèrent que la voie *robo/slit* est responsable de la répulsion des axones en empêchant les axones de naviguer dans certaines zones définies. En induisant une surexpression ubiquitaire de *slit2* grâce à la lignée *tg(hsp70:Slit2-GFP)*, inductible par choc thermique (Yeo et al. 2004), puis en faisant un marquage au DiI pour visualiser les OSN et leurs axones à 84 hpf, les auteurs ont observé que les embryons ont les mêmes défauts de navigation que les mutants *ast*. Cela appuie l'hypothèse selon laquelle la navigation des OSN dépend de la voie *robo2/slit* (Fig.30) (N. Miyasaka 2005).

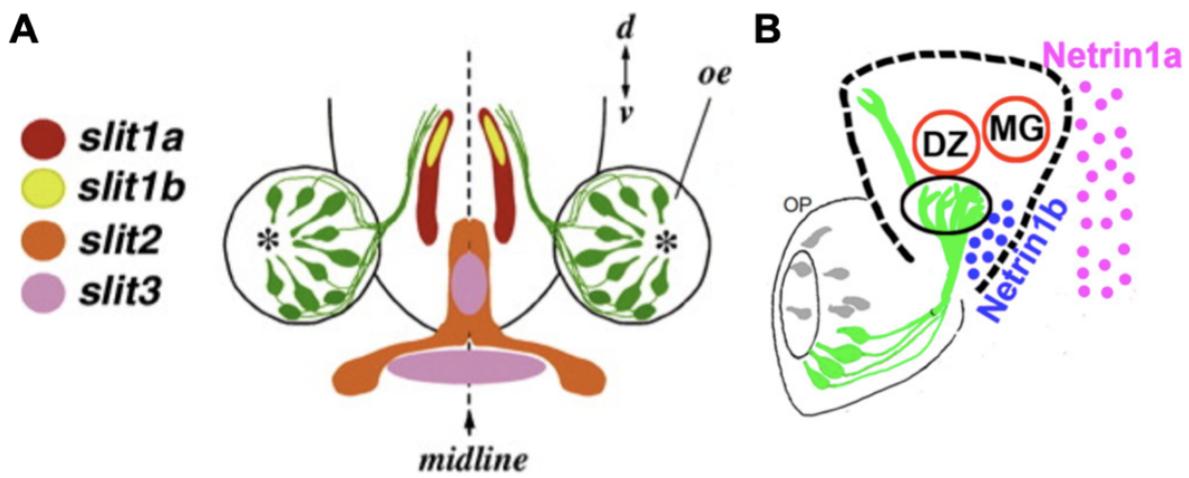


Figure 31 : Représentation schématique des domaines d'expression des gènes des ligands Slits et Nétrines. Les neurones olfactifs et leurs axones sont représentés en vert, vue frontale (A) À 30 hpf, *slit1a*, *slit1b* et *slit2* sont exprimés en clusters bilatéraux proches de la limite télencéphale/diencéphale. *slit1a* et *slit1b* sont également exprimés dans le télencéphale, *slit2* et *slit3* sont présents dans le télencéphale ventral le long de la ligne médiane (*Midline*). *oe* = *Olfactory Epithelium*; (tirée de (N. Miyasaka 2005)). (B) A 72 hpf, l'ARNm de *netrin1a* est localisé le long la ligne médiane du télencéphale, et *netrin1b* est localisé plus ventralement, proche de la région où les OSN pénètrent dans l'OB. En vert, les axones exprimant le gène OR111-7 qui projettent dans la zone centrale (CZ) du bulbe olfactif et un glomérule latéral (LG1), *DZ* = *Dorsal Zone*, *MG* = *Medial Glomeruli*; (tirée de (Lakhina et al. 2012)).

- **Voie Nétrine/DCC**

Un autre laboratoire s'est intéressé au rôle du couple *Nétrine/DCC*, bien connu pour participer au guidage axonal (Serafini et al. 1994; Hong et al. 1999). Nétrine-1 a été la première molécule de guidage identifiée chez *C.elegans* (Hedgecock et al. 1985; Ishii et al. 1992) et elle est nécessaire au guidage des axones commissuraux chez la souris (Serafini et al. 1994). Ces signaux sont soit répulsifs soit attractifs en fonction du récepteur exprimé par

l'axone qui reçoit le signal (Hong et al. 1999). *In vitro*, l'activité de la protéine Kinase A module la réponse aux nétrines (Song, Ming, et Poo 1997), et comme expliqué dans la partie I de mon introduction, la Nétrine-1 peut interagir avec la Laminine, ce qui peut modifier la réponse attractive en une réponse répulsive des axones (Höpker et al. 1999).

L'ARNm du récepteur *DCC* (*Deleted in Colorectal Cancer, DCC*) est présent dans la plupart des OSN ciliés exprimant OMP (Lakhina et al. 2012), dont ceux exprimant le récepteur olfactif OR111-7, et dans l'OB à partir de 24 hpf (Lakhina et al. 2012; Dang et al. 2023) (Lakhina 2012, Dang 2023). Les OSN exprimant OR111-7 expriment également *unc5b*, un autre récepteur de la nétrine (Dang et al. 2023). En revanche, les OSN à microvillosités, qui expriment TRPC2 et qui ne sont détectables qu'à partir de 42 hpf avec la lignée *tg(trpc2:Venus)*, n'expriment pas l'ARNm de *DCC* à 42 hpf.

A 27 et 53 hpf, l'ARNm du ligand *netrin1a* est localisé le long de la ligne médiane dans le télencéphale, et l'ARNm de *netrin1b* est localisé plus ventralement, proche de la région où les OSN pénètrent dans l'OB (Fig.31B) (Lakhina et al. 2012; Dang et al. 2023).

L'analyse d'embryons injectés avec un morpholino ciblant *DCC* dans le fond transgénique *tg(omp:gal4;uas:Citrine)* (spécifique des OSN ciliés), montre que certains axones des OSN ciliés projettent postérieurement, loin de l'OB, alors que les axones qui expriment le transgène *tg(trpc2:Venus)* (spécifique des OSN à microvillosités) ne présentent pas de défauts de navigation, en accord avec le profil d'expression de *DCC*. L'expression des deux membres de ce couple récepteur/ligand ainsi que ces expériences fonctionnelles suggèrent donc un rôle spécifique dans la navigation des OSN ciliés exprimant OMP (Fig.30) (Lakhina et al. 2012).

Les auteurs ont poursuivi leur étude par l'analyse d'une sous-population d'OSN ciliés exprimant l'OR111-7, qui projettent dans les protoglomérules de la zone centrale (CZ) et du glomérule latérale 1 (LG1), grâce à la lignée *tg(OR111-7:gal4;uas:citrine)*, cette fois-ci en utilisant le morpholino *DCC* ainsi qu'un mutant *DCC* qu'ils ont généré. Dans les deux conditions, certains axones tournent en sortant de l'OP et projettent postérieurement tandis que d'autres projettent antérieurement hors de l'OB (Lakhina et al. 2012; Dang et al. 2023). Dans un mutant *unc5b*, il y a également des projections ectopiques qui ciblent les protoglomérules de la zone dorsale ou les protoglomérules médians (Dang et al. 2023). Des résultats similaires sont observés avec des morpholinos ciblant *netrin1a* et *netrin1b* (Lakhina et al. 2012). Dans les mutants *netrin1a* et *netrin1b*, deux mutants nuls, des erreurs de projections sont détectées avec le transgène *tg(OR111-7:gal4;uas:citrine)*. Le double mutant n'a pas d'effet additif par rapport aux mutants seuls et les défauts sont toujours présents. Ces

deux ligands sont nécessaires à la navigation de ce sous-groupe d'OSN ciliés (Dang et al. 2023). Cela confirme que la voie *Nétrine/DCC* est nécessaire au guidage et au ciblage des axones exprimant OR111-7 (Fig.30) (Lakhina et al. 2012; Dang et al. 2023).

En restaurant l'expression de *DCC* grâce à une lignée *tg(uas:DCC)* (modifiée pour qu'elle ne soit pas ciblée par le morpholino ciblant *DCC*, (Lim et al. 2011)), une correction partielle des défauts de projections est observée pour les axones des neurones exprimant OR111-7. Ces embryons ont en plus des axones qui projettent ventralement vers la ligne médiane, proche de la zone où l'ARNm de *netrin1a* est exprimé, ce qui est en accord avec l'hypothèse selon laquelle les *nétrines* jouent un rôle de molécules attractives régulant la navigation des OSN jusqu'à l'OB (Fig.30) (Lakhina et al. 2012).

- ***Voie Sémaforine/Neuropiline***

Un autre couple récepteur/ligand a été identifié comme participant à la régulation du guidage des axones, notamment des OSN à microvillosités. Il s'agit du couple *nrp2/sema3fa*, dont le récepteur est membre de la famille des *Neuropilines* et le ligand de celle des *Sémaforines*. Grâce à une méthode basée sur du RNAseq, deux récepteurs de la famille de *Neuropiline* *nrp2a* et *nrp2b* ainsi qu'un de leur ligand membre de la famille des *Sémaforine* de classe 3, *sema3fa* ont été identifiés comme étant exprimés par les OSN à microvillosités. L'analyse des mutants *nrp2a*, *nrp2b* et *sema3fa* montre que leurs axones olfactifs ne projettent pas dans les bons glomérules (R. P. Cheng et al. 2022).

Les récepteurs *nrp2a* et *nrp2b*, deux gènes paralogues du poisson-zèbre par ailleurs orthologues du récepteur mammalien *nrp2*, sont co-exprimés dans les OSN à microvillosités, ouvrant la possibilité de fonctions redondantes dans ces OSN. Le double mutant *nrp2a/nrp2b* a des défauts de projections accrues comparé aux simples mutants. Cela suggère que *nrp2a* et *nrp2b* fonctionnent de manière partiellement redondante dans la régulation des projections et du ciblage des OSN à microvillosités (R. P. Cheng et al. 2022).

II.2.2.d Autres molécules impliquées dans le développement des axones

Même si les molécules de guidage constituent les acteurs moléculaires les plus étudiés dans le guidage et le ciblage des OSN dans l'OB, il existe d'autres molécules régulatrices impliquées dans ce processus.

Yoshida et al, 2002, ont étudié le rôle de la protéine kinase A (PKA). Cette protéine est activée par une augmentation des taux d'AMPC (Adénosine Monophosphate Cyclique) dans les cellules, elle-même produite par des adénylates cyclases qui sont activées ou inhibées lors de la stimulation de certains récepteurs métabotropiques (Castro, Yapo, et Vincent 2016). Par exemple, dans des neurones spinaux de xénopes *in vitro*, son activité permet de changer la réponse attractive des nétrines en réponse répulsive (Song, Ming, et Poo 1997). Son implication dans l'extension et la navigation axonale *in vivo* reste néanmoins peu connue. Dans cette étude, les auteurs ont produit une lignée permettant de visualiser les microtubules des neurones exprimant OMP, *tg(omp-tau::GFP)*. Ils ont également généré une construction qui permet l'expression d'une version constitutivement active (CA) de la PKA spécifiquement dans les OSN ciliés, exprimant OMP. A 50 hpf, les embryons dont les OSN expriment la version CA de la PKA projettent leurs axones plus loin que chez les contrôles, et ont des trajectoires plus complexes. De la même manière, ils ont exprimé un dominant négatif (DN) de la PKA et ont observé que certains axones restent dans l'OP. Les axones qui sortent de l'OP ont quant à eux une trajectoire perturbée. La forskoline est un activateur de l'adénylate cyclase, une enzyme qui produit de l'AMPC, qui lui-même active la PKA. Traiter à 18 hpf des embryons *tg(omp-tau::GFP)* avec de la forskoline ne provoque pas de défaut morphologique dans la tête des embryons, mais retarde les axones dans l'OP, ce qui suggère que le niveau d'activation de la PKA, sous contrôle des taux d'AMPC dans la cellule, régule le développement axonal des OSN ciliés (Yoshida et al. 2002). Il reste à déterminer l'identité des récepteurs membranaires activant l'adénylate cyclase produisant l'AMPC dans ce processus de régulation du guidage des axones olfactifs. Chez la souris, il est actuellement considéré que cette production d'AMPC, qui régule les projections olfactives dans le bulbe olfactif selon l'axe antéro-postérieur, ainsi que la coalescence homotypique des axones au sein des glomérules, est dépendante des OR eux-mêmes (pour revue voir (Takeshi Imai et Sakano 2008; 2011; Lodovichi et Belluscio 2012))

Le gène *KAL-1* code pour l'*anosmine-1*, une protéine de la MEC. Ce gène est muté chez des patients atteints du syndrome de Kallmann, une maladie génétique humaine qui affecte la différenciation de l'OB et/ou l'élongation axonale des OSN entraînant une anosmie (perte de l'odorat) (Schwanzel-Fukuda, Bick, et Pfaff 1989). Cela en fait une molécule candidate contrôlant le développement du circuit olfactif. L'*anosmine-1* est détectée par immunomarquage à partir de 22 hpf dans les OSN. A partir de 36 hpf, elle est aussi détectée autour des OSN et dans les axones ayant atteint l'OB. Dans l'OB, il n'y a pas de marquage de

l'*anosmine-1* avant 72 hpf (Yanicostas et al. 2009). Lorsqu'un morpholino ciblant *anosmine-1* est utilisé chez des embryons *tg(omp-tau::GFP)* (Yoshida et al. 2002), l'OP et l'OB sont très désorganisés et, chez les morphants les plus sévères, l'OP est séparée en deux parties, suggérant un rôle de l'*anosmine-1* dans la morphogenèse de l'OP. La croissance des axones des OSN est également impactée: peu d'axones sortent de la placode, ils sont plus courts, ne fasciculent pas correctement, et projettent hors de l'OB ou uniquement sur un glomérule malformé. Ces observations montrent que l'*anosmine-1* est nécessaire à la morphogenèse de l'OP et à la croissance et la fasciculation des axones des OSN (Fig.30). Cette protéine de la MEC a aussi été identifiée comme étant un potentiel cofacteur de *cxcl12a* et de ses récepteurs dont *cxc4b* (Yanicostas et al. 2008; 2009). Connaissant l'implication de la voie *cxcl12a/cxc4b* dans la morphogenèse précoce de l'OP (Nobuhiko Miyasaka, Knaut, et Yoshihara 2007) - voir plus haut), il serait donc possible que les défauts induits par le morpholino *anosmine-1* surviennent dès l'étape de coalescence de l'OP, mais des expériences d'imagerie *live* devront être réalisées pour le confirmer.

II.2.3 Innervation du bulbe olfactif

Une fois que les axones ont terminé leur navigation dans le télencéphale, ils vont innover leur cible dans l'OB. L'OB des poissons-zèbres comporte en sa périphérie, comme celui des mammifères ou des insectes, des glomérules dans lesquels les axones des OSN contactent les dendrites de leurs cellules cibles (en particulier les cellules mitrales et à panache, mais aussi des interneurons périglomérulaires) ce qui permet de transmettre l'information sensorielle olfactive périphérique au système nerveux central (Calvo-Ochoa et Byrd-Jacobs 2019). Comme vu précédemment, l'OB du poisson-zèbre se développe de manière coordonnée avec l'OP (Fig.24, cellules jaunes) (Kathleen E. Whitlock et Westerfield 2000; Torres-Paz et Whitlock 2014; Torres-Paz, Tine, et Whitlock 2021). L'organisation des glomérules est très stéréotypée et les OSN ciliés (exprimant OMP) et à microvillosités (exprimant TRPC2) projettent vers deux populations de glomérules distinctes dans l'OB (Yoshida et al. 2002; Y. Sato 2005; Lakhina et al. 2012; R. P. Cheng et al. 2022).

II.2.3.a Conservation chez le poisson-zèbre de la règle "un récepteur olfactif = un glomérule"

Dans le génome du poisson-zèbre ont été identifiés environ 300 gènes qui codent potentiellement pour des OR. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G et sont exprimés dans les OSN ciliés (~ 140 OR), dans les OSN à microvillosités (~ 6V1R et ~ 50 V2R) (Shao

et al. 2017; Yoshihara 2008) et dans les OSN à crypte (V1R4) (Oka 2012, Shao 2017). On trouve également des récepteurs associés aux amines (*Trace Amine Associated Receptor, TAAR*) exprimés par certains OSN ciliés mais ils sont très peu caractérisés (Shao et al. 2017). Les OSN expriment seulement un OR comme l'ont montré plusieurs expériences d'hybridation *in situ* sur des OR spécifiques (Ngal 1993; Barth, Justice, et Ngai 1996; Weth, Nadler, et Korsching 1996; Y. Sato, Miyasaka, et Yoshihara 2007; Shao et al. 2017), ce qui supporte la règle de 1 OSN = 1 OR déjà mise en évidence chez les mammifères. A ce jour, une seule exception à cette règle a été observée, par double hybridation *in situ* : certains OSN co-expriment OR103-1 et OR103-2 / 5 (Y. Sato, Miyasaka, et Yoshihara 2007).

En fonction des molécules odorantes (ici des acides aminés, acides biliaires, nucléotides et phéromones) détectées, différentes zones de l'OB vont s'activer comme l'ont montré différentes équipes par marquage des axones des OSN avec des sondes fluorescentes rapportrices de l'activité calcique ou du voltage. Chaque molécule odorante induit une carte précise d'activation des glomérules dans l'OB avec des domaines qui se superposent (Friedrich et Korsching 1997; 1998; Liy 2005). Les molécules odorantes peuvent activer différents OR et participent ainsi à l'établissement d'une carte précise dans l'OB (Friedrich et Korsching 1997; Nobuhiko Miyasaka et al. 2013).

Les OR de poisson-zèbre ont été identifiés en fonction de leur similarité avec les OR de mammifères (Buck et Axel 1991) et ceux des poissons-chats (Ngal 1993), par amplification PCR puis séquençage d'ADN. En analysant la répartition spatiale des OR par hybridation *in situ*, on observe que les neurones exprimant le même OR sont assez dispersés dans l'OE, c'est-à-dire séparés les uns des autres par d'autres cellules/neurones de l'OE. Les neurones exprimant des OR différents occupent tout de même des zones distinctes mais qui se chevauchent (Barth, Justice, et Ngai 1996; Shao et al. 2017; Weth, Nadler, et Korsching 1996; Argo, Weth, et Korsching 2003).

Les études faites par hybridation *in situ* montrent que les premier OR à s'exprimer apparaissent entre 24 et 30 hpf. L'expression des OR augmente considérablement entre 36 et 48 hpf et on observe que différents OR peuvent être activés à différents moments du développement, démontrant une asynchronie dans l'expression des OR dans l'OE (Barth, Justice, et Ngai 1996). Ces résultats ont été confirmés par Argo et al. 2003, dans une étude qui a décrit deux vagues d'expression d'OR, la première s'exprimant pendant que les

premiers OSN projettent leur axone dans l'OB, la seconde s'exprimant après l'éclosion des poissons-zèbres (Barth, Justice, et Ngai 1996; Argo, Weth, et Korsching 2003).

Les mécanismes régulant le choix d'un OR à exprimer par chaque OSN ne sont pas encore précisément éclaircis. Dans une construction BAC comprenant un transgène avec 16 gènes d'OR, Sato et al. (2007) ont remplacé les séquences codantes des OR111-7 et OR103-1 par des rapporteurs fluorescents et ont ensuite analysé l'OR exprimé par les OSN fluorescents. Les OR exprimés appartiennent à la même famille que les séquences codantes tronquées donc OR111 ou OR103 (Y. Sato, Miyasaka, et Yoshihara 2007). Le modèle actuel de choix d'OR par chaque OSN, largement inspiré du modèle établi chez la souris, est décrit ci-dessous. Il suit plusieurs étapes : (1) une étape déterministe qui donne aux OSN la compétence d'exprimer une famille d'OR, (2) une étape stochastique de choix de l'OR final au sein de cette famille (Argo, Weth, et Korsching 2003; Y. Sato, Miyasaka, et Yoshihara 2007) et (3) une inhibition autonome cellulaire, exercée par l'OR choisi, de l'expression des autres OR, permettant à un neurone d'assurer une expression monogénique de l'OR choisi (Nobuhiko Miyasaka et al. 2013).

II.2.3.b Des protoglomerules aux glomerules

Les premières projections semblent s'établir dans l'OB aux alentours de 48 hpf, et à ce stade les axones se ségrègent dans des régions appelées protoglomerules (Hansen et Zeiske 1993; Dynes et Ngai 1998; Kathleen E. Whitlock et Westerfield 1998), qui sont les cibles initiales et intermédiaire des axones des OSN dans l'OB (Fig.32) (Liy 2005; Shao et al. 2017). Les protoglomerules se remodelent à des stades plus tardifs et se subdivisent alors en glomerules matures, qui correspondent aux neuropiles dans lesquels les axones des OSN exprimant un même OR convergent, chaque glomerule ne comprenant *in fine* que des axones d'OSN exprimant le même OR. Ces neuropiles sont acellulaires et peuvent être visualisés en "négatif" en marquant toutes les cellules ou noyaux de l'embryon avec des colorants fluorescents comme le BODIPY (Dynes et Ngai 1998) ou l'iodure de propidium (Lakhina et al. 2012). Les protoglomerules et leur remodelage ont été cartographiés grâce à un marquage antérograde des axones des OSN avec du DiA à différents stades de développement. A 72 hpf (3 jours), les protoglomerules de l'OB sont moins nombreux que les glomerules chez l'adulte, mais ils forment néanmoins une carte protoglomerulaire stéréotypée (Fig. 32). Jusqu'à 144 hpf (6 jours), les glomerules augmentent en nombre et en taille pour former la carte glomerulaire mature (Liy 2005).

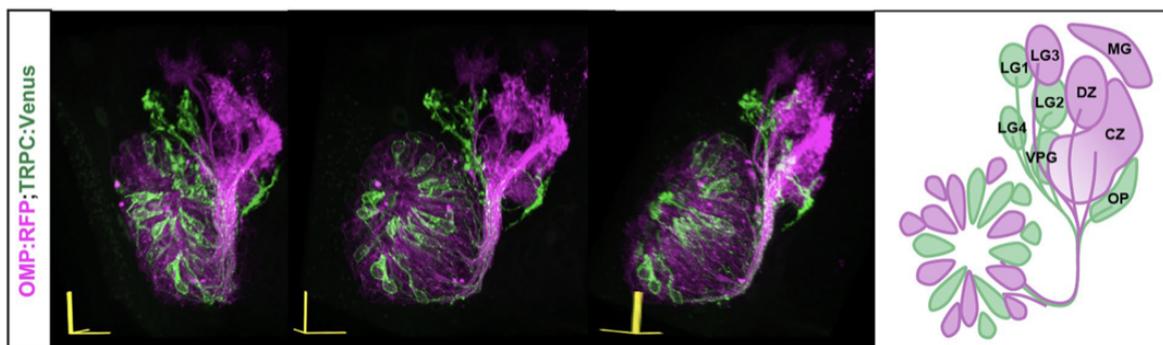


Figure 32 : Projections des OSN ciliés et des OSN à microvillosités à 72 hpf dans les protoglomérules (tirée de Cheng et al. 2022). Les OSN ciliés sont marqués par *omp:rfp* (magenta) et ceux à microvillosités par *trpc2:Venus* (vert). Les axones OMP positifs projettent dans la zone dorsale (DZ), la CZ, le LG3 et les glomérules médians (MG). Les OSN TRPC2 projettent dans le plexus olfactif, les LG1, 2, 4 et le glomérule ventro-postérieur (VPG), *op*; *plexus olfactif*.

Plusieurs équipes ont généré des lignées transgéniques permettant de visualiser des OSN exprimant différents OR tel que *tg(OR111-7:IRES:GAL4)*, *tg(BACor111-7:IRES:Gal4)* ou *tg(BACor130-1:IRES:Gal4)* (Tableau 1) (Lakhina et al. 2012; Shao et al. 2017; Dang et al. 2023). Les OSN exprimant OR111-7 et plus généralement la famille OR111 projettent dans les protoglomérules de la CZ et parfois dans ceux du LG1, les OSN qui expriment l'OR130-1 projettent dans les protoglomérules de la zone dorsale (DZ) (Lakhina et al. 2012; Shao et al. 2017; Dang et al. 2023). Ces résultats montrent que les OSN exprimant un OR particulier innervent un protoglomérule défini mais aussi que les OSN exprimant des OR de la même famille projettent aussi vers les mêmes protoglomérules (Shao et al. 2017). Une étude plus récente suggère qu'en fonction de la classe d'OR exprimée par les OSN, ces derniers vont exprimer différents facteurs de transcription et molécules de guidage qui participent à l'innervation spécifique des protoglomérules (Dang et al. 2018).

L'arrangement spatial des glomérules de l'OB chez le poisson-zèbre adulte a été observé pour la première fois en 1994 par Baier et Korsching qui ont marqué les OSN de manière antérograde avec du DiI injecté dans la cavité nasale. Ils ont observé que l'organisation glomérulaire de l'OB est similaire entre les individus et que l'organisation de l'OB est stéréotypée (Baier et Korsching 1994). Chez l'adulte, il y a environ 140 glomérules (Oliver R. Braubach, Fine, et Croll 2012). L'OB est organisé comme suit : la région glomérulaire

dorsale, les glomérules dorso-latéraux, six glomérules dorso-médians, les glomérules ventro-médians et ventro-antérieurs, le glomérule médio-antérieur, une paire de glomérules ventro-postérieurs et les glomérules latéraux (Baier et Korsching 1994; O. R. Braubach et al. 2013).

Grâce à des marquages DiI et BODIPY, Dynes & Ngai (1998) ont confirmé que l'organisation glomérulaire de l'OB est symétrique et stéréotypée dès 84 hpf (3.5 jours). A ce stade, les glomérules sont ségrégués dans neuf petites zones (latérales, médianes, ventrale postérieure), deux grandes (dorsale et centrale) et dans le plexus olfactif, qui correspond à une région transitoire comportant une densité importante d'axones entremêlés sans toutefois présenter de structure interne typique de protoglomérule (Dynes et Ngai 1998).

L'innervation de l'OB par les différentes populations d'OSN (ciliés ou à microvillosités) est également stéréotypée. En effet, en couplant les marquages à l'iodure de propidium à l'utilisation des lignées *tg(omp:rfp)* et *tg(trpc2:Venus)*, on observe qu'à 72 hpf, les OSN ciliés projettent majoritairement vers les protoglomérules des zones centrale, dorsale, médiane et du LG3 (Y. Sato 2005; Shao et al. 2017; R. P. Cheng et al. 2022) alors que les axones des neurones à microvillosités ciblent les LG1, 2, 4, le glomérule ventro-postérieur et le plexus olfactif (Fig.32) (Y. Sato 2005; R. P. Cheng et al. 2022).

Les auteurs de l'article de Cheng 2022 ont fait les mêmes observations par imagerie *live* sur des embryons *tg(omp:rfp); tg(trpc2:Venus)*, ils remarquent également que cette ségrégation se fait assez tôt au cours du développement, puisque les OSN ciliés innervent leurs protoglomérules autour de 36 hpf tandis que les OSN à microvillosités innervent leurs zones cibles entre 36 et 38 hpf. Ces derniers vont étendre et rétracter leurs axones de manière dynamique avant d'innervent leurs protoglomérules (R. P. Cheng et al. 2022).

III Les objectifs de la thèse

La Laminine est l'un des composants majeurs de la MEC et des membranes basales. Il s'agit d'une famille de protéines hétérotrimériques composées d'une sous-unité α , une sous-unité β et une sous-unité γ qui s'associent entre elles pour former des réseaux, une fois sécrétées en dehors des cellules qui les produisent. Les Laminines sont les premières protéines de la MEC à se mettre en place et sont essentielles à la formation des membranes basales, une couche de MEC localisée du côté basal des épithéliums. Elles interagissent avec le Nidogène et le Collagène IV notamment, ainsi qu'avec d'autres composants de la MEC, mais également avec des récepteurs présents à la surface des cellules, tels que les Intégrines ou le Dystroglycan. Ce réseau d'interactions complexes permet de remplir de nombreux rôles structuraux, biomécaniques et signalétiques lors du développement des animaux, et tout au long de leur vie. Si de nombreux rôles des protéines de la MEC ont été élucidés, les fonctions de ces protéines et des membranes basales sont loin d'être pleinement comprises, probablement à cause de la difficulté de les explorer *in vivo*. En effet, les études de perte de fonction des constituants de la MEC mènent généralement à une létalité embryonnaire.

Lors de mon doctorat, je me suis concentrée sur l'étude des fonctions de Laminine et des membranes basales dont elle est une composante majeure. La première isoforme de la Laminine à apparaître dans l'embryon est l'isoforme 111, qui est la forme prédominante lors du développement. Dans mon modèle d'étude, le poisson-zèbre, il existe des mutants pour chacune des chaînes de cette isoforme, notamment le mutant sly^{wi390} (sly), muté pour la chaîne $\gamma 1$ qui est présente dans de nombreuses isoformes. Les embryons sly homozygotes mutants se développent jusqu'à 48 hpf car la sous-unité $\gamma 1$ est exprimée maternellement jusqu'à 12 hpf. Cela m'a permis d'explorer *in vivo* de nouvelles fonctions de la Laminine et des membranes basales.

J'ai analysé dans ce mutant le développement du système olfactif, qui implique des mouvements cellulaires menant à la morphogenèse de l'OP ainsi que la navigation des axones des neurones olfactifs de l'OP vers l'OB tandis que la tête de l'embryon subit un mouvement général de flexure (la flexure céphalique), provoquant des mouvements de tous les tissus antérieurs.

Comment la Laminine participe-t-elle à la morphogenèse de l'OP ? A sa maintenance lors du mouvement de flexure ? La Laminine a-t-elle par ailleurs un rôle dans la croissance et la navigation des axones olfactifs vers l'OB ?

Afin de répondre à ces questions, ma thèse s'organise de la façon suivante en vue de répondre à 4 objectifs principaux :

Objectif 1) Caractériser le profil d'expression des principaux composants des membranes basales dans le système olfactif du poisson-zèbre en développement, et déterminer si l'intégrité de ces membranes basales est assurée chez le mutant *sly*.

Tout d'abord, nous avons cherché à mettre en évidence le patron d'expression de trois composants essentiels des membranes basales, la Laminine 111, le Collagène IV et le Nidogène, via des expériences d'immunohistochimie ainsi que d'imagerie *live* réalisées sur des embryons contrôles et mutants pour la Laminine $\gamma 1$. Nous avons également analysé l'intégrité des membranes basales chez les embryons mutants en comparaison avec les contrôles.

Objectif 2) Déterminer le rôle de la Laminine $\gamma 1$ dans la morphogenèse de l'OP et le maintien de sa forme au cours du développement.

Nous avons réalisé pour cela des mesures quantitatives de la taille de l'OP à plusieurs stades de développement sur des embryons contrôles et mutants, puis nous avons analysé par imagerie *live* la mise en place de l'OP aux stades de coalescence ainsi que pendant la flexure céphalique, dans les deux contextes contrôles et mutants. Cela nous a permis de mettre en évidence un potentiel rôle de la Laminine et des membranes basales dépendantes de la Laminine dans la mise en place de l'OP mais aussi dans sa maintenance au cours du développement, et dans la mise en place d'une frontière nette entre OP et cerveau.

Objectif 3) Examiner le rôle de la Laminine $\gamma 1$ dans le guidage des axones olfactifs lors de leur navigation vers l'OB.

Afin d'étudier le rôle de la Laminine dans la navigation des axones olfactifs de l'OP vers l'OB au cours du développement, nous avons tout d'abord réalisé des analyses quantitatives

des faisceaux d'axones, à plusieurs stades, en conditions contrôles et mutantes. Ensuite, grâce à des films réalisés chez des embryons exprimant des marqueurs de manière mosaïque dans les neurones olfactifs, nous avons pu analyser le comportement dynamique et la navigation des axones olfactifs en présence et en absence de Laminine $\gamma 1$.

Objectif 4) Étudier les potentiels mécanismes moléculaires grâce auxquels la Laminine exerce ses fonctions dans le système olfactif en développement.

Afin d'appréhender les mécanismes par lesquels la Laminine et/ou les membranes basales jouent un rôle dans le développement du système olfactif, nous avons commencé à tester les candidats suivants. (i) Le Collagène IV, constituant majeur de la membrane basale, voit sa distribution très perturbée chez le mutant *sly* du fait des altérations de la membrane basale secondaires à l'absence de Laminine. Cependant, des amas fibreux de Collagène IV sont toujours présents chez le mutant *sly* à proximité des quelques axones qui parviennent à sortir de l'OP, suggérant un rôle du Collagène IV dans la croissance de ces axones. Nous avons examiné les effets de sa perte de fonction réalisée par la technique de CRISPR/Cas9, chez des embryons contrôles et mutants *sly*. (ii) Les Intégrines sont des récepteurs majeurs de la Laminine. Nous avons commencé à caractériser les effets de constructions dominantes négatives ou constitutivement actives de certains effecteurs intracellulaires ((kinase FAK - *Focal Adhesion Kinase*) et RhoGTPases) des Intégrines, afin d'évaluer leur éventuelle implication dans les phénotypes du mutant *sly*.

Résultats

Mes résultats sont organisés en deux parties :

Tout d'abord, je présenterai le manuscrit de l'article scientifique que nous allons soumettre très prochainement pour publication dans un journal international à comité de lecture. Dans cet article, nous présentons tout d'abord la distribution de la Laminine dans le système olfactif du poisson-zèbre ainsi que les perturbations des membranes basales induites par l'absence de la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine chez le mutant *sly*. Ensuite, nous examinons les défauts de développement du système olfactif observés chez le mutant *sly* durant la coalescence de l'OP, le mouvement de flexure du cerveau et le développement des axones olfactifs. L'ensemble de ces défauts nous permet d'identifier les fonctions de la Laminine, et/ou des membranes basales entourant la placode olfactive et le cerveau, dans les processus de morphogenèse de la placode olfactive et de guidage des axones sensoriels olfactifs vers le bulbe olfactif.

Dans la seconde partie, je présenterai mes résultats complémentaires visant à identifier les mécanismes par lesquels la Laminine exerce ces nouvelles fonctions. Je présenterai d'abord les approches que j'ai développées pour étudier le rôle potentiel du Collagène IV, puis des Intégrines. Je terminerai par une tentative de sauvetage du phénotype mutant *sly* réalisé grâce à une lignée transgénique exprimant la Laminine $\gamma 1$.

I Article Scientifique

Laminin γ 1-dependent basement membranes maintain olfactory placode shape and position, and allow proper olfactory axon development

Tignard P¹, Pottin K¹, Geeverding A², Eschstruth A¹, Doulazmi M³, Cabrera M¹, Fouquet C⁴, Trembleau A^{4,*}, Breau MA^{1,5,*}.

¹Sorbonne Université, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Developmental Biology Laboratory, Paris, France

²Imaging Facility, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS)

³Sorbonne Université, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UMR8256), Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), Adaptation Biologique et Vieillessement, Paris, France.

⁴Sorbonne Université, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UMR8246), Inserm U1130, Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), Neurosciences Paris Seine (NPS), Paris, France.

⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)

*Co-last authors and co-corresponding authors:

Marie Anne Breau (marie.breau@sorbonne-universite.fr) and Alain Trembleau (alain.trembleau@sorbonne-universite.fr)

Abstract

Despite recent progress, the complex roles played by the extracellular matrix (ECM) in development and disease are still far from being fully understood. Mutations of ECM components often result in embryonic lethal phenotypes preventing the analysis of their *in vivo* functions at later stages. Here, we took advantage of the zebrafish *sly* mutation which affects Laminin γ 1, a major component of basement membranes. Maternal expression of the γ 1 chain allows *sly* mutants to survive up to two days, thus providing an *in vivo* setting to study late and potentially new functions of this ECM component. We focused on the role of Laminin γ 1 in the development of the zebrafish olfactory system, involving the growth of the axons from the sensory placode to the olfactory bulb and concomitant morphogenetic movements occurring in the placode and the adjacent brain. Using a combination of immunochemistry, electron microscopy and quantitative live imaging of cell movements and axonal behaviours, we analysed basement membrane integrity, olfactory placode and brain morphogenesis, and the development of the olfactory axons in *sly* mutants. Our results point to an original contribution of Laminin-dependent basement membranes in organising the border between the brain and the olfactory placode: they are essential to maintain placode morphology and position during the forebrain flexure and to establish a robust physical barrier between the two tissues, yet they allow the entry of the sensory axons in the brain and their navigation towards the olfactory bulb.

Introduction

The extracellular matrix (ECM) is a network of glycoproteins which provides support to tissues by contributing to mechanical and chemical signals regulating their biology. It regulates multiple processes, including cell migration, survival/proliferation, differentiation and polarity ((Walma and Yamada, 2020). In addition to the fundamental role of ECM in development and homeostasis, mutations in matrix genes lead to a variety of genetic disorders, and abnormal ECM remodelling drives disease progression in fibrosis, neurological disorders and cancer (Karamanos et al., 2021; Soleman et al., 2013; Theocharis et al., 2019; Yamada et al., 2022). ECM components are also critical factors in tissue engineering and regenerative medicine (Kaur et al., 2021; Kim et al., 2021), and thus represent valuable targets but also key players in a plethora of therapeutic applications.

The ECM can influence development and disease in many ways and, despite recent advances, the full complexity of ECM functions is far from being understood. This partly comes from the lack of tools to investigate ECM roles *in vivo*. Indeed, loss-of-function of ECM components often leads to embryonic lethal phenotypes showing their early requirement, for instance during implantation and gastrulation in mice (see for example Miner and Yurchenco, 2004), but precluding the analysis of ECM functions at later stages of development.

Laminins are major components of the basement membrane (BM), a layer of ECM lying on the basal side of all epithelia, which is essential for their development and homeostasis. Laminins are crucial to initiate BM assembly through self-polymerisation on cell surfaces (Huang et al., 2003; Urbano et al., 2009, reviewed in Miner and Yurchenco, 2004). Laminins are $\alpha/\beta/\gamma$ heterotrimers, with Laminin 111 believed to be the predominant isoform during early development (Miner and Yurchenco, 2004). The zebrafish *sly*^{wi390} (*sly/lamc1*) mutation (Wiellette et al., 2004) affects Laminin γ 1, present in 10 out of 18 isoforms. *sly* homozygous mutants exhibit defects in notochord, blood vessel and somite morphogenesis (Dolez et al., 2011; Odenthal et al., 1996; Parsons et al., 2002; Pollard et al., 2006; Stemple et al., 1996). Maternal or residual expression of the γ 1 chain until around 12 hpf (hours-post-fertilisation) (Dolez et al., 2011; Parsons et al., 2002) likely allows *sly* mutants to develop until 48-72 hpf, thus providing an *in vivo* setting to examine later and potentially new functions of this ECM component.

In this study, we took advantage of the *sly* mutant to investigate the role of Laminin γ 1 in the development of the zebrafish olfactory system. This neuronal circuit forms through the growth of the axons from the olfactory placode to the olfactory bulb in the brain (Miyasaka et al., 2007) in the context of morphogenetic movements shaping the placode and nearby tissues (Aguillon et al., 2020; Breau et al., 2017; Hauptmann and Gerster, 2000; Monnot et al., 2021; Ross et al., 1992). It is known that Laminin-rich BMs surround the developing olfactory placodes (OPs) and adjacent brain (Torres-Paz and Whitlock, 2014; Torres-Paz et al., 2021), yet their function in the construction of the olfactory system remains uncharacterised.

Laminin stimulates neurite outgrowth for many types of neurons *in vitro* (reviewed in Powell and Kleinman, 1997). *In vivo*, in the developing nervous system, Laminin is important for neuroepithelial morphogenesis (Bryan et al., 2016; Ivanovitch et al., 2013; Sidhaye and Norden, 2017; Tsuda et al., 2010), for neuronal migration and the prevention of ectopic neuronal migration (Belvindrah et al., 2007; Chen et al., 2009; Grant and Moens, 2010; Sittaramane et al., 2009), as well as for multiple aspects of axonal development including the orientation of axon emergence (Moore et al., 2022; Randlett et al., 2011; Wolman et al., 2008), and axon growth and pathfinding (Bonner and O'Connor, 2001; Chen et al., 2009; García-Alonso et al., 1996; Karlstrom et al., 1996; Paulus and Halloran, 2006).

Here, we provide a detailed description of Laminin expression during the construction of the olfactory system, in both fixed and live zebrafish embryos. We then use the zebrafish *sly* mutant, combined with live imaging to quantify cell/tissue movements and visualise axon behaviours, to investigate Laminin functions in neuronal tissue morphogenesis and axon development *in vivo*. We found that Laminin γ 1-dependent BMs are instrumental to maintain OP shape and position, brain/placode boundary, and to allow proper growth and pathfinding of the axons towards the olfactory bulb.

Results

The developing OP and brain tissues are surrounded by Laminin-containing BMs

We first analysed Laminin distribution during the early morphogenesis of the OPs. Between 14 and 22 hpf, cell movements transform the initial elongated OP domains into two rounded placodal structures on each side of the brain (Whitlock and Westerfield, 2000), in a process referred to as OP coalescence. This occurs through two types of movements: first, cell bodies from the anteroposterior extremities of the OP domain converge towards the OP centre. OP cell bodies then move laterally, away from the brain, while their trailing axons remain attached to the brain and grow through retrograde extension (Aguillon et al., 2020; Breau et al., 2017; Monnot et al., 2022). During OP coalescence, cells in the adjacent brain undergo a directional anterior movement (Breau et al., 2017; Monnot et al., 2022). To analyse Laminin expression at these stages, we performed immunostainings with a Laminin 111 polyclonal antibody on *Tg(neurog1:GFP)* embryos (Blader et al., 2003), in which the early-born OP neurons and a subpopulation of forebrain cells are labelled with GFP (Aguillon et al., 2020; Breau et al., 2017; Madelaine et al., 2011). Consistent with previous observations (Torres-Paz and Whitlock, 2014; Torres-Paz et al., 2021), we first noticed the appearance of a continuous Laminin-rich BM structure surrounding the brain from 14-18 hpf, while around the OP, only discrete Laminin patches or spots were detected at this stage (Fig. 1A, A'). By contrast, at the end of the coalescence process (22 hpf), two distinct BMs were clearly visible around the brain and the OP (Fig. 1B, B'), suggesting that the Laminin-rich BM of the OP assembles between 18 and 22 hpf, during the late phase of OP coalescence.

To further analyse the dynamics of Laminin $\gamma 1$ expression and of BM assembly at OP coalescence stages, we took advantage of the *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP)* line, in which Laminin $\gamma 1$ is tagged with superfolder GFP and expressed under the control of its own promoter (Yamaguchi et al., 2022). To co-label OP cells with a red fluorescent protein, we used the *Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* line (Breau et al., 2013), which expresses RFP in OP cells and in peridermal skin cells from around 16 hpf. The expression is initially weak and mosaic (Fig. 1E) and becomes progressively stronger and widespread in the OP (Fig. 1F). Using confocal live imaging on *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP); Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* embryos (n = 4 imaged embryos, 2 independent experiments), we confirmed the progressive BM-like accumulation of LamC1-sfGFP around the OP during the coalescence, with a gradual increase of the BM fluorescence over time (Fig. 1E-F' and Movie 1). From 14 hpf, mesenchymal cells exhibiting cytoplasmic Laminin-sfGFP were seen to migrate anteriorly close to or around the OP (Movie 1). According to the literature, these cells could represent

migrating basal skin cells (Bakkers et al., 2002; O'Brien et al., 2012), neural crest cells (Bryan et al., 2020; Harden et al., 2012; Torres-Paz and Whitlock, 2014), and/or mesodermally-derived cells of the periocular mesenchyme (Vöcking et al., 2023). A subset of RFP+ OP cells also displayed cytoplasmic Laminin-sfGFP signal, which became very strong by the end of coalescence, sometimes in the form of intracellular vesicles (Fig. 1E-H' and Movie 1). Altogether, these live imaging experiments suggest that Laminin γ 1 around the OP is deposited mostly during late coalescence stages, from at least a subset of OP cells and surrounding mesenchymal cells. Telencephalic cells also exhibited cytoplasmic Laminin-sfGFP expression throughout OP coalescence (Movie 1), suggesting that the forebrain contributes to the deposition of its own Laminin γ 1-containing BM at these stages.

To analyse whether the BMs of the brain and OP tissues are maintained at later stages, we used Laminin 111 immunostaining on *Tg(omp:meYFP)* embryos, in which a subpopulation of olfactory placode neurons is labelled from 22-24 hpf (Miyasaka et al., 2005; Miyasaka et al., 2007; Sato et al., 2005; Sato et al., 2007), and confocal live imaging on *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP); Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* transgenic embryos. Using both approaches we observed, again at these stages, a strong, continuous BM-like signal enveloping the brain and the OP, except (i) where the olfactory axons leave the OP and enter the brain (defined respectively as the exit and entry points, see below) and, as we previously reported (Baraban et al., 2023), (ii) above of the rosette structure assembling in the dorsolateral region of the OP, at the interface with the skin, where the nostril orifice opens around 30 hpf (Fig. 1C-D', 1G-J). Thus, the OP and adjacent brain tissues are ensheathed by Laminin-containing BMs from early stages of olfactory system assembly (as depicted in Fig. 1K), suggesting these BMs could play a role in their morphogenesis or in the maintenance of their shape during development.

Laminin distribution suggests a role in olfactory axon development

It has been proposed that the zebrafish OP contains a transient population of unipolar, dendrite-less pioneer neurons located in the ventral and medial region of the OP: their axons are the first to grow out of the OP at 22-24 hpf, and ablation experiments suggested that they could act as a scaffold for the growth of the axons of the later born olfactory sensory neurons (OSNs), located in the dorso-lateral rosette (Whitlock and Westerfield, 1998). To investigate the distribution of Laminin in relation with axonal development in the olfactory system, we used the *Tg(omp:meYFP)* line in which membrane-targeted YFP allows to visualise olfactory axons, including pioneer axons and axons from the ciliated OSNs (Miyasaka et al., 2005; Miyasaka et al., 2005; Miyasaka et al., 2007). Previous time-course

studies using this transgenic line showed that following OP coalescence, the YFP+ axons leave the OP from 22-24 hpf through a restricted region (the exit point) in the ventro-medial OP, grow dorsally as a fasciculated bundle until around 32 hpf, then start defasciculating in the presumptive olfactory bulb region in the brain (Miyasaka et al., 2005; Miyasaka et al., 2005; Miyasaka et al., 2007; Sato et al., 2007). Immunostaining for Laminin 111 revealed local disruptions in the BMs ensheathing the OP and the brain, precisely where the YFP+ olfactory axons exit the OP (exit point) and enter the brain (entry point) (Fig. 1C-D'). Once into the brain, from around 28 hpf, the most distal/dorsal extremity of the YFP+ olfactory axon bundle was systematically in close contact with the Laminin-labelled BM of the brain (while the shafts of the bundled axons were usually not touching the BM) (Fig. 1C-D'), suggesting that the axonal growth cones use it as a substrate to migrate towards the olfactory bulb.

To better understand when and how the gaps of the exit and entry points form in the BMs, we took advantage of our live imaging experiments performed on *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP); Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* embryos. By the end of the coalescence, during the late phases of assembly of the Laminin-sfGFP-containing BM around the OP, we noticed that small interruptions of the BM were already present near the axon tips, along the ventral and medial wall of the OP (Movie 2). This suggests that the exit point does not open through local perforation of a pre-existing BM around the OP, but rather through incomplete BM synthesis or assembly in this specific area. The entry point was slightly more dorsal than the exit point (of about 10-20 μm), and the initial dorsal growth of the axons thus occurred between the two BMs (Fig. 1F-H'). The opening of the entry point through the brain BM was concomitant with the arrival of the RFP+ axons, suggesting that the axons degrade or displace BM components to allow for their entry in the brain (Fig. 1G-H' and Movie 2). Once in the brain, as observed in fixed embryos, the tip of the RFP+ axons migrated in close proximity with the brain BM (Fig. 1H, I). Overall our observations indicate that the olfactory axons first grow dorsally for a short distance in between the BMs of the OP and the brain, and then migrate along the internal side of the brain's BM (Fig. 1K). We thus hypothesise that the Laminin-rich BMs serve as a migratory path for the axons during their journey from the OP to the olfactory bulb.

The integrity of BMs around the brain and the OP is affected in the *sly* mutant

We used the *sly* mutant to analyse the function of Laminin $\gamma 1$ in the development of the zebrafish olfactory system. As previously observed (Dolez et al., 2011; Parsons et al., 2002; Stemple et al., 1996; Wiellette et al., 2004), Laminin 111 immunoreactivity could not be

detected in homozygous *sly* mutants (referred to as *sly* mutants) at all the analysed stages, from 16 to 36 hpf, while heterozygous *sly*^{+/-} embryos displayed an expression pattern that was similar to *+/+* embryos (Fig. 2A-C'). This indicates that the γ 1 chain is required for the assembly of Laminin 111, and that there is likely no residual/maternal Laminin expression at the onset of OP coalescence. Since Laminins are essential for BM assembly in other contexts (Lee and Gross, 2007; Li et al., 2005; Miner and Yurchenco, 2004; Smyth et al., 1999; Urbano et al., 2009), we further checked whether the BMs surrounding the OP and the brain are still present and correctly structured in *sly* mutants. We carried out immunostaining for two other BM components, Collagen IV and Nidogen, at 22, 28 and 36 hpf. Nidogen was present in BM-like structures around the OP and the brain in control siblings, with a pattern resembling that of Laminin 111, while in *sly* mutants no staining could be detected around the two tissues (Fig. 2D-F'). In controls, Collagen IV was present in the linear BMs around the OP and the brain, and, with a more fibrous/interstitial distribution, in the mesenchymal tissues surrounding the OP. In *sly* mutants, Collagen IV immunoreactivity was not totally abolished: the BM-like staining was absent, but some patches of fibrous expression remained around the OP, at various locations (Fig. 2G-I').

We next used electron microscopy to analyse the ultrastructure of BMs in *sly* mutants and control siblings at 24 and 32 hpf. We focused on areas located at the interface between the forebrain and the OP, where NCC are known to migrate from OP coalescence stages (Bryan et al., 2020). OP cells, brain cells and NCC could be identified by their position and morphology: presumptive migrating NCC showed an elongated morphology along the anteroposterior axis, which clearly differed from the round shape of OP cell bodies and from brain neuroepithelial cells elongated along the mediolateral axis (Fig. 1L, L'). At 24 hpf in controls, the plasma membranes of NCC were separated from those of adjacent OP and brain cells by a 120 nm-wide gap containing electron dense, ECM material likely representing the BMs of the two tissues. In *sly* mutants, almost no NCC could be detected, suggesting that NCC migration is affected by the absence of Laminin γ 1 or of BMs around the OP and/or the brain. In this mutant context, the plasma membranes of OP and brain cells were separated by a 40 nm-wide gap, which was significantly smaller than in controls. This gap was most often devoid of electron dense material (Fig. 2J, J', M). A similar trend was detected at 32 hpf (Fig 2K, K', N). By contrast, the thickness of the gaps separating cell membranes within the OP tissue, or within the brain tissue, was unchanged in mutants as compared with controls (Fig. S1). Altogether, these results show that the integrity of the BMs is strongly affected in the absence of Laminin γ 1 in *sly* mutants. We next analysed the consequences on the development of the olfactory system components (placode, brain, olfactory axons).

Role of Laminin γ 1-dependent BMs in OP coalescence

Does the Laminin γ 1-containing BM assembling around the OP play a role in the coalescence process? To answer this question, we first measured the dimensions of the *Tg(neurog1:GFP)*+ OP cell clusters at 22 hpf (end of coalescence) on fixed *sly* mutants and control siblings. The mediolateral (ML) dimension of the OP was slightly increased in mutants, while no difference was found for anteroposterior (AP) and dorsoventral (DV) dimensions of the OP (Fig. 3A-E). The higher ML dimension could be the consequence of an increase in the number of GFP+ cells, however immunostainings revealed no difference in the number of Phospho-Histone H3-positive cells in the OPs of *sly* mutants and control siblings at 16 and 21 hpf (Fig. S2A, B, E, F), and, as previously reported in other tissues (Parsons et al., 2002), a tendency for the *sly* mutants to exhibit increased apoptosis, shown with Activated Caspase 3 staining (Fig. S2I, J, M, N). The higher ML dimension could also be due to increased lateral movements of OP cell bodies in the absence of the BM surrounding the OP. To test this hypothesis, we performed live-imaging on *sly* mutants and control siblings carrying the *Tg(neurog1:GFP)* transgene, mounted in a dorsal view (n = 5 mutants and n = 5 controls). Individual nuclei of GFP+ OP and brain cells were tracked using widespread expression of H2B-RFP, obtained through mRNA injection (Fig. 3F-I and Movie 3). From the cell trajectories we extracted the 3D Mean Square Displacements (MSD), a measure of the volume explored by a cell in a given period of time. No significant difference was observed for the MSD of OP cells between controls and *sly* mutants, but the MSD was higher for brain cells in the mutants (Fig. 3J, K). Direction wise, surprisingly OP cells did not show any change in their total ML displacement (Fig. 3L), nor in their DV displacement (Fig. 3M). Differences, although not statistically significant, could be detected along the AP axis for anterior, central and posterior OP cells (defined as in Breau et al., 2017): in the mutants the anterior cohort of cells tend to migrate less posteriorly, while central and posterior cells migrated more anteriorly, as if the final cell positions were all shifted towards more anterior locations (Fig. 3N-P). In conclusion, while brain cells move faster in the absence of BM at coalescence stages, overall the OP cell movements occur with normal parameters and allow the condensation of OPs into compact neuronal clusters in the *sly* mutants. It is possible however that the position of the OP along the AP axis is changed and shifted anteriorly at the end of OP coalescence.

Role of Laminin γ 1-dependent BMs during the forebrain flexure

Following OP coalescence, the forebrain flexure, a major morphogenetic process which is essential for the final folded shape of the vertebrate brain, starts to remodel the head tissues

(Chapman et al., 2005; Garcia et al., 2017; Hauptmann and Gerster, 2000; Tropepe and Sive, 2003). In zebrafish the bending of the forebrain, which displaces the anterior brain ventrally through the formation of a fold in the brain floor, has been previously reported to occur between 24 and 48 hpf, through the observation, on fixed samples, of changes in brain morphology (Ross et al., 1992) or in the position of patterning gene expression domains (Hauptmann and Gerster, 2000). When this morphogenetic remodelling takes place, the brain and OP tissues are enveloped by Laminin γ 1-containing BMs, as described above (Fig. 1C-D' and F-I). We set out to investigate the role of these BMs during the forebrain flexure. The *Tg(omp:meYFP)* transgene expression was used to quantify the dimensions of the YFP+ cluster in the OP at various stages of the flexure (24, 28, 32 and 36 hpf), in *sly* mutants and control siblings. While no change could be detected in the AP and ML dimensions of the YFP+ cluster, its DV dimension was significantly increased at all the analysed stages (Fig. 4A-E and Fig. S3A-L). This higher DV dimension is unlikely to result from an increase in the number of cells, since YFP+ dividing cells were not more numerous in *sly* mutants (Fig. S2C, D, G, H), and YFP+ OP clusters displayed increased apoptosis, as observed at earlier stages (Fig. S2K, L, O, P). In addition to the DV elongation of the OP tissue, isolated, ectopic (mispositioned) YFP+ cells were observed all around the YFP+ cluster in the *sly* mutants (Fig. 4F-H).

To better understand the origin of these phenotypes, we analysed the dynamic behaviour of brain and OP cells occurring during the forebrain flexure. To do so, we carried out live imaging from 22 to 40 hpf on *Tg(omp:meYFP)* *sly* mutants and control siblings injected with H2B-RFP mRNA to label all nuclei, and tracked individual YFP+ OP cells and adjacent brain cells ($n = 4$ mutants and $n = 4$ controls) (Fig. 4I-L and Movie 4). From 24-26 hpf we observed a marked anterior and ventral departure of brain cells in both control and *sly* mutant embryos, representing the onset of the flexure movement. Strikingly, OP cells also moved anteriorly and ventrally from these stages, in coordination with the brain (Fig. 4J, L). MSD analysis revealed that OP cells move with a higher MSD in *sly* mutants than in controls. A similar trend was observed for brain cells, but is not statistically significant (Fig 4M, N). Moreover, upon visualisation of the cell trajectories in a lateral (YZ) view, we noticed that in 4/4 mutant embryos, brain and OP cells exhibited curved trajectories, moving first anteriorly and ventrally, then turning posteriorly, while this phenomenon occurred only in 1/4 control sibling during the duration of our movies (Fig. S3M, N). This reinforces the idea that brain and OP cells are subjected to an accelerated or enhanced forebrain flexure remodelling in the *sly* mutants, and suggests that in the wild type situation the BMs allow the tissues, and in particular the OP, to resist to the morphogenetic movements associated with the flexure. Altogether, our findings show that the Laminin γ 1-containing BMs are required to prevent OP

cell scattering, dampen OP cell movements and maintain OP shape during the forebrain flexure.

Laminin γ 1-dependent BMs are required to define a robust boundary between the OP and the brain during the forebrain flexure

OP cells undergo anterior and ventral movements during the forebrain flexure. We noticed that, while in control siblings OP cells also display a laterally-oriented displacement, they rather move in the medial direction in *sly* mutants, towards the brain, as if the two OPs were progressively converging towards each other (Fig. 4J, L, O, P). This prompted us to image OP and brain tissues in 3D to visualise the boundary between the two tissues and analyse the width of the brain. To do so, we first performed immunostainings at 28 and 36 hpf for the pan-neuronal marker HuC to visualise neurons in the OP and brain on *Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* embryos, in which RFP is expressed in the OP, but not in the brain. Strikingly, qualitative observations of these z-stacks revealed that OPs in *sly* mutants are embedded within the brain tissue and display a curved and fuzzy boundary with the brain, while the frontier between the two tissues appears as a straight line in control siblings (Fig. S4A, A', Fig. 5A, A' and Movie 5). To quantify the width of the brain, we took advantage of the *Tg(eltC:GFP)* line (Stedman et al., 2009), which expresses GFP in forebrain cells located between the two OPs, and crossed it with the *Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* line to label the OPs (Fig. S4B, B' and Fig. 5B, B'). We measured the width of the GFP-expressing forebrain in 3 distinct AP levels and 3 distinct DV levels in between the two OPs (as depicted in Fig. S4B, B' and Fig. 5B, B' for the DV levels). This revealed that the width of the forebrain in *sly* mutants is smaller than in controls, in particular in the anterior and dorsal areas of this forebrain domain, where OPs are located (Fig S4C, D and Fig. 5C, D). Next, we quantitatively analysed the straightness of the brain/OP boundary. Note that the *Tg(eltC:GFP)* line could not be used for that purpose because a few cells in the OP also express the transgene. In addition, *Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* expression is mosaic in the OP, preventing the use of this line to assess the shape of the brain/OP boundary. To perform such a quantification we thus turned to immunostainings for Dlx3b, a transcription factor specifically expressed in OP (and skin) cells (Torres-Paz and Whitlock, 2014). We used deep learning to segment the 3D z-stacks of Dlx3b-immunostained embryos, and quantified the distortion of the OP/brain frontier at various z levels. This demonstrated that the OP/brain boundary is more curved and/or less defined in *sly* mutants as compared with controls (Fig. 5E-L). Thus, our analyses of cell tracks, brain size and of the shape of the brain/OP boundary suggest that the forebrain is smaller and distorted in *sly* mutants due to the inward/medial convergence of the two OPs. These findings reveal that the Laminin

γ 1-dependent BMs serve to establish a straight brain/OP boundary preventing the late convergence of the two OPs towards each other during the flexure movement.

Role of Laminin γ 1-dependent BMs in olfactory axon development

The growth of the olfactory axons starts with the retrograde axon extension of the proximal portions of the axons during OP coalescence, from 14 to 22 hpf (Breau et al., 2017), followed by the dorsal growth from the brain/OP boundary to the olfactory bulb from 22 to 32 hpf (Fig. 1K). Laminin has been reported to orient the emergence of axons in other *in vivo* contexts (Randlett et al., 2011). Do the Laminin-dependent BMs play any role in axon emergence or anchoring during retrograde axon extension? On fixed *Tg(omp:meYFP) sly* mutants at 24 hpf, numerous YFP+ neurons had their proximal axonal portion attached to the brain surface (Fig. S5-C, D), suggesting that retrograde axon extension occurs normally for at least some of the YFP+ OP neurons. Thus, the presence of a BM around the OP and/or the brain appears not to be an absolute requirement for the attachment of axon tips to the ventral and medial wall of the OP during retrograde axon extension.

Are Laminin-dependent BMs important for the growth of the axons from the brain/OP boundary to the olfactory bulb, as suggested by Laminin expression? Previous studies reported that Laminin promotes axon growth in primary cultures of rat olfactory sensory neurons (Kafitz and Greer, 1997) and of other neuronal cell types *in vitro* (Powell and Kleinman, 1997), suggesting it could represent a favorable substrate *in vivo*. In addition, axonal guidance defects (i.e. abnormal direction for axonal growth) have been previously observed in Laminin mutants, for instance for the retinotectal projections (Karlstrom et al., 1996). We first examined the axons in *Tg(omp:meYFP) sly* mutants and control siblings at 24, 28, 32 and 36 hpf. In mutant embryos, severe axonal defects were observed. Most YFP+ axons were unable to leave the OP and appeared to stall at the OP/brain boundary (Fig. S5E, left column). In some embryos (8-10%), a small proportion of axons managed to reach the presumptive OB region by exiting the OP dorsally, while the axons would normally exit the OP and enter the brain at more ventral positions in the controls (Fig. S5E, left column, an example is shown in Fig. 4B, Movie 6). In addition, ectopic medial projections were observed in mutant embryos (18 to 30% of the embryos depending on the stage, as compared to 0 to 9% in control embryos, Fig. S5E, right column).

So far the growth/navigation of the zebrafish olfactory axons from the OP to the bulb has been mostly characterised using fixed samples, or live imaging with long time intervals (Dynes and Ngai, 1998; Miyasaka et al., 2007). The dynamics of axon growth is difficult to analyse in our movies performed on *sly* mutants carrying the *Tg(omp:meYFP)* transgene because of the high density of labelled axons. To analyse the dynamic behaviour of the

axons, we thus turned to live imaging performed from 22 hpf on *sly* mutant and control embryos injected with the *omp:meYFP* plasmid, in order to obtain a mosaic labelling of the YFP+ neurons and their axons (n = 5 mutants and n = 5 controls from 6 independent experiments, Fig. 6A, B). We tracked individual YFP+ growth cones, as well as YFP+ cell bodies in the OP, during consecutive periods of 200 min each. To analyse the trajectories of the growth cones, we subtracted the movement of OP cell bodies from the growth cone tracks, in order to remove the contribution of the global flexure remodelling and visualise specifically the behaviours of the axons with respect to the surrounding cells/tissue. In control embryos, as expected, growth cones overall showed a dorsal and medial migration, except at the end of the movie, which likely corresponds to their arrival and stalling in the presumptive olfactory bulb. By contrast, growth cones in the *sly* mutants did not display a directional migration towards the bulb. They were active and explored the environment, but moved on short distances without preferential direction (Fig. 6C-N). These live imaging analyses confirm that the migration of the olfactory axons is drastically impaired in *sly* mutants, showing that Laminin γ 1-dependent BMs are essential for the growth and navigation of the axons from the OP to the olfactory bulb.

Discussion

Our study highlights key roles of Laminin-dependent BMs in critical aspects of the development of the zebrafish olfactory system, revealed here through the detailed analysis of the Laminin $\gamma 1$ loss-of-function mutant *s/y*. During the late development of the OP, Laminin-dependent BMs turned out to be essential to maintain its shape and proper position, and to establish a robust brain/placode boundary. In addition, Laminin-dependent BMs also appeared to be instrumental to ensure a proper growth and pathfinding of the olfactory axons towards the developing olfactory bulb. In the following paragraphs, we will discuss those new roles assigned to BMs in the context of the development of the zebrafish olfactory system, in light of the literature.

The BM of the OP acts as a “shell” maintaining its shape and proper position during the forebrain flexure

Our data document a mild perturbation of cell movements during OP coalescence, which suggests that Laminin-dependent BMs are overall dispensable for the OP to acquire its initial shape. However, our observation that the OP of the *s/y* mutant becomes significantly elongated in the DV dimension during the forebrain flexure provides strong evidence for an unexpected role of the laminin-dependent BMs in preventing OP deformation during this major remodelling of the head tissues. We discovered, along our live imaging observations, a joint anterior and ventral movement of the placodes and forebrain during the flexure time period in the control animals, as if the placodes were dragged along in the same antero-ventral movement as the forebrain. We hypothesize that the BM of the OP prevents its deformation in response to the forces generated by the morphogenetic movement of the neighboring brain, but this will require further experimental testing.

The ability of the placode BM to limit the deformation of the OP during this developmental step most probably relies on its mechanical properties, such as its stiffness. In the *Drosophila* egg chamber model, while Laminin itself has a minor contribution to the BM mechanical properties, Collagen IV, which deposition in the BM depends on Laminin (Díaz de la Loza et al., 2017) has a major contribution to these properties, and in particular to its stiffness (Töpfer et al., 2022). Given these pieces of data, even though the putative loss of mechanical properties leading to OP deformation observed in the *s/y* mutant is consecutive of a Laminin loss-of-function, it remains conceivable that it is the Collagen IV, rather than the Laminin $\gamma 1$ itself, which is responsible of these mechanical properties in wild-type animals. This hypothesis, in line with the dramatic disorganization of the Collagen IV pattern observed

by immunofluorescence in the *sly* mutant, however requires to be challenged by further investigation.

BMs were for long considered as inert and passive biological material, unable to generate forces by themselves. We now know that their composition is dynamic during morphogenesis (Díaz de la Loza et al., 2017; Harunaga et al., 2014; Van De Bor et al., 2021), and it has been proposed that this dynamics may generate autonomous stresses, i.e. within the BM itself (Loganathan et al., 2016; Pastor-Pareja and Xu, 2011; Zamir et al., 2008). Accordingly, Serna-Morales et al. (bioRxiv, 2022.04.18.488510) recently showed that the *Drosophila* ventral nerve cord morphodynamics is driven by a sudden increase in ECM-driven surface tension due to exponential assembly of Collagen IV in the BM. Still in *Drosophila*, it was recently shown that the elastic ECM enveloping the wing imaginal disc is a form of “active” shell whose growth affects the tissue layers upon morphogenesis (Harmansa et al., 2023). Whether such mechanisms participate to the control of the OP shape during the brain flexure remains to be addressed, through the analysis of the dynamics of expression of Collagen IV or other components of the BM, and of their integration into the BM, as well as through biomechanical investigations.

A dramatic consequence of the absence of proper OP and brain BMs in the *sly* mutant is the curved and undefined frontier between the brain and OP, with placodal cells tending to locally intermingle with brain cells, and vice versa, along the OP/brain interface. This set of data highlights a key role of these BMs in establishing a robust and straight boundary between the placode and the brain, preventing cell intermixing between the two tissues. Similar functions of Laminin-dependent BMs have already been observed in *C. elegans*, with Laminin mutants displaying an altered pharynx development, associated with tissue intermixing (Huang et al., 2003). The absence of a clear boundary between the OP and the brain in the *sly* mutant is accompanied by an apparent distortion of the brain, with notable reduced dimension in its medio-lateral axis. This phenotype, possibly due to an inward migration of the placodes that become almost embedded in the brain, illustrates an additional and unexpected role of the OP and brain BMs, in preventing late convergence of the two placodes towards each other during the flexure movement.

BMs act as guidance cues participating to the pathfinding of olfactory axons along their journey from the OP to the olfactory bulb

The early development of zebrafish olfactory axons begins with their retrograde extension, involving the attachment of the tips of the protrusions (which turned out to correspond to the

early differentiating axons) to the brain surface, followed by a lateral movement of the OP cell bodies in the opposite direction (Breau et al., 2017). This initial step appears not to be affected in the *sly* mutant. In addition, our live imaging experiments in the *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP)* background show that the Laminin γ 1-containing BM of the OP, which assembles during its coalescence, does not form where the axon tips are anchored, thereby leaving open a gap in the BM (the exit point), allowing them to later exit the OP (see below). These results suggest that Laminin-dependent BMs are dispensable for this retrograde axon extension and, more specifically, that Laminin γ 1 itself or other components of the BMs are unlikely to play a role in the anchoring of those axon tips onto the brain surface, which is a prerequisite for their retrograde extension.

Our study shows that following this early step of retrograde elongation, the axons of OP neurons (visualised with the *Tg(omp:meYFP)* transgene) grow and navigate using bona fide growth cones, assemble a tight axon fascicle which crosses the BM of the OP, turns and migrates dorsally for a short distance between both BMs and thereafter crosses the brain BM to reach the brain tissue and navigate towards the olfactory bulb. In other words, the olfactory axons have to cross two BMs. Our data show that the axons cross the first BM as it is still under construction and contain perforations, thus taking advantage of BM-free small pores to exit the OP and reach the narrow area located between the still developing BM of the OP and the already differentiated and continuous brain BM. By contrast, the entry point into the brain, across the second BM, opens with the arrival of the axons, suggesting that this opening is achieved by the axons themselves. It will be interesting, in future work, to determine whether the axons locally degrade the BM through the secretion of matrix metalloproteases, or displace the BM by using physical protrusive forces, or use a combination of both mechanisms (Chang and Chaudhuri, 2019; Ihara et al., 2011; Nazari et al., 2022; Yamada et al., 2022).

As they migrate in the narrow corridor between the OP and brain BMs, olfactory axons remain confined in close proximity to the Laminin-rich BMs. Entering into the brain tissue, olfactory axons migrate collectively within a dynamic bundle growing towards the dorsal presumptive olfactory bulb region. Importantly, once they have reached the brain tissue, the distalmost tip of this axon bundle still grows in close apposition to the internal surface of the Laminin-rich BM of the brain, suggesting that this BM serves as a migratory path promoting the growth of these axons. This hypothesis is reinforced by the fact that axon growth and directionality are dramatically impaired in the *sly* mutant, in which only few axons expressing *Tg(omp:meYFP)* are able to extend properly towards their target area. This phenotype is unlikely to be the result of defects in neuronal differentiation, as demonstrated by HuC

immunolabeling and expression of the *Tg(neurog1:GFP)* and *Tg(omp:meYFP)* transgenes, which do not show obvious difference as compared to control animals, but appears to be rather due to axon growth and navigation defects. We did not formally identify the component(s) of the BM involved in this Laminin-rich BM-dependent axon extension and pathfinding, but we consider Laminin itself as a good candidate for acting as a privileged substrate for olfactory axon elongation, as has already be suggested for other populations of axons in zebrafish (Paulus and Halloran, 2006; Semina et al., 2006), and shown in rodents to favor OSN axon extension *in vitro*, and to be present *in vivo* along all the pathway followed by OSN axons during their development, from the olfactory epithelium to the olfactory bulb (Kafitz and Greer, 1997). From a molecular point of view, it has been established on cultured sympathetic neurons that Laminin accelerates the growth of axons through binding to integrins, which favors the formation of F-actin in the growth cone in a microtubule- and Rac1-dependent manner (Grabham et al., 2003). Recently, Abe et al. (2021) further documented another role of Laminin in promoting hippocampal neuron growth cones enhanced progression on stiff substrate, through its interaction with L1, highlighting a new mechanosensitive axon outgrowth mediated by a L1-Laminin clutch mechanism (Abe et al., 2021). Whereas such Laminin-dependent mechanisms are used for guiding olfactory axons in zebrafish remains to be further explored. Other components of the BM, also affected in the *sly* mutant, may be involved as well in the regulation of olfactory axon navigation. Still in rodents indeed, the characterisation of the spatial and temporal expression of ECM proteins along the developing olfactory pathway unraveled a complex interplay between ECM permissive and inhibitory cues expressed in a dynamic way, appearing to restrict axons to the pathway while promoting axon outgrowth within (Shay et al., 2008).

In addition to ECM molecules present in the BMs, guidance cues interacting with these molecules may also be involved in some aspects of the axonal defects observed in the *sly* mutant. For example, while *Xenopus* retinal axons are repulsed by ephrin-A5 on fibronectin, they are attracted by ephrin-A5 on Laminin (Weinl et al., 2003), and Laminin converts netrin-mediated attraction of these axons to repulsion (Höpker et al., 1999). Moreover, whereas slit2 repulses Robo expressing axons of dorsal root ganglia neurons, this repulsive effect is lost in absence of Laminin 111 (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2001). Netrin1a and netrin 1b are expressed in the zebrafish forebrain close to the route of the axons, where they play an attractive role for olfactory axons which express the netrin receptor DCC (Dang et al., 2023; Lakhina et al., 2012). In addition, several ephrin and slits ligands are expressed in the forebrain at stages of axonal growth (zfin.org, Miyasaka et al., 2005). We may thus

envisage that the absence of Laminin in the *sly* mutant may change in some way the netrin-, ephrin- or slit-dependent pathfinding of olfactory axons.

In conclusion, our findings indicate that the boundary between the sensory and central components of the olfactory system (Suter and Jaworski, 2019) is organised by the BMs of the OP and the brain. These BMs are permeable at specific locations to allow the sensory axons to enter the brain and use them as a substrate to grow towards the olfactory bulb, but at the same time they ensure a clear separation of the two tissues by preventing intermixing and tissue distortion.

Material and Methods

Zebrafish lines

Wild-type, transgenic and mutant zebrafish embryos were obtained by natural spawning. In the text, the developmental times in hpf indicate hours post-fertilization at 28.5°C. To obtain the 14-22 hpf stages, embryos were collected at 10 am, incubated for 2h at 28°C before being placed overnight in a 23°C incubator to slow down development. Using this protocol, the embryos were at 14 hpf in the following morning at 10 am. We used the following lines (the simplified names are used in the figures and their legends): the zebrafish *sly*^{wi390} (*sly/lamc1*) mutant (referred to as the *sly* mutant, (Wiellette et al., 2004), the *foxd3*^{zdf10} mutant (Stewart et al., 2006), the *Tg(-8.4neurog1:GFP)*^{sb1} (referred to as *ngn1:gfp*, Blader et al., 2003) line to label the early-born OP neurons at coalescence stages, *Tg(-2.0ompb:gapYFP)*^{rw032} (a gift from Nobuhiko Miyasaka, RIKEN Institute, National Bioresource Project of Japan, referred to as *omp:yfp*, Sato et al., 2007) to label *ompb*-expressing OP neurons and their axons from 22 hpf, and *Tg(-4.0cldnb:GalTA4, cry:RFP)*^{nim11} (referred to as *cldnb:Gal4*, Breau et al., 2013) combined with *Tg(14XUAS:mRFP,Xla.Cryg:GFP)*^{tp12} (referred to as *UAS:RFP*, Balciuniene et al., 2013) to label all cells of the OP and their axons. The *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP)* line (referred to as *lamC1:lamC1-sfGFP*, Yamaguchi et al., 2022) was used to visualise the expression of LamC1-sfGFP under the control of the *lamC1* promoter. The *Tg(eltC:GFP)*^{zfi199Tg} line (referred to as *elementC:gfp*, Stedman et al., 2009) was used to label the forebrain. All our experiments were made in agreement with the European Directive 210/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes, and the French application decree “Décret 2013-118”. The fish facility has been approved by the French “Service for animal protection and health”, with the approval number A-75-05-25.

Genotyping

The *sly*^{wi390} mutant allele and the wild type locus were genotyped by PCR with the following primers: FW: CAT GAC GGC AAA GTT GGT GA; RV1: CCA TGC CTT GCA AAA TGG CGT TAC TTA A; RV2: TGT AGG AGA GAA GTC GCG AG. To detect the *sly*^{wi390} allele (which is an insertion mutant, Wiellette et al., 2004), the FW and RV1 were used to amplify a PCR product of 554 bp. The wild type allele was detected with the FW and RV2 primers to amplify a PCR product of 617 bp. The *foxd3*^{zdf10} allele was genotyped with the CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) technique (Neff et al., 2002) using the *SspI* restriction enzyme (NEB, R132S), as described in Bryan et al., 2020).

Immunostainings

For Laminin, Nidogen and Collagen IV immunostainings, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, in PBS), dehydrated in methanol/PBS series and stored in methanol at -20°C . Embryos were rehydrated in methanol/PBS series, washed in PBS and treated with $10\ \mu\text{g/mL}$ proteinase K (embryos at 24 hpf or younger: 1 min 30 s of incubation, later stages: 3 min of incubation). Embryos were then washed in glycine $2\ \text{mg/mL}$, post-fixed in 4% PFA and washed in PBS. For the other immunostainings, embryos were simply fixed in 4% PFA and washed in PBS. Embryos were then blocked in 3% goat serum and 0.3% triton in PBS for 2h at room temperature or overnight at 4°C and incubated overnight at 4°C with primary and secondary antibodies.

The following primary antibodies were used: anti-Laminin (rabbit, 1/100, L-9393, Sigma), anti-Nidogen (rabbit, 1/200, ab14511, Abcam), anti-Collagen IV (rabbit, 1/200, ab6586, Abcam), anti-GFP (chicken, 1/200, GFP-1020, Aves labs), anti-DsRed (rabbit, 1/300, 632496, Takara), anti phospho-Histone H3 (rabbit, 1/200, 06-570, Millipore), anti activated Caspase 3 (rabbit, 1/200, AF835, R and D systems), anti HuC/D (mouse, 1/200, clone 16A11, A-21271, ThermoFischer scientific) and anti-Dlx3b (mouse, 1/500, ZIRC).

Image acquisition

For live imaging, embryos were dechorionated manually and mounted at 14 hpf in 0.5% low melting agarose in 1X E3 medium. For movies on *ngn1:gfp* embryos at coalescence stages, the embryos were imaged directly after the mounting, using a dorsal view, from 14 to 22 hpf. For movies on *omp:yfp* embryos, the embryos were placed at 33°C just after the mounting, and imaged from 22 hpf with a frontal view. Movies were recorded at 28.5°C on a Leica TCS SP8 MP11 upright multiphoton microscope using a 25X (numerical aperture (NA) 0.95) water lens. For fixed embryos, immunostained embryos were mounted in 0.5% low melting agarose in PBS and imaged on a Leica TCS SP5 AOBS upright confocal microscope using a 63X (NA 0.9) water lens or on a Zeiss 980 FAST Airyscan with a 20X (NA 1.0) water lens. For electron microscopy, the zebrafish embryos were fixed in 2% glutaraldehyde and 2% PFA in 0.1M cacodylate pH 7.2 overnight at 4°C . Samples were washed in 0.1M cacodylate buffer, incubated for 1h in 1% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer, washed with deionized water, incubated 1h in 1% Uranyl Acetate and washed again with deionized water. To facilitate their orientation for sectioning, the zebrafish embryos were embedded in 4% agarose before being dehydrated through graded concentration of ethanol (50-70-95-100%). Samples were pre-embedded with graded concentration of anhydrous acetone and EPON epoxy resin mix (3:1 – 1:1 – 1:3) and embedded with 100% EPON. Finally, the embryos were mounted on silicon flat mold and polymerized at 60°C for 72 h. Ultrathin sections (80 nm) were prepared with an Ultracut ultramicrotome (UCT, Leica microsystems).

They were deposited on silicon wafers, and contrasted with 2.5% uranyl acetate and 2% lead citrate. The wafers were stuck on aluminum stubs, plasma-cleaned, and observed at 1.5 kV, with a 30 μm aperture diameter and high current mode, at 2 mm WD, with SE and BSE in column detectors, in high vacuum in a Field-Emission SEM (Gemini 500, Zeiss). Images were automatically acquired with Atlas 5 (Fibics), with a pixel dwell time of 12.8 μs , a line averaging of 5, with a 8192 x 8192 definition and a pixel size fixed at 2.5 nm (corresponding to an image size of 20.5 \times 20.5 μm), and an overlap of 16% between images. To obtain final mosaics, LookUp Table were inverted, SE and BSE signals were mixed, and manual stitching was made.

Image analysis

OP and brain dimensions. The ML dimension of the OP represents the distance between the most medial and the most lateral GFP+ or YFP+ cells in *ngn1:gfp* or *omp:yfp* embryos, respectively. Ectopic fluorescent cells (cells that are physically separated from the main cluster) were not taken into account for this measurement. The same method was applied to quantify the AP and DV dimensions of the OP tissue. The thickness of the brain was measured using the GFP forebrain expression in *elementC:gfp* embryos, at 3 different AP positions and 3 different DV positions.

Thickness of the intercellular space in EM images. Analyses were performed on 1000 pixel-long rectangular regions at the interface between NCC and brain or OP cells in controls, and at the brain/OP interface in *sly* mutants (from 3 to 7 regions per embryo). In each region, the thickness of the intercellular space was manually measured every 100 pixels using Fiji (10 measurements/region). The average thickness per region and then per embryo was computed and plotted.

Manual cell tracking. Individual cells from the OP (expressing *ngn1:gfp* or *omp:yfp*) and the adjacent brain were tracked in 3D using the Manual Tracking plugin in ImageJ/Fiji. For tracking on *ngn1:gfp* embryos, tracked cells from the brain and the OP expressed *ngn1:gfp* at least at the end of the movie. For tracking on *omp:yfp* embryos, we followed forebrain cells located between the two OPs. For growth cone tracking, individual growth cones were followed in 3D using the same plugin in embryos injected with the *omp:yfp* plasmid (Sato et al., 2005), over periods of 200 min each. The orientation of the movement (Fig. 4O, P) represents the angle between the cell track and the vertical DV axis. 2D color coded trajectories and rose plots were generated in Matlab (Mathworks, US). The 3D MSD was computed using the Numpy library in Python (Harris et al., 2020). Plots representing cell tracks merged at their origin were produced with Microsoft Excel.

Segmentation of the brain/OP boundary. The segmentation of Dlx3b+ OP cells was performed using a two-step workflow in Ilastik and Fiji softwares. First, to achieve pixel

classification, 3 representative images of controls and of *s/y* mutants were loaded into the data input menu and used to train the algorithm. After the training the pixel features and feature size (sigma) were selected. All features on all sigma scales were selected. This allowed pixels to be classified based on gray intensity, resemblance to an edge, and texture. Next, the supervised training was performed. 3 examples of each object were labeled; then, the classifier was allowed to update to observe the results. Using the uncertainty overlay, areas of high uncertainty were labeled iteratively until the prediction layer showed satisfactory identification of the pixels. This process was repeated for all 3 images. The trained classifier was then run on all images, and the pixel classification data were saved as segmented images. In the second step, a “region of interest” (ROI) containing the brain/OP boundary was manually defined using Fiji. The edge detection was applied in that ROI and allowed the delineation of the boundary between segmented OP cells and brain cells. The data were exported as CSV files to be used for statistical analysis.

Statistical analysis

Most graphs show means \pm standard error of the mean (sem), overlaid with all individual data points. The plots were generated with the GraphPad Prism software. For all graphs, we checked for normality of the data distribution before performing parametric, unpaired, two tailed t tests. When the data were not normal, a Mann-Whitney test was used. A Chi2 test was performed on the data presented in Fig. S2M-P. For the segmentation of the brain/OP boundary (Fig. 4G, H, K, L), the data were analyzed through an ANOVA test (mixed models, with animals as random effect and genotype, age and side as fixed effects). The p values correspond to *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. No statistical method was used to estimate sample size and no randomization was performed.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Jonathan Fouchard, Isabelle Bonnet and Mathilde Liffra for their help in image analysis. This work was funded by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-17-CE13-0009-01 NEUROMECHANICS), the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), Sorbonne Université, and the National Institute of Health NIDCD Grant R01-DC-017989. We also thank the imaging platform of the Institut de Biologie Paris-Seine (the facility is supported by CNRS, Sorbonne Université and the Conseil Régional Ile-de-France), and the IBPS aquatic platform for fish care.

Figures

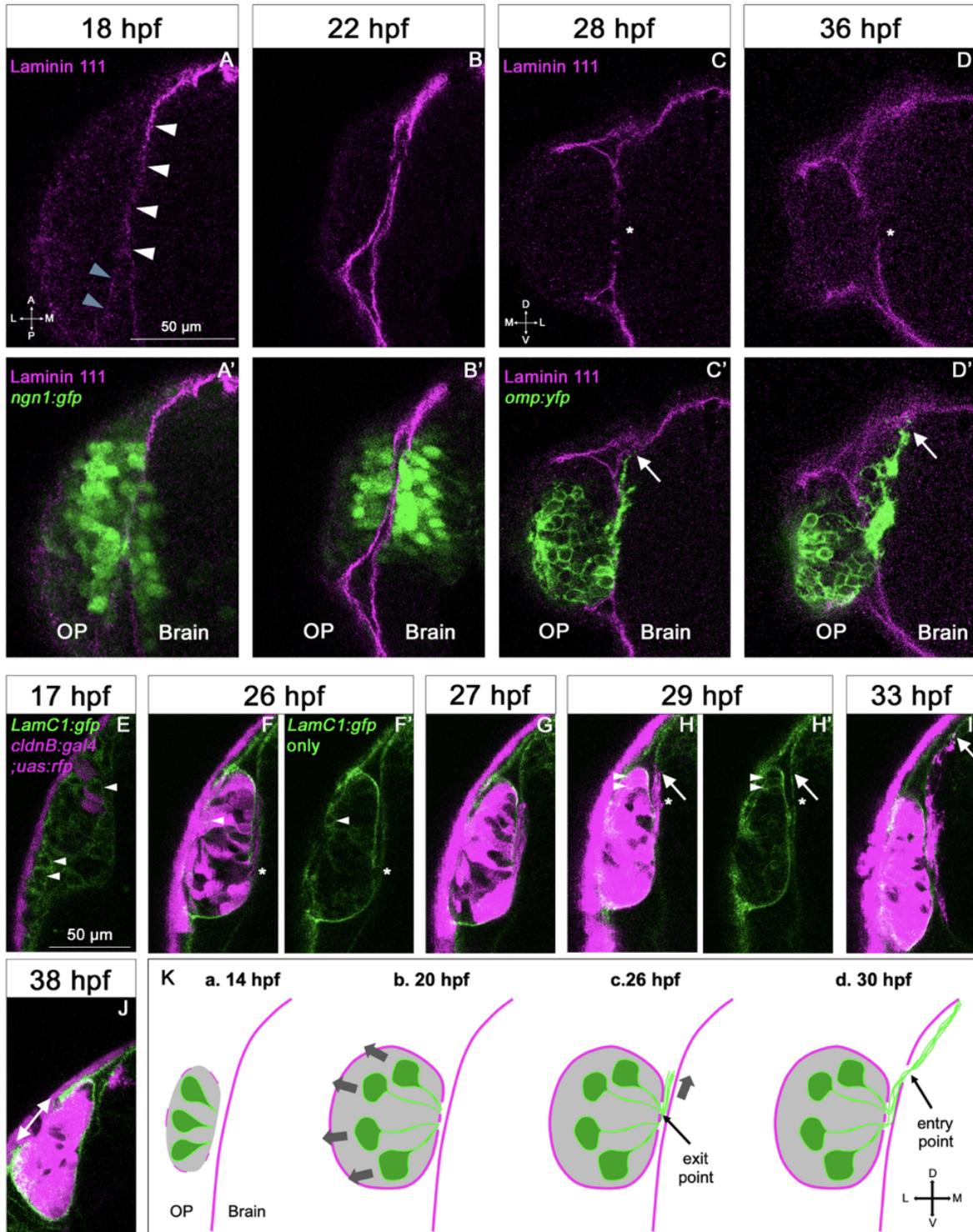


Figure 1

Figure 1. Expression profile of Laminin in relation with the development of the olfactory system. **A-D.** Immunostaining for Laminin (magenta) on *ngn1:gfp* embryos (green) at 18 and 22 hpf (A-B', dorsal views), and on *omp:yfp* embryos (green) at 28 and 36 hpf (C-D', frontal views). In A, the white arrowheads point to the BM-like Laminin staining around the brain, and grey arrowheads point to spotty Laminin accumulation around the OP. In C-D', the asterisks indicate the interruptions in the OP and brain BM where the YFP+ axons exit the OP and enter the brain. The arrows point to the most distal/dorsal extremity of the YFP+ axon bundle, which is in close contact with the internal side of the brain's BM. **E-J.** Images extracted from confocal live imaging on *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP); Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* double transgenic embryos (frontal view). LamC1-sfGFP expression is shown in green, and cytoplasmic RFP expression (OP cells and peridermal skin cells) in magenta. Arrowheads point to OP cells with cytoplasmic LamC1-sfGFP accumulation. Asterisks in F and H indicate the axonal exit point and entry point, respectively. The arrows in H and I point to the most distal/dorsal extremity of the RFP+ axon bundle, located close to the brain's BM. In J the double headed arrow shows the gap in the LamC1-sfGFP observed at the interface with the periderm, where the nostril orifice opens in the skin, as previously reported (Baraban et al., 2023). **K.** Schematic representation of Laminin-containing BM (magenta) assembly during OP coalescence (a, b), of the formation of the exit and entry points (b, d) and the associated axonal behaviours: retrograde axon extension in the OP in b, growth as a fasciculated bundle, initially between the BM of the OP and the brain (c), and then along the internal side of the brain's BM (d). Scale bar: 50 μ m.

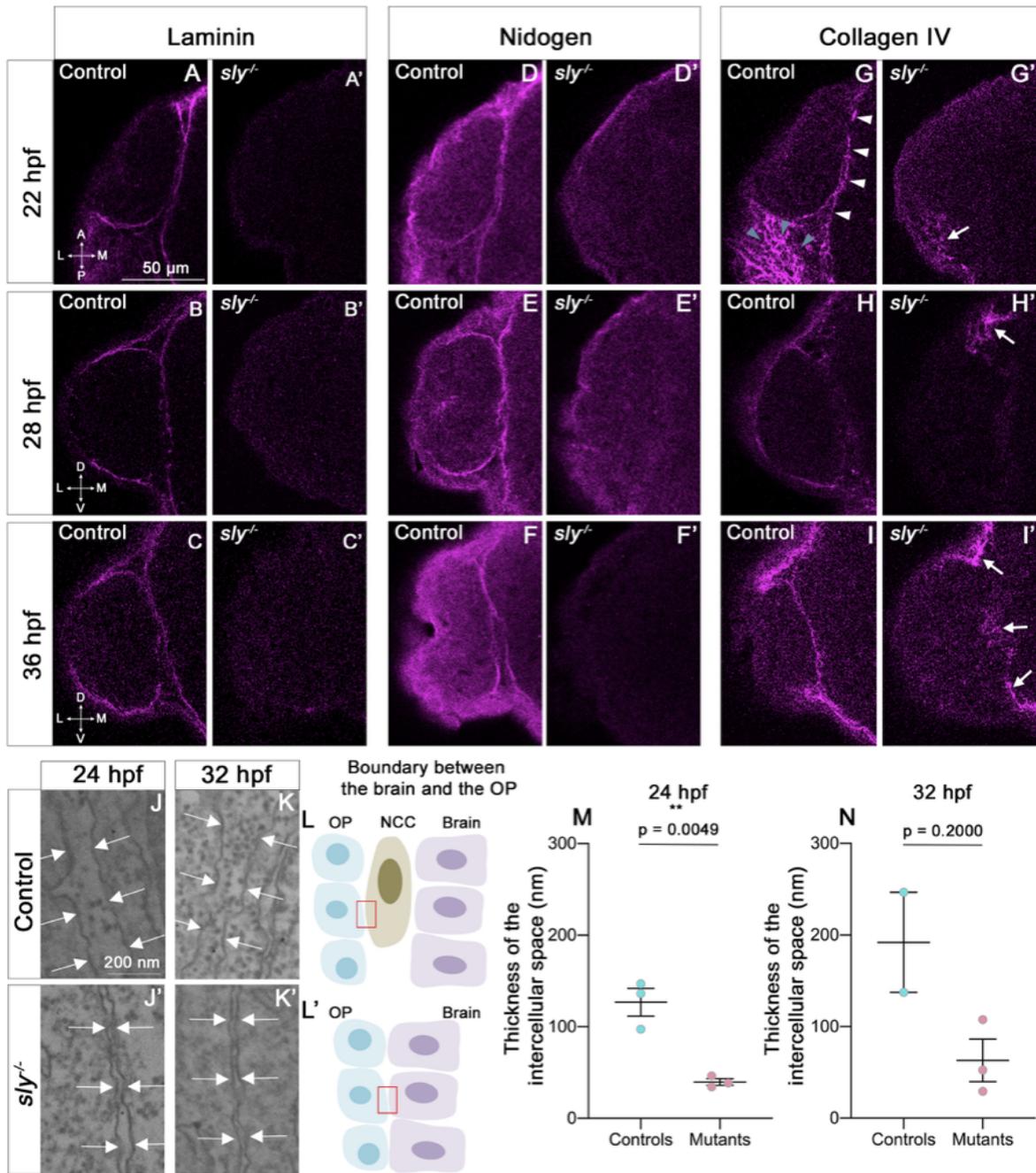


Figure 2

Figure 2. The integrity of the BM around the OP and the brain is strongly affected in *s/y* mutants. **A-I.** Immunostaining for Laminin (A-C), Nidogen (D-F) and Collagen IV (G-I) (magenta) on homozygous *s/y* mutants and control siblings at 22 hpf (dorsal view), 28 hpf, and 36 hpf (frontal view). For Laminin and Nidogen, the linear, BM-like staining seen in controls around the OP and brain tissues is not detected in *s/y* mutants. In G, white arrowheads point to the BM-like Collagen IV staining, and grey arrowheads point to fibrous, interstitial staining around the OP. In *s/y* mutants, some fibrous patches of Collagen IV remain around the OP tissue (arrows in G', H', I'). Scale bar: 50 μ m. **J, K.** Examples of electron microscopy (EM) images of the intercellular space between NCC and the OP in control siblings (J, K) and the OP and the brain in *s/y* mutants (J', K'), at 24 hpf (J, J') and 32 hpf (K, K'). The arrows indicate the plasma membranes. The pictures have been taken in the areas depicted with red boxes in L, L'. **L.** Schematic view of the brain/OP boundary and of the areas (red boxes) where the EM pictures were taken in controls (L) and *s/y* mutants (L'). OP, brain and NCC migrating between the two tissues were identified by their position and the shape of their nucleus. **M, N.** Quantification of the thickness of the intercellular space in *s/y* mutants (between OP and brain cells) and control siblings (between NCC and brain or OP cells) at 24 hpf (n = 3 controls; n = 3 mutants) and 32 hpf (n = 2 controls; n = 3 mutants). For 24 hpf, unpaired, two-tailed t test. For 32 hpf, Mann-Whitney test.

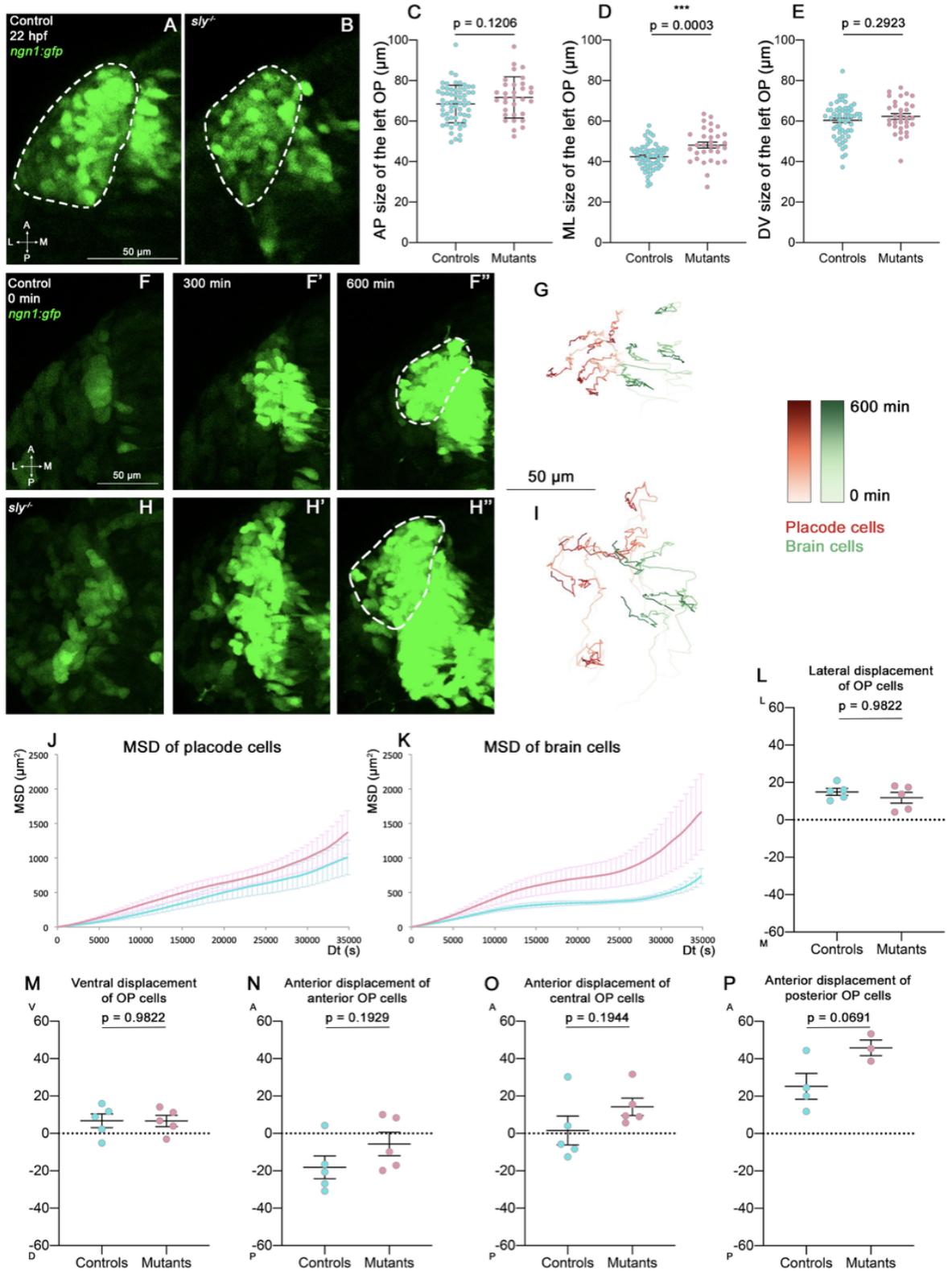


Figure 3

Figure 3. Analysis of OP coalescence in *sly* mutants and control siblings. **A, B.** Images (dorsal views, 1 z-section) of representative placodes from a *ngn1:gfp; sly^{-/-}* mutant (right) and a control *ngn1:gfp* sibling (left) at the end of OP coalescence (22 hpf). The *ngn1:gfp⁺* OP clusters are surrounded by dotted lines. **C-E.** Graphs showing the anteroposterior (AP, in C), the mediolateral (ML, in D), and dorsoventral (DV, in E) dimensions of the *ngn1:gfp⁺* OP clusters in *sly* mutants (pink) and control siblings (blue) at 22 hpf (n = 62 controls and n = 32 mutants from 2 independent experiments). Unpaired, two-tailed t test. **F-F'' and H-H''.** Images extracted from confocal live imaging on *ngn1:gfp* control (F-F'') and *sly* mutant (H-H'') embryos during OP coalescence, dorsal view. **G, I.** Examples of 2D tracks (ML along X and AP along Y) of *ngn1:gfp⁺* placodal cells (red) and *ngn1:gfp⁺* brain cells (green) in a control (G) and a *sly* mutant embryo (I). The time is color-coded: light colors at the starting of the trajectory (17 hpf) towards dark colors for the end of the track (600 min later). **J, K.** 3D Mean Square Displacement (MSD) analysis for OP cells (J) and brain cells (K) in *sly* mutants (pink curves) and control siblings (blue curves) (n = 5 controls and n = 5 mutants from 3 independent experiments, 10 to 14 cells analysed in each tissue). **L, M.** Graphs showing the total lateral (L) and ventral (M) displacement of OP cells, starting at 17 hpf and during 600 min of time lapse in *sly* mutants and control embryos (n = 5 control placodes and n = 5 mutant placodes from 3 independent experiments, 10 to 14 cells per placode, unpaired, two-tailed t test). **N-P.** Graphs showing the total anterior displacement of anterior, central and posterior OP cells (as defined in Breau et al., 2017), starting at 17 hpf and during 600 min of time lapse in *sly* mutants and control embryos (n = 5 control placodes and n = 5 mutant placodes from 3 independent experiments, mean calculated from 1 to 12 cells per placode, unpaired, two-tailed t test. Note that in some of the placodes we could not find any trackable (i.e. expressing H2B-RFP) posterior OP cell, which explains why there are only 4 control points and 3 mutant points in the graph showing the anterior displacement of posterior cells).

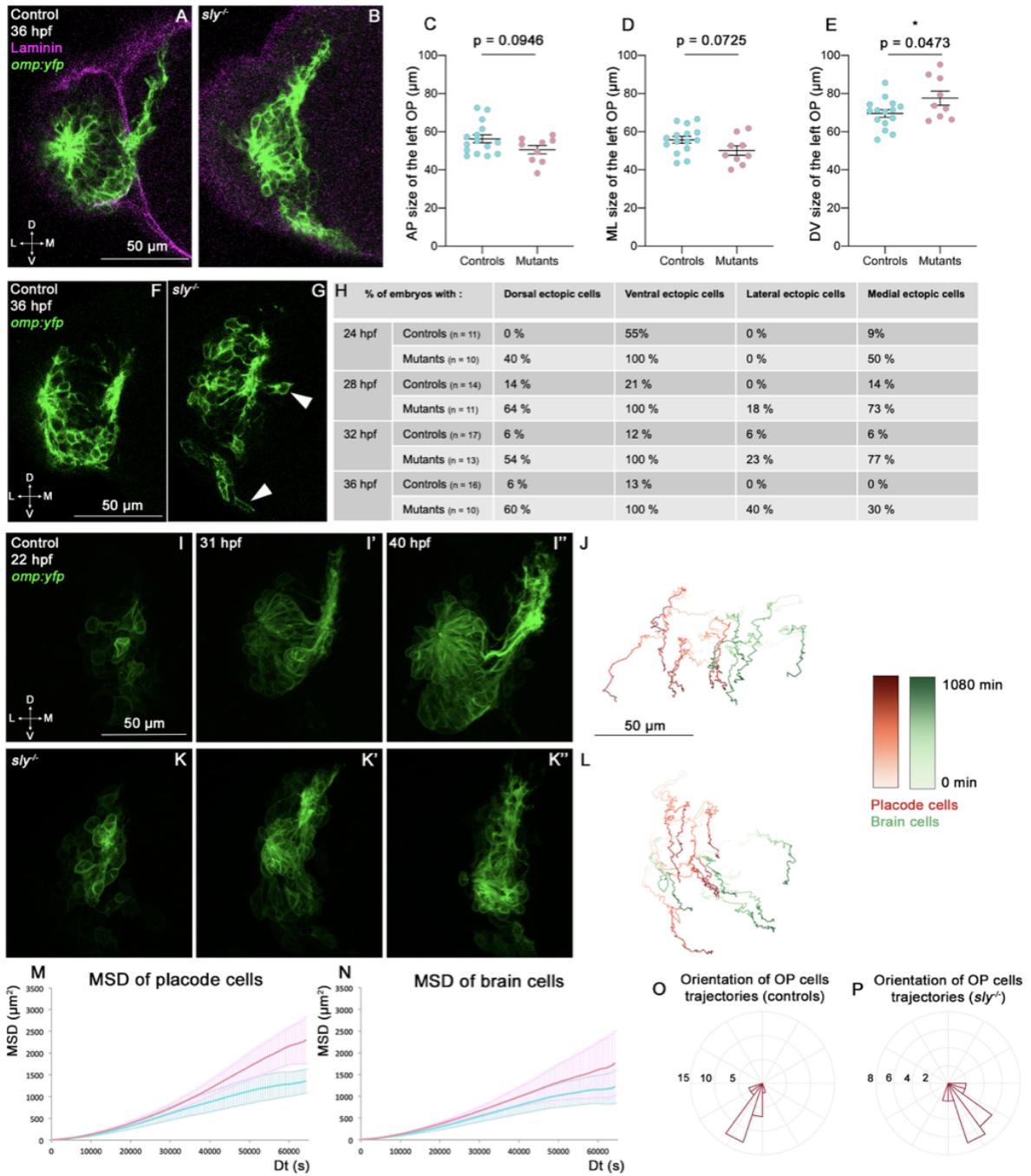


Figure 4

Figure 4. Analysis of OP and brain morphogenesis in *sly* mutants and control siblings during the forebrain flexure. **A, B.** Images (frontal view, 1 z-section) of representative placodes from a *omp:yfp; sly^{-/-}* mutant (right) and a control *omp:yfp* sibling (left) at 36 hpf. Laminin immunostaining is shown in magenta. **C-E.** Graphs showing the anteroposterior (AP, in C), the mediolateral (ML, in D), and dorsoventral (DV, in E) dimensions of the *omp:yfp⁺* OP clusters in *sly* mutants (pink) and control siblings (blue) at 36 hpf (n = 15 controls and n = 9 mutants from 4 independent experiments). Unpaired, two-tailed t test. Similar measurements performed at younger stages are shown in Fig. S3A-L. **F, G.** Examples of images used for the analysis of ectopic cells, defined as *omp:yfp⁺* cells being physically separated from the main YFP⁺ cluster. Arrowheads show instances of ectopic cells in a *sly* mutant embryo. **H.** Table showing the percentage of control and mutant embryos with at least one ectopic cell located dorsally, ventrally, laterally, and medially to the main YFP⁺ cluster. The numbers of analysed embryos are indicated in the table. **I-I'' and K-K''.** Images extracted from confocal live imaging on *omp:yfp* control (I-I'') and *sly* mutant (K-K'') embryos during the forebrain flexure, from 22 hpf and over 1080 min, frontal view. **J, L.** Examples of 2D tracks (ML along X and DV along Y) of *omp:yfp⁺* placodal cells (red) and adjacent brain cells (green) in a control (J) and a *sly* mutant embryo (L). The time is color-coded: light colors at the starting of the trajectory (22 hpf) towards dark colors for the end of the track (1080 min later). **M, N.** 3D Mean Square Displacement (MSD) analysis of OP cells (M) and brain cells (N) in *sly* mutants (pink curves) and control siblings (blue curves) (n = 4 controls and n = 3 mutants from 5 independent experiments, 10 to 14 cells analysed in each tissue). **O, P.** Rose plots indicating the orientation of the movement for control and mutant left OP cells (data pooled from n = 4 controls and n = 3 mutants from 5 independent experiments). Medial to the right, lateral to the left. There is a statistical difference between the cell orientations in controls versus mutants: Anova test: p = 0.001 for the left placodes, and p = 0.013 for the right placodes.

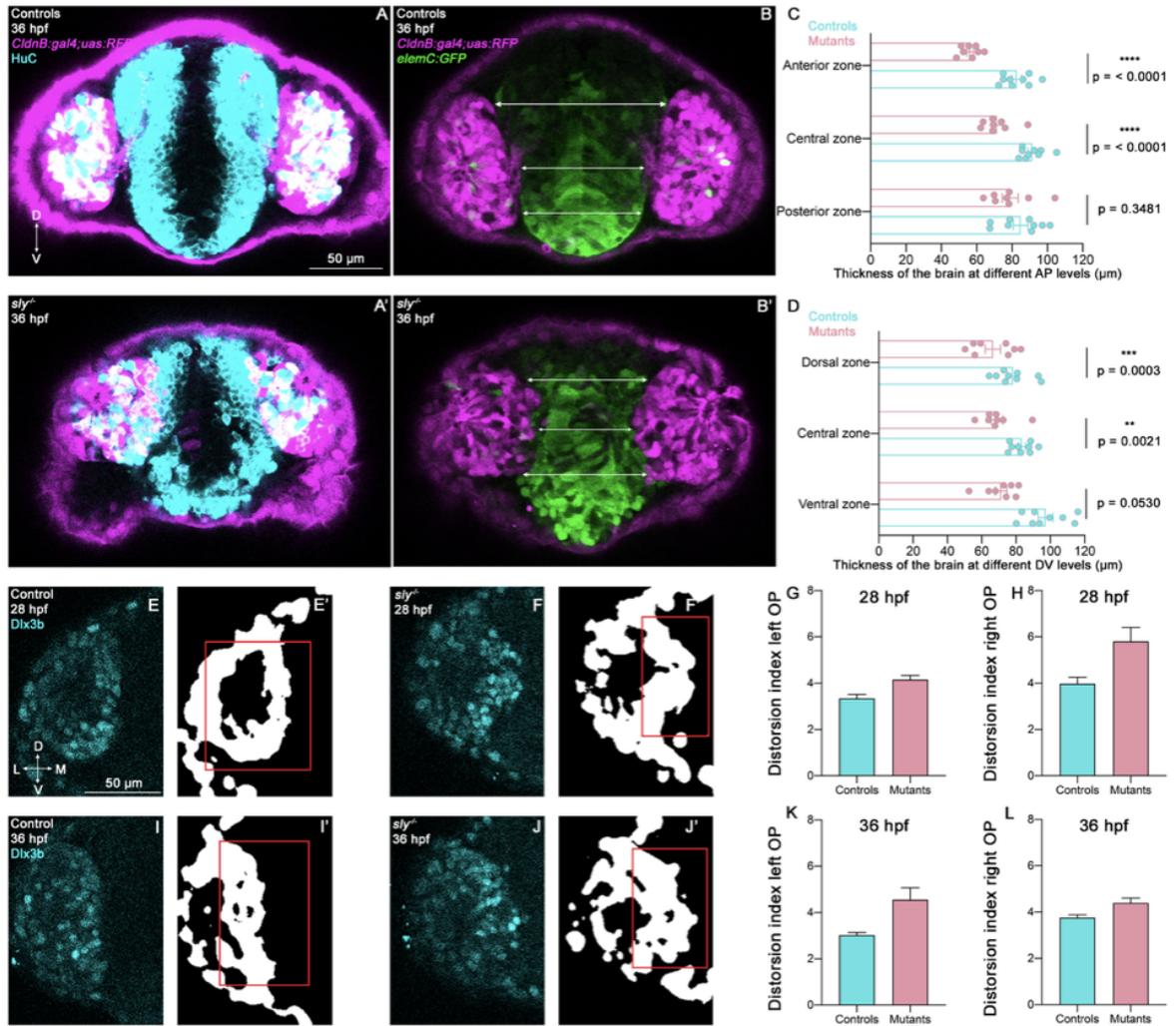


Figure 5

Figure 5. Analysis of brain shape and brain/placode boundary in *sly* mutants and control siblings. **A, A'.** Immunostaining for HuC (cyan) at 36 hpf performed on *Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* (magenta) control and *sly* mutant embryos (frontal view). Similar immunostainings performed at 28 hpf are shown in Fig. S4A, A'. **B, B'.** Images of *Tg(eltC:GFP); Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* double transgenic control and mutant embryos at 36 hpf (frontal view), similar images acquired at 28 hpf are shown in Fig. S4B, B'. GFP (green) is expressed by the forebrain, and a few OP cells. Arrows indicate where the thickness of the forebrain was measured (in 3 distinct positions along the DV axis). Measurements were also carried out at 3 distinct AP levels (through the z-stack). **C, D.** Graphs showing the thickness of the forebrain in 36 hpf controls and *sly* mutants, at 3 different DV and 3 different AP levels (n = 9 controls and n = 8 mutants from 4 independent experiments, unpaired, two-tailed t test). Quantifications for the 28 hpf stage are shown in Fig. S4C, D. **E-J'.** Immunostaining for the OP marker *Dlx3b* (cyan) was performed on 28 hpf and 36 hpf *sly* mutants and control siblings (frontal view). The signal was segmented using deep learning approaches, and the distortion index of the OP/brain boundary was calculated in the regions outlined with red boxes. **G, H, K, L.** Graphs showing the distortion indexes in controls and mutants at both stages, for the left and right placodes. The distortion index is defined as the total length of the boundary, divided by the distance between the dorsalmost and ventralmost positions along the analysed boundary region. The distortion index is significantly higher in mutants as compared with controls (global ANOVA test: p = 0.0132 for the genotype criteria).

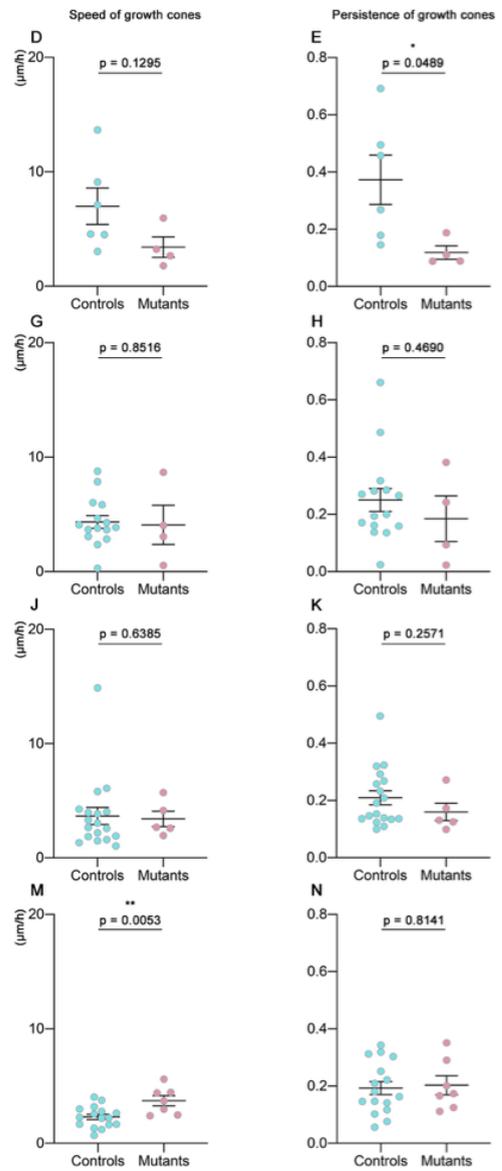
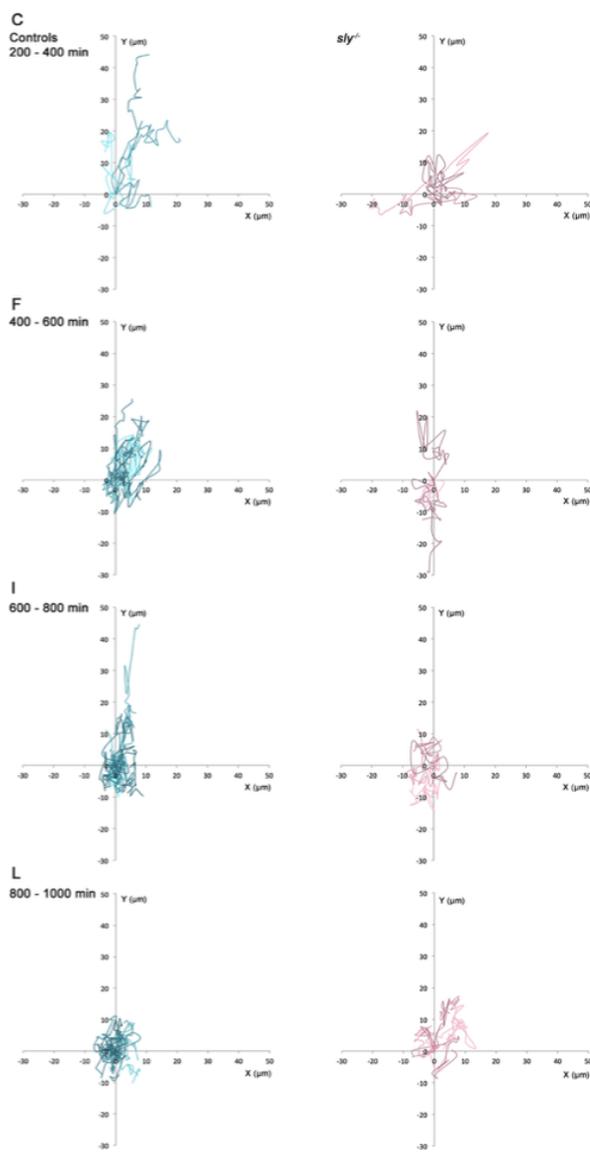
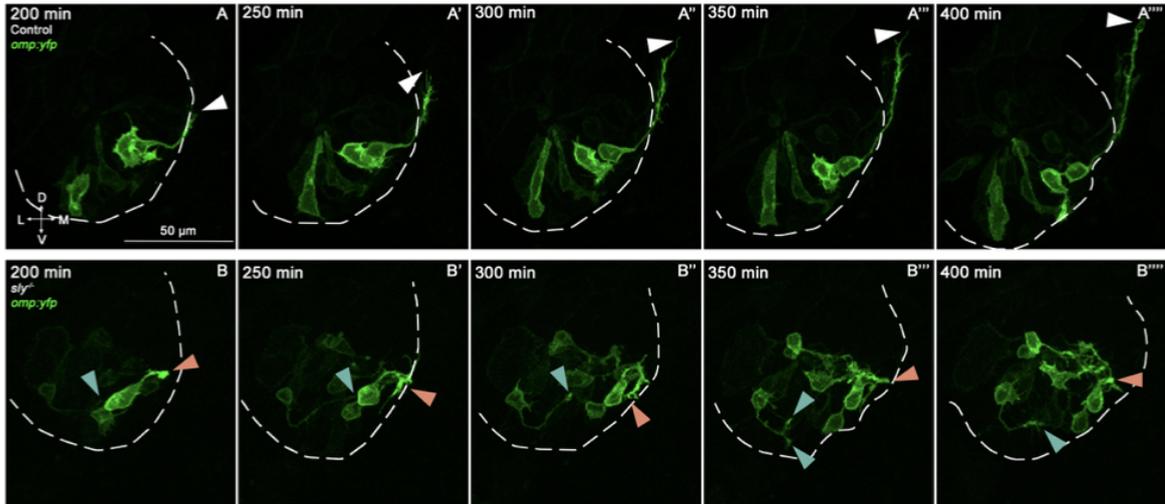


Figure 6

Figure 6. Quantitative live imaging of axonal behaviours in *sly* mutants and control siblings. **A, B.** Images extracted from confocal live imaging on control (A-A''') and *sly* mutant (B-B''') embryos injected with the *omp:yfp* plasmid to obtain a mosaic labelling of OP neurons and their axons (frontal view). The OP neurons and their axons were imaged over 1000 min from 22 hpf. Here, only the 200-400 min time window is shown as an example. The arrowheads show the positions of individual growth cones over time. **C-N.** Individual YFP+ growth cones, as well as YFP+ cell bodies in the OP, were tracked in controls and mutants during 4 consecutive periods of 200 min each (from 200 min of imaging, since before no growth cone could be detected, $n = 5$ mutant movies and $n = 5$ controls from 6 independent experiments). The mean movement of OP cell bodies was subtracted from the growth cone tracks to get rid of the global flexure movement. 200-400 min: 6 growth cones in controls, 4 in mutants; 400-600 min: 15 growth cones in controls, 4 in mutants; 600-800 min: 18 growth cones in controls, 4 in mutants; 800-1000 min: 16 growth cones in controls, 7 in mutants. **C, F, I, L.** Tracks of the growth cones merged at their origin for the 4 consecutive periods of 200 min. **D, G, J, M.** Graphs showing the mean speed of the growth cones. Unpaired, two-tailed t tests. **E, H, K, N.** Graphs showing the persistence of the growth cones, defined as the distance between the initial and final positions of the growth cones divided by the total length of their trajectory. Unpaired, two-tailed t tests, except for the analysis of the persistence at 400-600 min, and for the speed and persistence at 600-800 min, where Mann Whitney tests were performed.

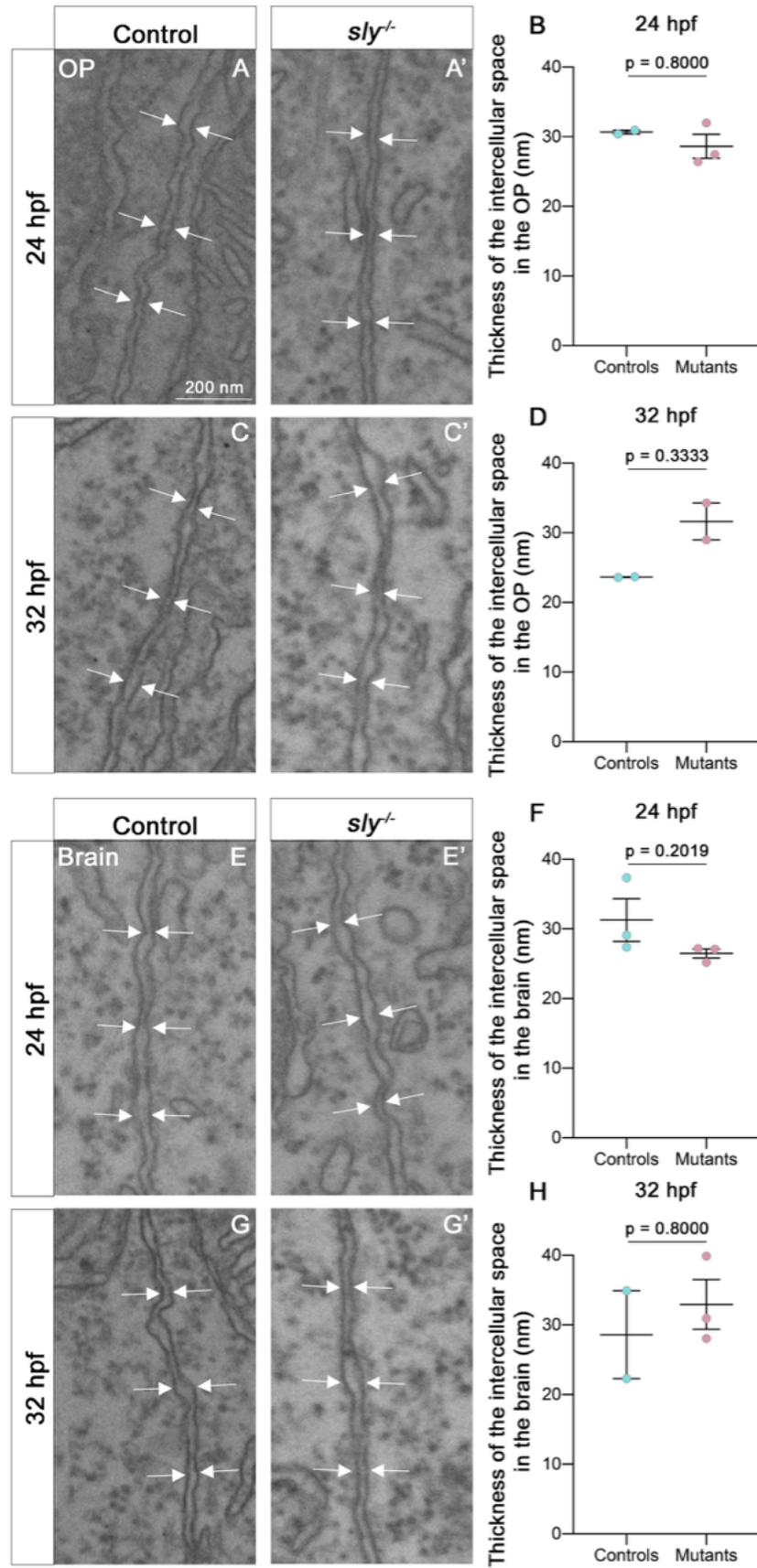


Figure S1

Figure S1. Electron microscopy analysis of intercellular spaces in the OP and brain tissues. **A, A' and C, C'.** Examples of electron microscopy images of the intercellular space located between OP cells in control siblings (A, C) and in *s/y* mutants (A', C'), at 24 hpf and 32 hpf. The arrows indicate the plasma membranes. **B, D.** Quantification of the thickness of the intercellular space in the OP tissue in *s/y* mutants and control siblings at 24 hpf (n = 3 controls; n = 3 mutants) and 32 hpf (n = 2 controls; n = 3 mutants). Unpaired, two-tailed t test. **E, E' and G, G'.** Examples of electron microscopy images of the intercellular space located between brain cells in control siblings (A, C) and in *s/y* mutants (A', C'), at 24 hpf and 32 hpf. The arrows indicate the plasma membranes. **F, H.** Quantification of the thickness of the intercellular space in the brain tissue in *s/y* mutants and control siblings at 24 hpf (n = 3 controls; n = 3 mutants) and 32 hpf (n = 2 controls; n = 3 mutants). Unpaired, two-tailed t test.

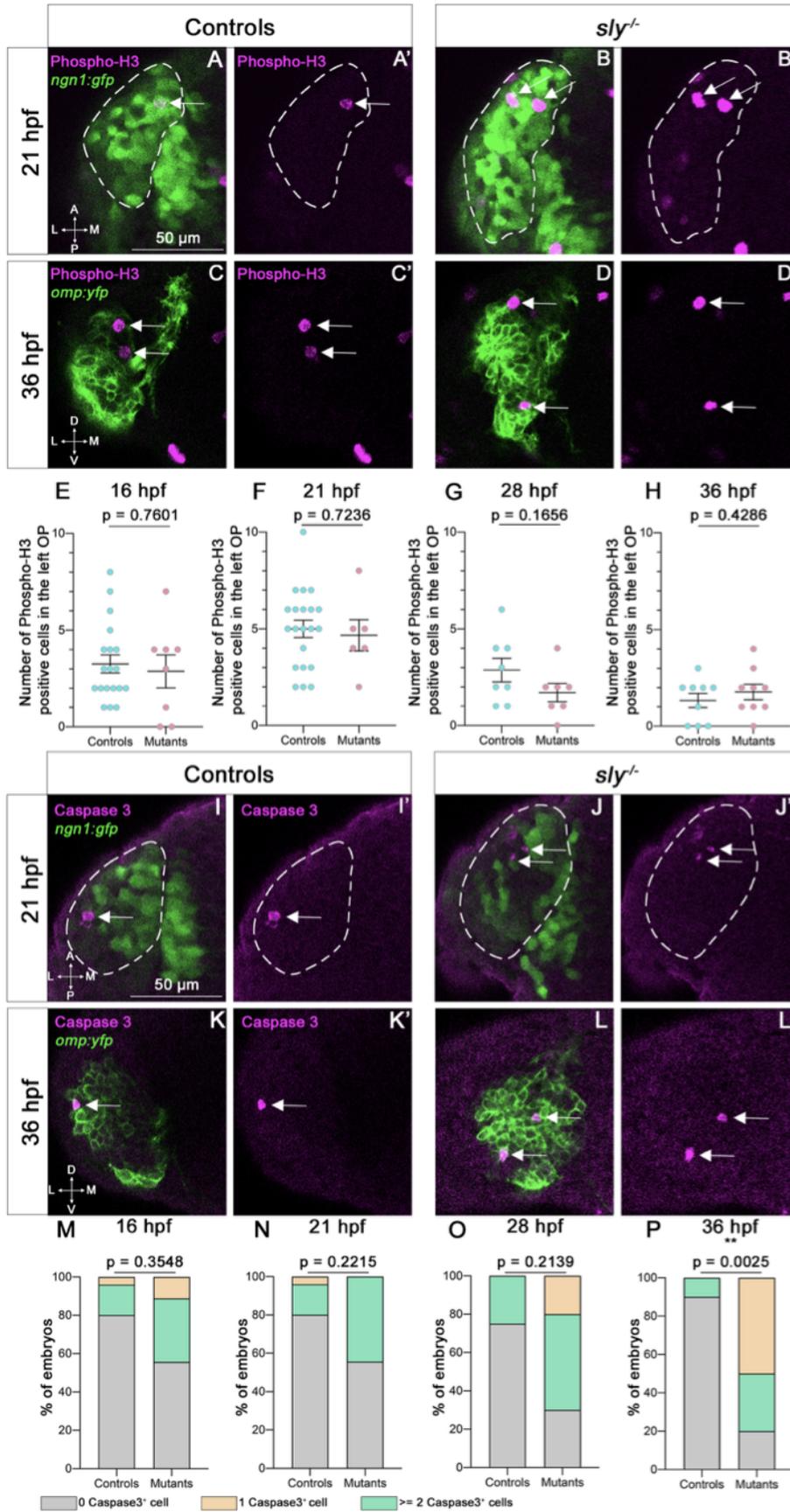


Figure S2

Figure S2. Analysis of proliferation and apoptosis in *sly* mutants and control siblings.

A-D'. Immunostaining for Phospho-histone H3 (magenta) has been performed to label dividing cells on *ngn1:gfp* embryos (green) at 16 hpf and 21 hpf (A-B' show images at 21 hpf, dorsal view), and on *omp:yfp* embryos (green) at 28 and 36 hpf (C-D' show images at 36 hpf, frontal view). In A-B' the OP is surrounded by a dotted line. Arrows point to instances of Phospho-histone H3 positive cells in the placodal *ngn1:gfp*⁺ or *omp:yfp*⁺ clusters. **E-H**. Number of Phospho-histone H3 positive cells in the OP at 16, 21, 28 and 36 hpf in control embryos and *sly* mutants. Unpaired, two-tailed t test. **I-L'**. Immunostaining for Activated Caspase 3 (magenta) has been performed to label apoptotic cells or debris on *ngn1:gfp* embryos (green) at 16 hpf and 21 hpf (I-J' show images at 21 hpf, dorsal view), and on *omp:yfp* embryos (green) at 28 and 36 hpf (K-L' show images at 36 hpf, frontal view). In I-J' the OP is surrounded by a dotted line. Arrows point to instances of Activated Caspase 3 positive cells or debris in the OP or in contact with the placodal *ngn1:gfp*⁺ or *omp:yfp*⁺ clusters. **M-P**. Percentage of OPs with zero, one or two and more Activated Caspase 3 positive cells or debris in the OP or very close to the OP at 16, 21, 28 and 36 hpf in control embryos and *sly* mutants. Chi2 test.

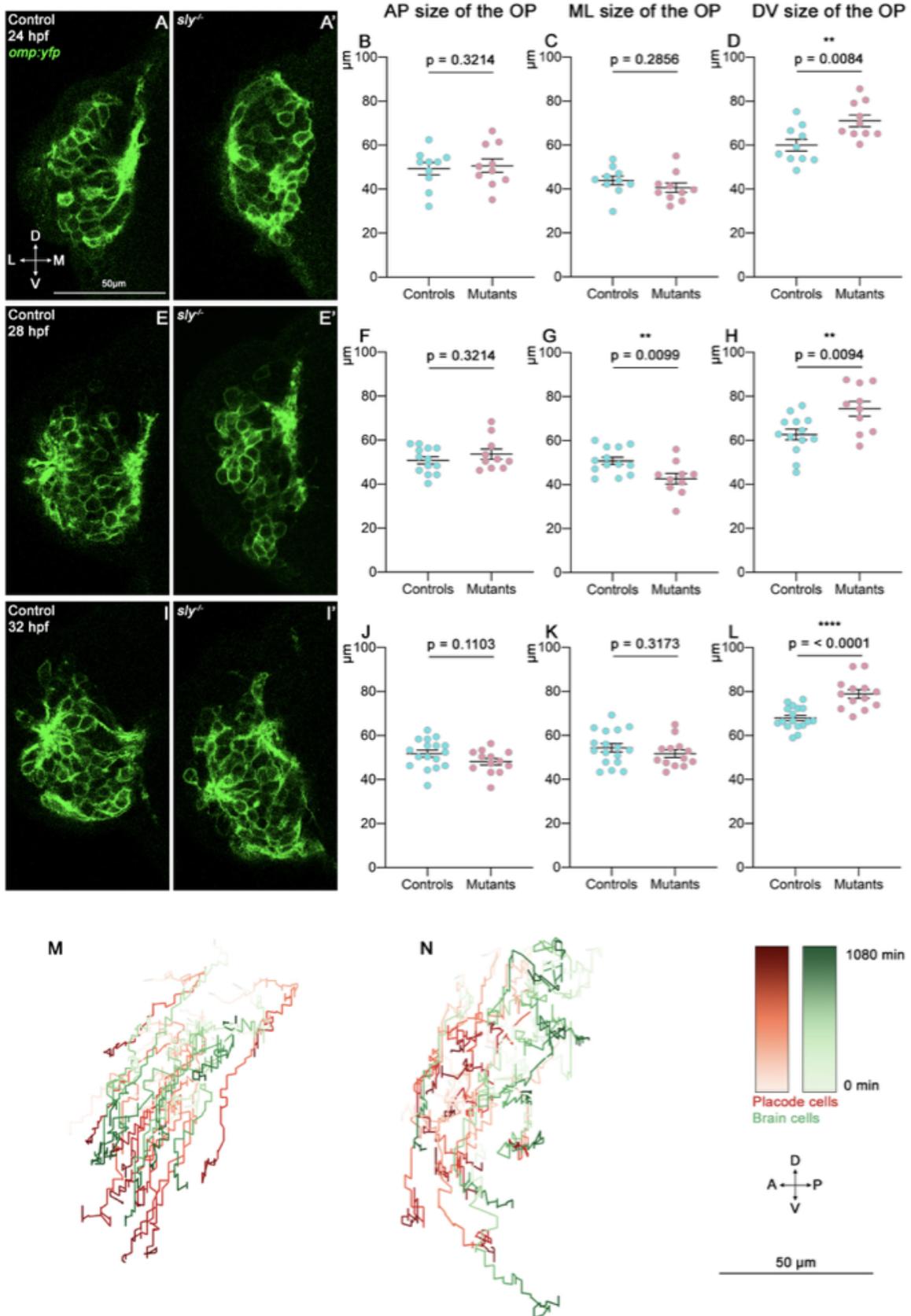


Figure S3

Figure S3. Additional results on the OP morphogenesis defects observed in *sly* mutants. **A-L.** Analysis of OP dimensions at 24, 28 and 32 hpf. **A, A', E, E' and I, I'.** Images (frontal views, 1 z-section) of representative placodes from *omp:yfp; sly^{-/-}* mutants (right) and control *omp:yfp* siblings (left) at 24 hpf (A, A'), 28 hpf (E, E') and 32 hpf (I, I'). **B-D.** Graphs showing the anteroposterior (AP), the mediolateral (ML), and dorsoventral (DV) dimensions of the *omp:yfp⁺* OP clusters in *sly* mutants (pink) and control siblings (blue) at 24 hpf (n = 10 controls and n = 10 mutants from 3 independent experiments). Unpaired, two-tailed t test. **F-H.** Similar quantifications at 28 hpf (n = 13 controls and n = 10 mutants from 2 independent experiments). Unpaired, two-tailed t tests. **J-L.** Similar quantifications at 32 hpf (n = 17 controls and n = 13 mutants from 2 independent experiments). Unpaired, two-tailed t tests. Similar quantifications performed at 36 hpf are shown in Fig. 4C-E. **M, N.** Examples of 2D tracks plotted in a lateral view (AP along X and DV along Y) of *omp:yfp⁺* placodal cells (red) and adjacent brain cells (green) in a control (M) and a *sly* mutant embryo (N). The time is color-coded: light colors at the starting of the trajectory (22 hpf) towards dark colors for the end of the track (1080 min later).

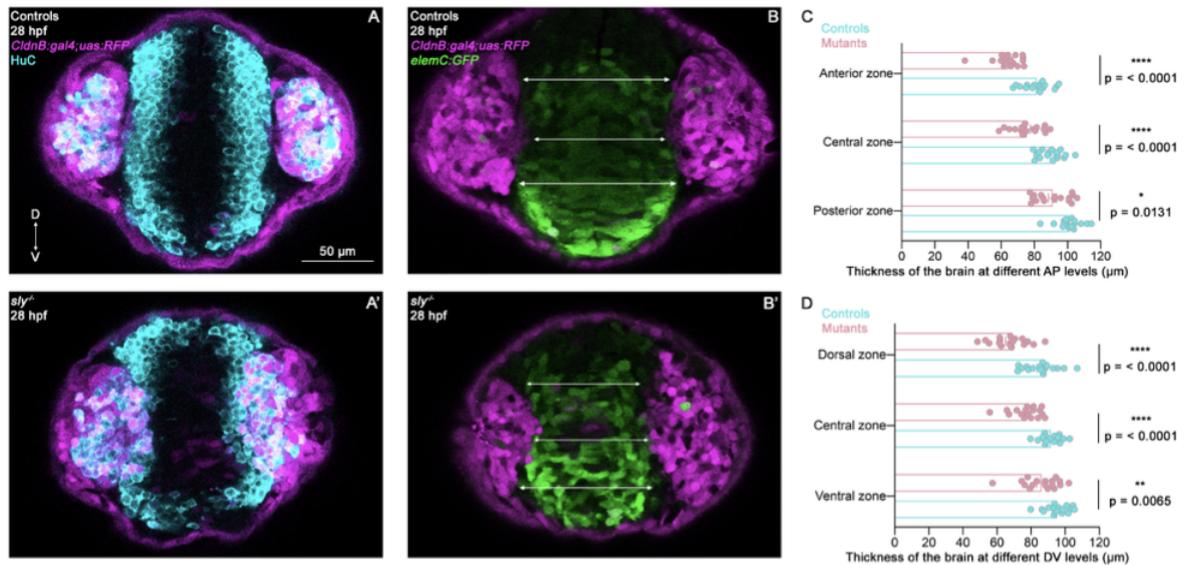


Figure S4

Figure S4. Additional results for the analysis of brain shape and brain/placode boundary in *sly* mutants and control siblings. A, A'. Immunostaining for HuC (cyan) at 28 hpf performed on *Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* (magenta) control and *sly* mutant embryos (frontal view). Similar immunostainings performed at 36 hpf are shown in Fig. 5A, A'. **B, B'.** Images of *Tg(eltC:GFP); Tg(cldnb:Gal4; UAS:RFP)* double transgenic control and mutant embryos at 28 hpf (frontal view), similar images acquired at 36 hpf are shown in Fig. 5B, B'. GFP (green) is expressed by the forebrain, and a few OP cells. Arrows indicate where the thickness of the forebrain was measured (in 3 distinct positions along the DV axis). Measurements were also carried out at 3 distinct AP levels (through the z-stack). **C, D.** Graphs showing the thickness of the forebrain in 28 hpf controls and *sly* mutants, at 3 different DV and 3 different AP levels (n = 17 controls and n = 17 mutants from 5 independent experiments, unpaired, two-tailed t test). Quantifications for the 28 hpf stage are shown in Fig. 5C, D.

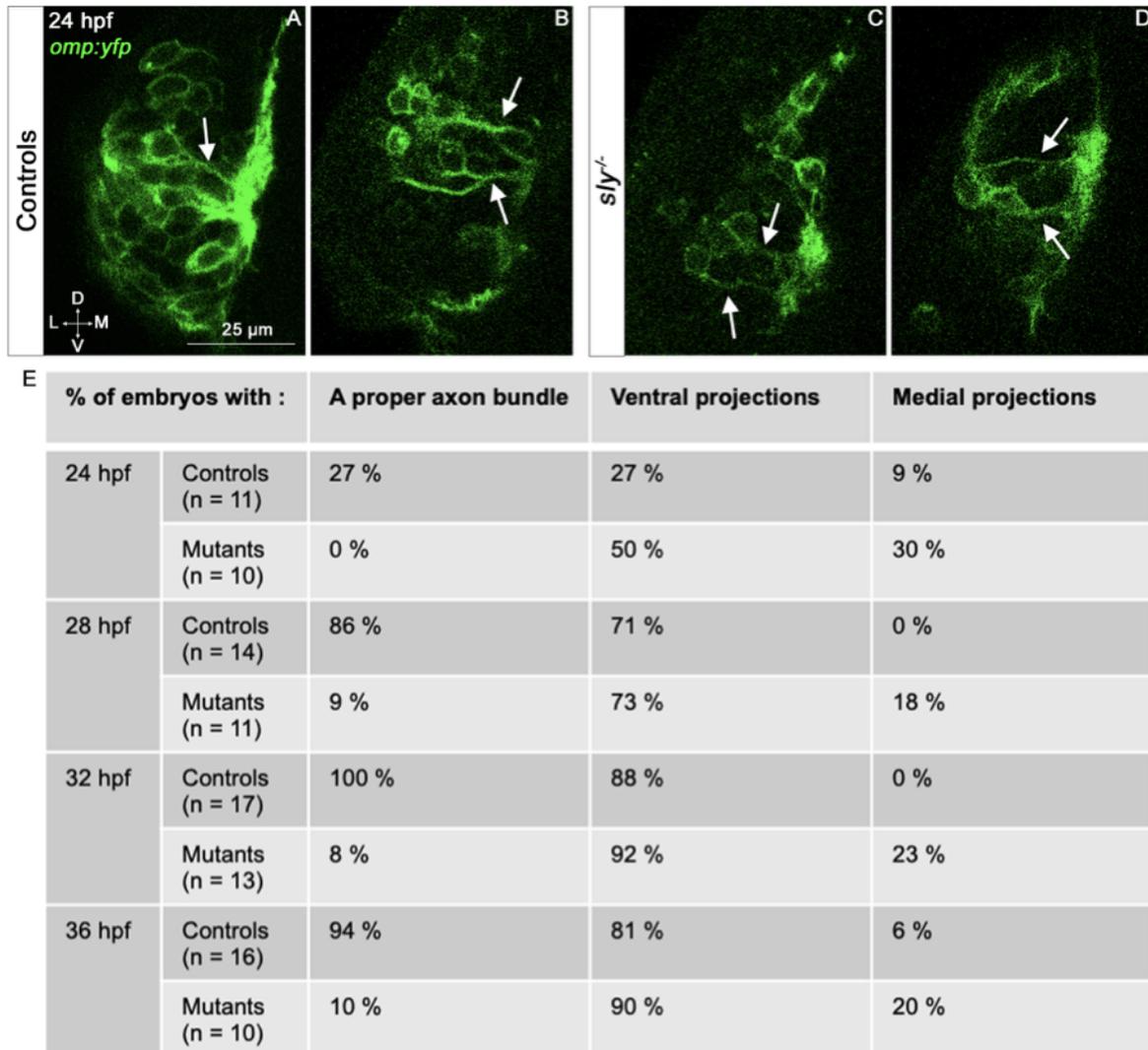


Figure S5

Figure S5. Additional results on olfactory axon development in *sly* mutants and control siblings. **A-D.** Images (frontal view, 1 z-section) of representative placodes from *omp:yfp; sly^{-/-}* mutant (C, D) and control *omp:yfp* siblings (A, B) at 24 hpf. The arrows point to instances of proximal portions of the axons in the OP. **E.** Table describing the % of control and *sly* mutant embryos with a proper axonal bundle (1st column), with ventral projections (middle column) and with medial projections (right column) at 24, 28, 32 and 36 hpf. The numbers of embryos analysed at each stage are indicated in the table.

References

- Abe, K., Baba, K., Huang, L., Wei, K. T., Okano, K., Hosokawa, Y. and Inagaki, N.** (2021). Mechanosensitive axon outgrowth mediated by L1-laminin clutch interface. *Biophys J* **120**, 3566–3576.
- Aguillon, R., Madelaine, R., Aguirrebengoa, M., Guturu, H., Link, S., Dufourcq, P., Lecaudey, V., Bejerano, G., Blader, P. and Batut, J.** (2020). Morphogenesis is transcriptionally coupled to neurogenesis during peripheral olfactory organ development. *Development* **147**, (24): dev192971.
- Bakkers, J., Hild, M., Kramer, C., Furutani-Seiki, M. and Hammerschmidt, M.** (2002). Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev Cell* **2**, 617–627.
- Balciuniene, J., Nagelberg, D., Walsh, K. T., Camerota, D., Georgette, D., Biemar, F., Bellipanni, G. and Balciunas, D.** (2013). Efficient disruption of Zebrafish genes using a Gal4-containing gene trap. *BMC Genomics* **14**, 619.
- Baraban, M., Gordillo Pi, C., Bonnet, I., Gilles, J.-F., Lejeune, C., Cabrera, M., Tep, F. and Breau, M. A.** (2023). Actomyosin contractility in olfactory placode neurons opens the skin epithelium to form the zebrafish nostril. *Dev Cell* **58**, 361-375.e5.
- Belvindrah, R., Hankel, S., Walker, J., Patton, B. L. and Müller, U.** (2007). Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *J Neurosci* **27**, 2704–2717.
- Blader, P., Plessy, C. and Strahle, U.** (2003). Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mech Dev* **120**, 211–8.
- Bonner, J. and O'Connor, T. P.** (2001). The permissive cue laminin is essential for growth cone turning in vivo. *J Neurosci* **21**, 9782–9791.
- Breau, M. A., Wilkinson, D. G. and Xu, Q.** (2013). A Hox gene controls lateral line cell migration by regulating chemokine receptor expression downstream of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 16892–16897.
- Breau, M. A., Bonnet, I., Stoufflet, J., Xie, J., De Castro, S. and Schneider-Maunoury, S.** (2017). Extrinsic mechanical forces mediate retrograde axon extension in a developing neuronal circuit. *Nat Commun* **8**, 282.
- Bryan, C. D., Chien, C. B. and Kwan, K. M.** (2016). Loss of laminin alpha 1 results in multiple structural defects and divergent effects on adhesion during vertebrate optic cup morphogenesis. *Dev Biol* **416**, 324–37.
- Bryan, C. D., Casey, M. A., Pfeiffer, R. L., Jones, B. W. and Kwan, K. M.** (2020). Optic cup morphogenesis requires neural crest-mediated basement membrane assembly.

Development **147** (4): dev181420.

Chang, J. and Chaudhuri, O. (2019). Beyond proteases: Basement membrane mechanics and cancer invasion. *J Cell Biol* **218**, 2456–2469.

Chapman, S. C., Sawitzke, A. L., Campbell, D. S. and Schoenwolf, G. C. (2005). A three-dimensional atlas of pituitary gland development in the zebrafish. *J Comp Neurol* **487**, 428–440.

Chen, Z.-L., Haegeli, V., Yu, H. and Strickland, S. (2009). Cortical deficiency of laminin gamma1 impairs the AKT/GSK-3beta signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev Biol* **327**, 158–168.

Dang, P., Barnes, D. T., Cheng, R. P., Xu, A., Moon, Y. J., Kodukula, S. S. and Raper, J. A. (2023). Netrins and Netrin Receptors are Essential for Normal Targeting of Sensory Axons in the Zebrafish Olfactory Bulb. *Neuroscience* **508**, 19–29.

Díaz de la Loza, M. C., Díaz-Torres, A., Zurita, F., Rosales-Nieves, A. E., Moeendarbary, E., Franze, K., Martín-Bermudo, M. D. and González-Reyes, A. (2017). Laminin Levels Regulate Tissue Migration and Anterior-Posterior Polarity during Egg Morphogenesis in *Drosophila*. *Cell Rep* **20**, 211–223.

Dolez, M., Nicolas, J.-F. and Hirsinger, E. (2011). Laminins, via heparan sulfate proteoglycans, participate in zebrafish myotome morphogenesis by modulating the pattern of Bmp responsiveness. *Development* **138**, 97–106.

Dynes, J. L. and Ngai, J. (1998). Pathfinding of olfactory neuron axons to stereotyped glomerular targets revealed by dynamic imaging in living zebrafish embryos. *Neuron* **20**, 1081–1091.

Garcia, K. E., Okamoto, R. J., Bayly, P. V. and Taber, L. A. (2017). Contraction and stress-dependent growth shape the forebrain of the early chicken embryo. *J Mech Behav Biomed Mater* **65**, 383–397.

García-Alonso, L., Fetter, R. D. and Goodman, C. S. (1996). Genetic analysis of Laminin A in *Drosophila*: extracellular matrix containing laminin A is required for ocellar axon pathfinding. *Development* **122**, 2611–2621.

Grabham, P. W., Reznik, B. and Goldberg, D. J. (2003). Microtubule and Rac 1-dependent F-actin in growth cones. *J Cell Sci* **116**, 3739–3748.

Grant, P. K. and Moens, C. B. (2010). The neuroepithelial basement membrane serves as a boundary and a substrate for neuron migration in the zebrafish hindbrain. *Neural Dev* **5**, 9.

Harden, M. V., Pereiro, L., Ramialison, M., Wittbrodt, J., Prasad, M. K., McCallion, A. S. and Whitlock, K. E. (2012). Close association of olfactory placode precursors and cranial neural crest cells does not predestine cell mixing. *Dev Dyn* **241**, 1143–54.

Harmansa, S., Erlich, A., Eloy, C., Zurlo, G. and Lecuit, T. (2023). Growth anisotropy of the extracellular matrix shapes a developing organ. *Nat Commun* **14**, 1220.

Harris, C. R., Millman, K. J., van der Walt, S. J., Gommers, R., Virtanen, P., Cournapeau, D., Wieser, E., Taylor, J., Berg, S., Smith, N. J., et al. (2020). Array programming with NumPy. *Nature* **585**, 357–362.

Harunaga, J. S., Doyle, A. D. and Yamada, K. M. (2014). Local and global dynamics of the basement membrane during branching morphogenesis require protease activity and actomyosin contractility. *Dev Biol* **394**, 197–205.

Hauptmann, G. and Gerster, T. (2000). Regulatory gene expression patterns reveal transverse and longitudinal subdivisions of the embryonic zebrafish forebrain. *Mech Dev* **91**, 105–118.

Höpker, V. H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. and Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* **401**, 69–73.

Huang, C.-C., Hall, D. H., Hedgecock, E. M., Kao, G., Karantza, V., Vogel, B. E., Hutter, H., Chisholm, A. D., Yurchenco, P. D. and Wadsworth, W. G. (2003). Laminin alpha subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* **130**, 3343–3358.

Ihara, S., Hagedorn, E. J., Morrissey, M. A., Chi, Q., Motegi, F., Kramer, J. M. and Sherwood, D. R. (2011). Basement membrane sliding and targeted adhesion remodels tissue boundaries during uterine-vulval attachment in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* **13**, 641–651.

Ivanovitch, K., Cavodeassi, F. and Wilson, S. W. (2013). Precocious acquisition of neuroepithelial character in the eye field underlies the onset of eye morphogenesis. *Dev Cell* **27**, 293–305.

Kafitz, K. W. and Greer, C. A. (1997). Role of laminin in axonal extension from olfactory receptor cells. *J Neurobiol* **32**, 298–310.

Karamanos, N. K., Piperigkou, Z., Passi, A., Götte, M., Rousselle, P. and Vlodavsky, I. (2021). Extracellular matrix-based cancer targeting. *Trends Mol Med* **27**, 1000–1013.

Karlstrom, R. O., Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Brand, M., Crawford, A. D., Grunewald, B., Haffter, P., Hoffmann, H., Meyer, S. U., et al. (1996). Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development* **123**, 427–438.

Kaur, S., Kaur, I., Rawal, P., Tripathi, D. M. and Vasudevan, A. (2021). Non-matrigel scaffolds for organoid cultures. *Cancer Lett* **504**, 58–66.

Kim, S., Uroz, M., Bays, J. L. and Chen, C. S. (2021). Harnessing Mechanobiology for Tissue Engineering. *Dev Cell* **56**, 180–191.

Lakhina, V., Marcaccio, C. L., Shao, X., Lush, M. E., Jain, R. A., Fujimoto, E., Bonkowsky, J. L., Granato, M. and Raper, J. A. (2012). Netrin/DCC signaling guides olfactory sensory axons to their correct location in the olfactory bulb. *J Neurosci* **32**, 4440–4456.

Lee, J. and Gross, J. M. (2007). Laminin beta1 and gamma1 containing laminins are

essential for basement membrane integrity in the zebrafish eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 2483–2490.

Li, S., Liquari, P., McKee, K. K., Harrison, D., Patel, R., Lee, S. and Yurchenco, P. D. (2005). Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *J Cell Biol* **169**, 179–189.

Loganathan, R., Rongish, B. J., Smith, C. M., Filla, M. B., Czirok, A., Bénazéraf, B. and Little, C. D. (2016). Extracellular matrix motion and early morphogenesis. *Development* **143**, 2056–2065.

Madelaine, R., Garric, L. and Blader, P. (2011). Partially redundant proneural function reveals the importance of timing during zebrafish olfactory neurogenesis. *Development* **138**, 4753–62.

Miner, J. H. and Yurchenco, P. D. (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 255–284.

Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S.-Y., Hutson, L. D., Chien, C.-B., Okamoto, H. and Yoshihara, Y. (2005). Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development* **132**, 1283–1293.

Miyasaka, N., Knaut, H. and Yoshihara, Y. (2007). Cxcl12/Cxcr4 chemokine signaling is required for placode assembly and sensory axon pathfinding in the zebrafish olfactory system. *Development* **134**, 2459–2468.

Monnot, P., Gangatharan, G., Baraban, M., Pottin, K., Cabrera, M., Bonnet, I. and Breau, M. A. (2022). Intertissue mechanical interactions shape the olfactory circuit in zebrafish. *EMBO Rep* **23**, e52963.

Moore, R. E., Pop, S., Alleyne, C. and Clarke, J. D. W. (2022). Microtubules are not required to generate a nascent axon in embryonic spinal neurons in vivo. *EMBO reports* **23**, e52493.

Nazari, S. S., Doyle, A. D. and Yamada, K. M. (2022). Mechanisms of Basement Membrane Micro-Perforation during Cancer Cell Invasion into a 3D Collagen Gel. *Gels* **8**, 567.

Neff, M. M., Turk, E. and Kalishman, M. (2002). Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet* **18**, 613–615.

Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Brose, K., Marillat, V., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M. and Chédotal, A. (2001). Sensory axon response to substrate-bound Slit2 is modulated by laminin and cyclic GMP. *Mol Cell Neurosci* **17**, 1048–1058.

O'Brien, G. S., Rieger, S., Wang, F., Smolen, G. A., Gonzalez, R. E., Buchanan, J. and Sagasti, A. (2012). Coordinate development of skin cells and cutaneous sensory axons in zebrafish. *J Comp Neurol* **520**, 816–831.

Odenthal, J., Haffter, P., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M.,

- Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., et al.** (1996). Mutations affecting the formation of the notochord in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 103–115.
- Parsons, M. J., Pollard, S. M., Saúde, L., Feldman, B., Coutinho, P., Hirst, E. M. A. and Stemple, D. L.** (2002). Zebrafish mutants identify an essential role for laminins in notochord formation. *Development* **129**, 3137–3146.
- Pastor-Pareja, J. C. and Xu, T.** (2011). Shaping Cells and Organs in *Drosophila* by Opposing Roles of Fat Body-Secreted Collagen IV and Perlecan. *Developmental Cell* **21**, 245–256.
- Paulus, J. D. and Halloran, M. C.** (2006). Zebrafish bashful/laminin-alpha 1 mutants exhibit multiple axon guidance defects. *Dev Dyn* **235**, 213–224.
- Pollard, S. M., Parsons, M. J., Kamei, M., Kettleborough, R. N. W., Thomas, K. A., Pham, V. N., Bae, M.-K., Scott, A., Weinstein, B. M. and Stemple, D. L.** (2006). Essential and overlapping roles for laminin alpha chains in notochord and blood vessel formation. *Dev Biol* **289**, 64–76.
- Powell, S. K. and Kleinman, H. K.** (1997). Neuronal laminins and their cellular receptors. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 401–414.
- Randlett, O., Poggi, L., Zolessi, F. R. and Harris, W. A.** (2011). The oriented emergence of axons from retinal ganglion cells is directed by laminin contact in vivo. *Neuron* **70**, 266–280.
- Ross, L. S., Parrett, T. and Easter, S. S.** (1992). Axonogenesis and morphogenesis in the embryonic zebrafish brain. *J Neurosci* **12**, 467–482.
- Sato, Y., Miyasaka, N. and Yoshihara, Y.** (2005). Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. *J Neurosci* **25**, 4889–4897.
- Sato, Y., Miyasaka, N. and Yoshihara, Y.** (2007). Hierarchical regulation of odorant receptor gene choice and subsequent axonal projection of olfactory sensory neurons in zebrafish. *J Neurosci* **27**, 1606–1615.
- Semina, E. V., Bosenko, D. V., Zinkevich, N. C., Soules, K. A., Hyde, D. R., Vihtelic, T. S., Willer, G. B., Gregg, R. G. and Link, B. A.** (2006). Mutations in laminin alpha 1 result in complex, lens-independent ocular phenotypes in zebrafish. *Dev Biol* **299**, 63–77.
- Serna-Morales, E., Sánchez-Sánchez, B. J., Marcotti, S., Bhargava A., Dragu A., Hirvonen, L. M., Díaz-de-la-Loza, M., Mink, M., Cox, S., Rayfield, E. and Stramer, B. M.** (2022). Extracellular matrix assembly stress drives *Drosophila* central nervous system morphogenesis. bioRxiv 2022.04.18.488510; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.04.18.488510>.
- Shay, E. L., Greer, C. A. and Treloar, H. B.** (2008). Dynamic expression patterns of ECM molecules in the developing mouse olfactory pathway. *Dev Dyn* **237**, 1837–1850.

Sidhaye, J. and Norden, C. (2017). Concerted action of neuroepithelial basal shrinkage and active epithelial migration ensures efficient optic cup morphogenesis. *Elife* **6**,.

Sittaramane, V., Sawant, A., Wolman, M. A., Maves, L., Halloran, M. C. and Chandrasekhar, A. (2009). The cell adhesion molecule Tag1, transmembrane protein Stbm/Vangl2, and Lamininalpha1 exhibit genetic interactions during migration of facial branchiomotor neurons in zebrafish. *Dev Biol* **325**, 363–373.

Smyth, N., Vatansever, H. S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M. and Edgar, D. (1999). Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* **144**, 151–160.

Soleman, S., Filippov, M. A., Dityatev, A. and Fawcett, J. W. (2013). Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience* **253**, 194–213.

Stedman, A., Lecaudey, V., Havis, E., Anselme, I., Wassef, M., Gilardi-Hebenstreit, P. and Schneider-Maunoury, S. (2009). A functional interaction between *lrx* and *Meis* patterns the anterior hindbrain and activates *krox20* expression in rhombomere 3. *Dev Biol* **327**, 566–577.

Stemple, D. L., Solnica-Krezel, L., Zwartkuis, F., Neuhauss, S. C., Schier, A. F., Malicki, J., Stainier, D. Y., Abdelilah, S., Rangini, Z., Mountcastle-Shah, E., et al. (1996). Mutations affecting development of the notochord in zebrafish. *Development* **123**, 117–128.

Stewart, R. A., Arduini, B. L., Berghmans, S., George, R. E., Kanki, J. P., Henion, P. D. and Look, A. T. (2006). Zebrafish *foxd3* is selectively required for neural crest specification, migration and survival. *Developmental Biology* **292**, 174–188.

Suter, T. and Jaworski, A. (2019). Cell migration and axon guidance at the border between central and peripheral nervous system. *Science* **365**,.

Theocharis, A. D., Manou, D. and Karamanos, N. K. (2019). The extracellular matrix as a multitasking player in disease. *FEBS J* **286**, 2830–2869.

Töpfer, U., Guerra Santillán, K. Y., Fischer-Friedrich, E. and Dahmann, C. (2022). Distinct contributions of ECM proteins to basement membrane mechanical properties in *Drosophila*. *Development* **149**, dev200456.

Torres-Paz, J. and Whitlock, K. E. (2014). Olfactory sensory system develops from coordinated movements within the neural plate. *Dev Dyn* **243**, 1619–31.

Torres-Paz, J., Tine, E. M. and Whitlock, K. E. (2021). Dissecting the neural divide: a continuous neurectoderm gives rise to the olfactory placode and bulb. *Int J Dev Biol* **65**, 275–287.

Tropepe, V. and Sive, H. L. (2003). Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism? *Genes Brain Behav* **2**, 268–281.

Tsuda, S., Kitagawa, T., Takashima, S., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Shima, A., Tsutsumi, M., Hori, H., Naruse, K., et al. (2010). FAK-mediated extracellular signals are

essential for interkinetic nuclear migration and planar divisions in the neuroepithelium. *J Cell Sci* **123**, 484–496.

Urbano, J. M., Torgler, C. N., Molnar, C., Tepass, U., López-Varea, A., Brown, N. H., de Celis, J. F. and Martín-Bermudo, M. D. (2009). Drosophila laminins act as key regulators of basement membrane assembly and morphogenesis. *Development* **136**, 4165–4176.

Van De Bor, V., Loreau, V., Malbouyres, M., Cerezo, D., Placenti, A., Ruggiero, F. and Noselli, S. (2021). A dynamic and mosaic basement membrane controls cell intercalation in Drosophila ovaries. *Development* **148**,.

Vöcking, O., Van Der Meulen, K., Patel, M. K. and Famulski, J. K. (2023). Zebrafish anterior segment mesenchyme progenitors are defined by function of tfap2a but not sox10. *Differentiation* **130**, 32–42.

Walma, D. A. C. and Yamada, K. M. (2020). The extracellular matrix in development. *Development* **147**, dev175596.

Weinl, C., Drescher, U., Lang, S., Bonhoeffer, F. and Löschinger, J. (2003). On the turning of Xenopus retinal axons induced by ephrin-A5. *Development* **130**, 1635–1643.

Whitlock, K. E. and Westerfield, M. (1998). A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish. *J Neurosci* **18**, 8919–8927.

Whitlock, K. E. and Westerfield, M. (2000). The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development* **127**, 3645–53.

Wiellette, E., Grinblat, Y., Austen, M., Hirsinger, E., Amsterdam, A., Walker, C., Westerfield, M. and Sive, H. (2004). Combined haploid and insertional mutation screen in the zebrafish. *Genesis* **40**, 231–240.

Wolman, M. A., Sittaramane, V. K., Essner, J. J., Yost, H. J., Chandrasekhar, A. and Halloran, M. C. (2008). Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin-alpha1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo. *Neural Dev* **3**, 6.

Yamada, K. M., Doyle, A. D. and Lu, J. (2022). Cell-3D matrix interactions: recent advances and opportunities. *Trends Cell Biol* **32**, 883–895.

Yamaguchi, N., Zhang, Z., Schneider, T., Wang, B., Panozzo, D. and Knaut, H. (2022). Rear traction forces drive adherent tissue migration in vivo. *Nat Cell Biol* **24**, 194–204.

Zamir, E. A., Rongish, B. J. and Little, C. D. (2008). The ECM moves during primitive streak formation--computation of ECM versus cellular motion. *PLoS Biol* **6**, e247.

II Résultats complémentaires

II.1 Perturbation du Collagène IV dans des embryons mutants *sly* et des embryons contrôles

L'un des autres composants majeurs des membranes basales est le Collagène IV. Il est indirectement lié à la Laminine via le Nidogène et a été décrit comme étant impliqué notamment dans la navigation des axones rétiniens (Xiao et Baier 2007; M. A. Fox 2008) et la mise en place des projections des neurones des cellules granulaires du cervelet (Takeuchi et al. 2015). Au cours de mes travaux, j'ai observé que chez les mutants *sly*, des *patches* de Collagène IV étaient toujours présents autour de l'OP, aux différents stades étudiés. De façon remarquable, la localisation de ces *patches* de Collagène IV semblait parfois être corrélée avec la trajectoire des axones qui parviennent à sortir de la placode chez les mutants. Nous avons donc formulé l'hypothèse que le Collagène IV pourrait influencer la navigation des axones olfactifs vers l'OB, dans les contrôles mais aussi dans les mutants *sly*. Pour tester cette hypothèse, nous avons décidé de produire des embryons crispants pour le Collagène IV en vue de les analyser, en particulier pour ce qui concerne la croissance et le guidage des axones olfactifs. Nous nous attendions notamment à observer un phénotype axonal accru dans les embryons à la fois *sly*^{-/-} et crispants pour le Collagène IV, et possiblement un phénotype axonal lié à la perte de fonction du Collagène IV chez les embryons *sly*^{+/-} et *sly*^{+/+}.

Comme décrit dans mon introduction, il existe six chaînes formant le Collagène IV ($4\alpha 1$, $4\alpha 2$, $4\alpha 3$, $4\alpha 4$, $4\alpha 5$ et $4\alpha 6$) qui peuvent former les trimères suivant : $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (Fig.25) (Y. Wu et Ge 2019). En observant les hybridations *in situ* réalisées par Carrara et al 2019 (Fig.9), nous avons identifié que les ARNm des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ sont exprimés à proximité de l'OP à 24 hpf. Nous avons donc identifié, avec l'aide d'Alexis Eschstruth (plateforme de transgénèse/mutagenèse de l'unité), des sites CRISPR/gRNA ciblant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ (deux sites CRISPR/gRNA par chaîne, permettant de potentiellement obtenir des délétions), et ainsi susceptibles de perturber les trois trimères.

J'ai réalisé deux expériences indépendantes et sélectionné 50 embryons injectés avec un mix contrôle (ne contenant pas les ARN guides) comprenant 25 *sly*^{+/+} ou *sly*^{+/-} et 25 embryons *sly*^{-/-}, ainsi que 94 crispants pour le Collagène IV, comprenant 72 embryons *sly*^{+/+} ou *sly*^{+/-} et 22 embryons *sly*^{-/-} (Fig.33 A, B, F, G). Après identification des délétions dans les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ du Collagène IV par PCR, il y avait 28 crispants présentant une délétion simultanée des deux chaînes (double délétion), dont seulement deux homozygotes *sly*^{-/-}. Pour la suite

des analyses, je me suis concentrée sur ces embryons avec la double délétion (Fig.33 C-E, H-J).

L'immunomarquage des embryons, fixés à 28 et 36 hpf, a montré que les embryons avec une double délétion présentent encore tous des *patches* de Collagène IV autour de l'OP (Fig.33 C-E, H-J). L'anticorps Collagène IV utilisé est un anticorps polyclonal, il est donc possible qu'il reconnaisse d'autres chaînes de Collagène IV. Les deux crispants double délétés *sly*^{-/-} à 28 hpf et 36 hpf ne semblent pas avoir de perturbations des axones plus marquées que celles qui caractérisent habituellement le mutant *sly* (Fig.33 E et J). Certains crispants non mutants (c'est-à-dire *sly*^{+/+} ou *sly*^{+/-}) semblent avoir des défauts de forme de l'OP ou d'extension des axones (N = 9/16 crispants vs N = 3/12 pour les témoins contrôles à 28 hpf, N = 5/10 crispants vs N = 1/13 chez les témoins contrôles à 36 hpf, suggérant un rôle possible du Collagène IV dans le développement de l'OP et des axones olfactifs (Fig.33 D et I). Cependant, il semble également y avoir plus de mort cellulaire dans tous les embryons crispants pour le Collagène IV (débris cellulaires visualisés grâce au marquage DAPI), ainsi que des embryons malformés, ce qui indique un possible effet toxique de l'injection.

A ce stade, ces résultats préliminaires ne nous permettent pas de conclure fermement sur un rôle du Collagène IV dans la morphogenèse de l'OP et la navigation des axones olfactifs aux stades étudiés. Cependant, cette protéine reste un bon candidat et il serait intéressant de poursuivre cette étude en produisant une lignée stable mutante pour chaque chaîne ($\alpha 1$ et $\alpha 5$) de Collagène IV, ainsi qu'une lignée double mutante, afin d'étudier plus précisément les défauts potentiels dans le système olfactif de ces poissons.

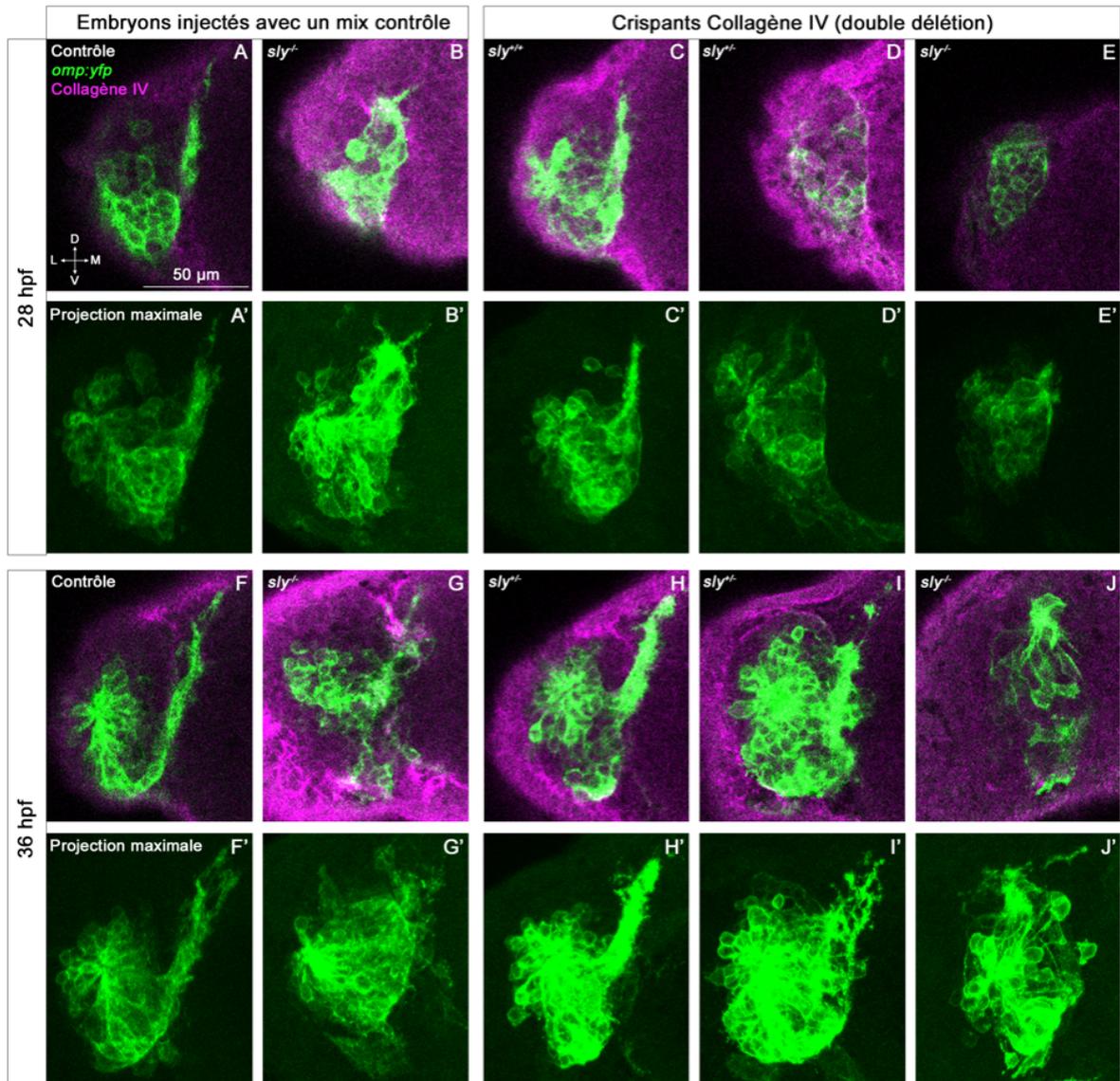


Figure 33 : **Effets de la mutation des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ du Collagène IV sur le développement du système olfactif.** Images du système olfactif d'embryons contrôles ou mutants *sly*, injectés avec un mix contrôle ou contenant les ARN guides ciblant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ du Collagène IV (Crispant Collagène IV), à 28 et 36 hpf. (A & F) Sections d'embryons *sly* homozygotes sauvages ou hétérozygotes injectés avec un mix contrôle, à 28 hpf (A) et 36 hpf (F). (B & G) Sections d'embryons *sly*^{-/-} injectés avec un mix contrôle, à 28 hpf (B) et 36 hpf (G). (C & H) Sections d'embryons *sly* homozygotes sauvages ou hétérozygotes, doubles délétés pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ du Collagène IV, à 28 hpf (C, *sly*^{+/+}) et 36 hpf (H, *sly*^{+/-}). Ces embryons ne présentent pas de défauts apparents au niveau de leurs placodes et axones. (D & I) Sections d'embryons *sly* hétérozygotes doubles délétés, à 28 hpf (D, *sly*^{+/-}) et 36 hpf (I, *sly*^{+/-}). Ces embryons ont des défauts de morphologie de placode et de projections axonales. (E & J) Sections d'embryons *sly*^{-/-} doubles délétés, à 28 hpf (E) et 36 hpf (J). Ces embryons ont des défauts de morphologie de placode et de projections axonales. (A', B', C', D', E', F', G', H', I', J') Projections maximales correspondantes, ne montrant que la *yfp*. Seule la placode gauche de chaque embryon est représentée.

II.2 Etude de l'implication des Intégrines et de leurs effecteurs

Après avoir étudié un autre composant des membranes basales, nous nous sommes tournés vers un des récepteurs connus interagissant avec la Laminine et les membranes basales, les Intégrines. Tout d'abord nous avons tenté d'utiliser un dominant négatif de l'Intégrine $\beta 1$ (*UAS:mCherry-itgb1aDN* (Iida et al. 2018)), plasmide envoyé par Atsuo Iida, Université de Nagoya, Japon). Les auteurs ont cloné un fragment correspondant à la région cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1a$ qui fait office de dominant négatif car il va se lier aux protéines intracellulaires partenaires sans pour autant déclencher de signalisation, et ainsi bloquer les effets des Intégrines $\beta 1$ endogènes (Iida et al. 2018). Malheureusement, le plasmide envoyé ne présentait pas la séquence attendue.

Nous nous sommes donc tournés vers une autre stratégie de perturbation de la fonction des intégrines, en utilisant un dominant négatif de la kinase FAK, qui est activée par les Intégrines et régule de nombreux événements de signalisation intracellulaire en aval des Intégrines (Fig.14). Nous avons récupéré un plasmide *Tol2-UAS-FRNK-GFP* (*uas-DN-FAK-GFP*) (Schaller, Borgman, et Parsons 1993). Dans ce dominant négatif, la séquence codant pour le domaine catalytique de la kinase FAK est absente et bloque la signalisation induite par la kinase FAK endogène par compétition. Nous avons ensuite produit une lignée stable en co-injectant des embryons sauvages avec ce plasmide et de l'ARNm Tol2. Les poissons issus de cette injection ont ensuite été élevés jusqu'à maturité sexuelle puis croisés avec la lignée *HuC:gal4* pour identifier des poissons transmettant le transgène à la descendance (fondateurs). Ceci a permis d'identifier quatre poissons fondateurs (F0). Dans la descendance de ces poissons, les embryons n'exprimant pas la GFP ont été élevés jusqu'à maturité sexuelle (F1) et les embryons positifs ont été fixés pour analyse du niveau d'expression de la GFP et du mosaïcisme de cette expression à 32 hpf. Deux F0 ainsi que leur descendance F1 ont été conservés (ceux qui permettent un niveau d'expression élevé et peu mosaïque) et élevés jusqu'à maturité sexuelle. Les poissons F1 ont ensuite été génotypés par PCR pour la GFP.

Pour analyser si l'expression du dominant négatif FAK a un effet soit sur la forme de la placode, soit sur la navigation des axones olfactifs, nous avons croisé les poissons F1 avec la lignée *cldnb:gal4,uas:RFP*, exprimant Gal4 notamment dans toutes les cellules de l'OP et dans la couche la plus superficielle de la peau (le périoderme). La RFP cytoplasmique permet de visualiser la croissance des axones. J'ai réalisé quatre expériences indépendantes et analysé au total 102 embryons. Il m'a été difficile d'obtenir des embryons contrôles qui

n'expriment pas la GFP, ce qui est sans doute une conséquence de multiples insertions de mon transgène dans le génome, encore présentes dans les poissons F1. De plus, chez les embryons exprimant la GFP, j'ai observé un large éventail de niveaux d'expression de la GFP, là aussi probablement une conséquence des insertions multiples du transgène dans le génome (Fig.34). En terme de morphologie des placodes, nous n'avons pas observé de phénotype particulier et, concernant les faisceaux d'axones, la morphologie (taille, épaisseur) du faisceau ne semblait pas affectée par l'expression du dominant négatif dans les cellules de l'OP (Fig.34 B, C, E, F). Comment expliquer cette absence de phénotype ? Il se peut que la kinase FAK n'intervienne pas dans le développement du système olfactif, ou bien que le niveau d'expression du dominant négatif soit trop faible pour perturber l'activité de la protéine FAK endogène. De plus, les axones, positifs pour la RFP cytoplasmique, ne présentaient pas de marquage GFP dans leur portion distale, proche du cône de croissance, suggérant que le dominant négatif de FAK n'est pas transporté dans cette zone des axones et ne peut donc pas y perturber la fonction des Intégrines. Après analyse de ces premiers résultats, nous avons donc décidé de ne pas poursuivre cette piste.

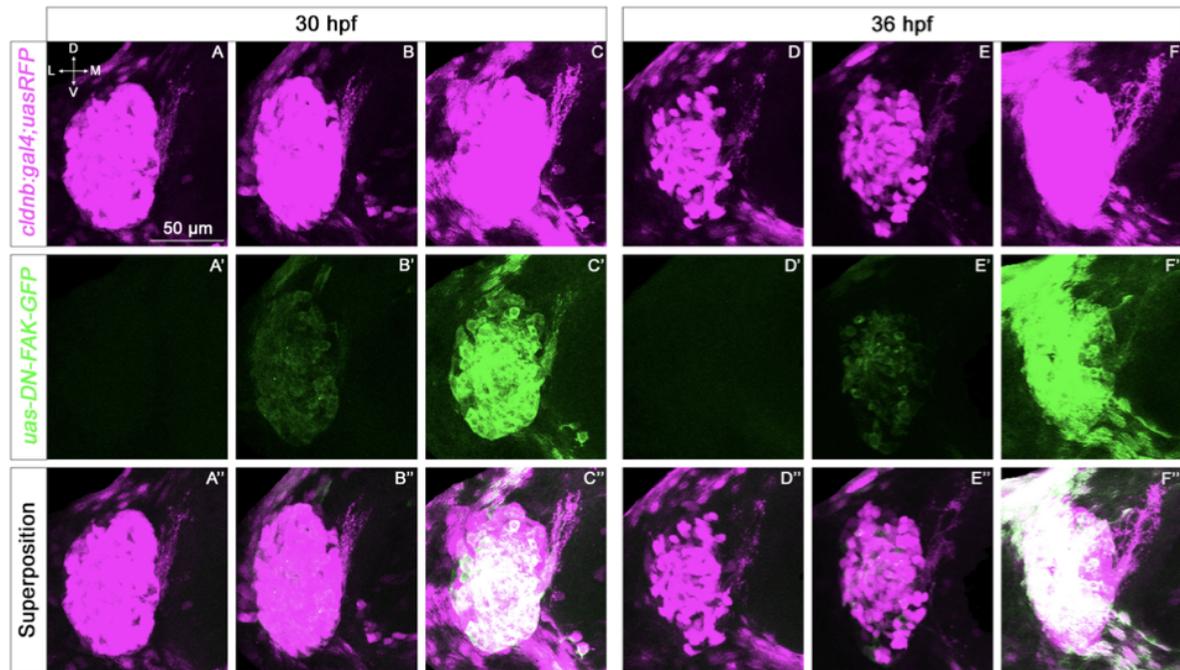


Figure 34 : Effets de l'expression d'un dominant négatif de la kinase FAK sur le développement du système olfactif. Images d'embryons issus du croisement de poissons *cldnb,gal4;uas:RFP* avec des poissons *uas:DN-FAK-GFP*, après traitement d'image par *surfcut*. (A, A', A'') Projection maximale d'un embryon n'exprimant pas le dominant négatif à 30 hpf. (B, B', B'') Projection maximale d'un embryon exprimant de manière faible et mosaïque le dominant négatif à 30 hpf. (C, C', C'') Projection maximale d'un embryon exprimant fortement le dominant négatif à 30 hpf. (D, D', D'') Projection maximale d'un embryon n'exprimant pas le dominant négatif à 36 hpf. (E, E', E'') Projection maximale d'un embryon exprimant de manière faible et mosaïque le dominant négatif à 36 hpf. (F, F', F'') Projection maximale d'un embryon exprimant fortement le dominant négatif à 36 hpf. Seule la placode gauche de chaque embryon est représentée. Aucun de ces embryons ne montre de défauts apparents de leur placode ou faisceau d'axones. A noter que, malheureusement, mes réglages d'acquisition des images, optimisés pour visualiser la RFP au niveau du faisceau d'axone, entraînent une saturation du marquage dans la placode. A l'avenir, il faudra optimiser les paramètres d'acquisition afin d'éviter la saturation du signal.

Les Rho GTPases (une sous-famille des GTPases-Ras) sont des petites protéines G monomériques qui jouent un rôle dans de nombreux processus cellulaires tels que dans la progression du cycle cellulaire, la dynamique du cytosquelette ou la polarité cellulaire. RhoA et Rac1 régulent respectivement la contraction du cytosquelette d'actomyosine et la polymérisation de l'actine (Hanovice, McMains, et Gross 2016). Nous avons essayé de perturber ces Rho GTPases car ce sont des effecteurs intracellulaires de l'activation des intégrines (Fig.14) (Cheah et Andrews 2018). Afin d'étudier leur rôle dans la navigation des axones olfactifs, nous avons exprimé des versions constitutivement actives (CA) ou

dominantes négatives (DN) de ces protéines dans les cellules de l'OP avec le système Gal4/UAS. Les Rho GTPases sont activées lorsqu'un facteur GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) permet la libération d'un GDP lié à la protéine Rho pour qu'elle lie un GTP. Les Rho GTPases sont inactivées par les GAP (*GTPases Activating Protein*) qui favorisent l'hydrolyse du GTP en GDP. Dans les versions constitutivement actives des Rho GTPases, il n'y a plus d'hydrolyse des GTP tandis que chez les dominantes négatives, une mutation fait que les Rho GTPases se lient aux GEF mais leurs interactions avec leurs effecteurs en aval sont inhibées (Heasman et Ridley 2008).

Les lignées *uas:Rac1-DN* et *uas:Rac1-CA* (produites par d'autres membres du laboratoire) ont été croisées avec la lignée *cldnb:gal4;uas:RFP* (car les constructions Rac1 possèdent une étiquette GFP), et les lignées *uas:RhoA-DN* et *uas:RhoA-CA* avec *cldnb:gal4;uas:meGFP* (car les constructions RhoA possèdent une étiquette Cherry). L'expression des constructions DN et CA de RhoA (respectivement N = 32 embryons analysés et N = 21 embryons analysés) ainsi que de la construction DN de Rac1 (N = 24 embryons analysés) n'a pas produit de phénotype sur le développement des axones olfactifs (Fig.35 A-F). Avec la lignée *uas:Rac1-CA*, les faisceaux d'axones semblaient moins denses, mais la morphogenèse précoce de la placode était également affectée (N = 23 embryons analysés) (Fig.35 H). De plus, il semblait y avoir plus de mort cellulaire dans ces embryons (débris cellulaires observés grâce au DAPI). L'absence de phénotype axonal pourrait être due à une absence de fonction de ces Rho GTPases, ou à un niveau d'expression trop faible, ou bien trop mosaïque, des différentes constructions utilisées.

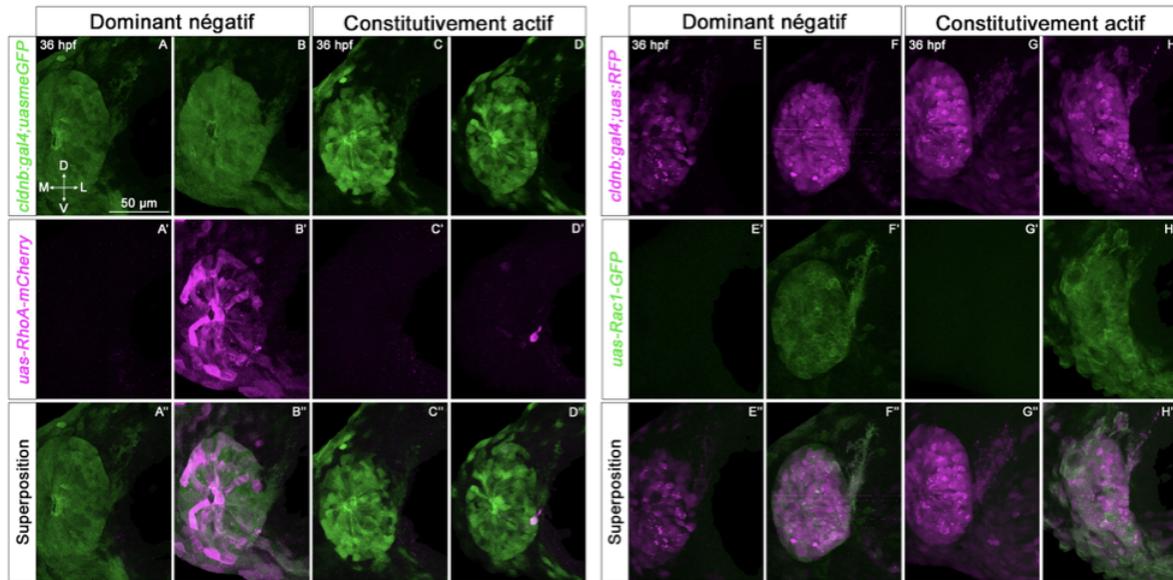


Figure 35 : Effets de l'expression de dominants négatifs (DN) ou de formes constitutivement actives (CA) de RhoA et Rac1 sur le développement du système olfactif. Images d'embryons issus du croisement de poissons *cldnb:gal4;uas:meGFP* avec des poissons *uas:RhoA-DN-mCherry* (A, B) ou *uas:RhoA-CA-mCherry* (C, D) ou du croisement de poissons *cldnb:gal4:uas:RFP* avec des poissons *uas:Rac1-DN-GFP* (E, F) ou *uas:Rac1-CA-GFP* (G, H). (A, A', A'') Projection maximale d'un embryon n'exprimant pas la version dominante négative de RhoA. (B, B', B'') Projection maximale d'un embryon exprimant la version dominante négative de RhoA. (C, C', C'') Projection maximale d'un embryon n'exprimant pas la version constitutivement active de RhoA. (D, D', D'') Projection maximale d'un embryon exprimant la version constitutivement active de RhoA. (E, E', E'') Projection maximale d'un embryon n'exprimant pas la version dominante négative de Rac1. (F, F', F'') Projection maximale d'un embryon exprimant la version dominante négative de Rac1. (G, G', G'') Projection maximale d'un embryon n'exprimant pas la version constitutivement active de Rac1. (H, H', H'') Projections maximale d'un embryon exprimant la version constitutivement active de Rac1. Aucun phénotype notable n'est observé suite à ces manipulations sauf pour l'embryon exprimant la version constitutivement active de Rac1. Seule la placode gauche de chaque embryon est représentée.

Ces analyses préliminaires ne nous permettent pas de conclure à ce jour sur un rôle des Intégrines ou de leurs effecteurs intracellulaires dans la morphogenèse de l'OP et le développement des axones olfactifs. L'implication de ces récepteurs reste donc à démontrer.

II.3 Tentative de sauvetage des mutants *sly* par l'expression du transgène *lamC1:LamC1-sfGFP*

Comme la lignée *lamC1:LamC1-sfGFP* (Yamaguchi et al. 2022) exprime de manière exogène (transgène BAC) la Laminine $\gamma 1$, chaîne qui est mutée chez les mutants *sly*^{-/-}, nous sommes demandés s'il était possible d'obtenir un sauvetage des phénotypes du mutant en croisant des poissons *sly*^{+/-};*omp:yfp* avec des poissons *sly*^{+/-}; *lamC1:LamC1-sfGFP*. A noter que dans ces expériences, nous n'avons pas pu génotyper le locus *sly*, car les amorces utilisées pour identifier l'allèle sauvage pourraient amplifier également la même séquence dans le transgène *lamC1:LamC1-sfGFP*. Nous basons donc nos analyses sur l'observation des phénotypes.

Sur les deux pontes obtenues, j'ai trié les embryons *LamC1-sfGFP* positifs d'une part et les *LamC1-sfGFP* négatifs d'autre part. Pour les deux pontes, dans les embryons *LamC1-sfGFP* négatifs (n'exprimant pas la chaîne $\gamma 1$ exogène de la Laminine), il y avait 25% d'embryons présentant une morphologie mutante (anomalies de la morphologie globale des embryons dues à des défauts de développement de la notochord et des somites) à 24 hpf et 32 hpf, c'est le pourcentage normal de transmission mendélienne. Par contre, chez les embryons *LamC1-sfGFP* positifs, il y avait seulement 0 à 2% d'embryons ayant une morphologie globale affectée ce qui suggère que l'expression de *LamC1-sfGFP* peut compenser la perte de la chaîne $\gamma 1$ chez le mutant *sly*, au moins au cours du développement de la notochorde et des somites (Fig.36 I). J'ai ensuite fixé et réalisé une immunohistochimie pour la GFP/YFP et la Laminine sur tous les embryons exprimant à la fois *LamC1-sfGFP* et le transgène *omp:yfp*, me permettant de visualiser le système olfactif : à 28 hpf, sur douze embryons, aucun embryon n'avait un phénotype du système olfactif caractéristique des mutants *sly* homozygotes (OP allongée le long de l'axe DV, cellules ectopiques, défauts de développement des axones) (Fig.36 E). Ceci suggère que la *LamC1-sfGFP* exprimée par le transgène compense la mutation *sly*^{-/-} à ce stade du développement du système olfactif, mais un plus grand nombre d'embryons devra être analysé dans le futur pour le confirmer. Par contre, à 36 hpf, trois embryons sur douze présentaient un phénotype au niveau du système olfactif, ressemblant à celui des mutants *sly* homozygotes (Fig.36. G et H).

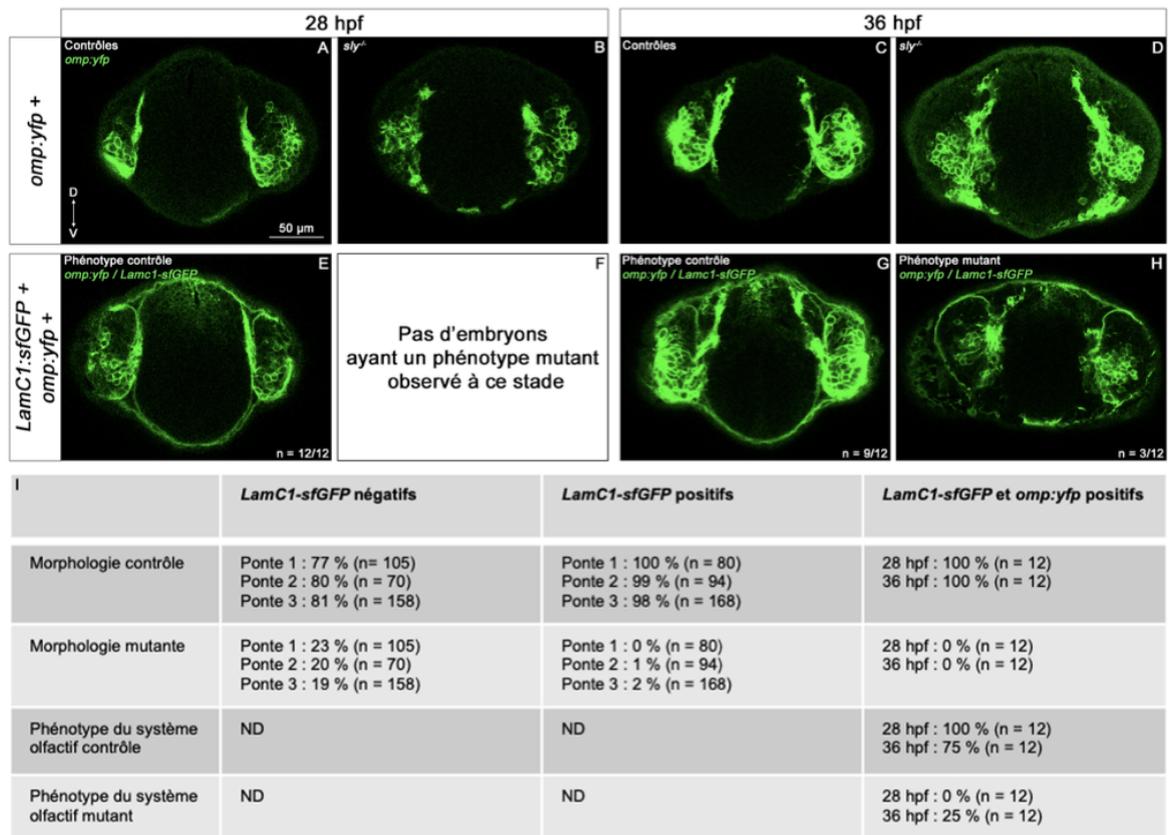


Figure 36 : Tentative de sauvetage du phénotype *sly* par croisement avec une lignée transgénique exprimant la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine. Les images présentées ont été obtenues sur des embryons issus de croisements de poissons *sly*^{+/-};*omp:yfp* avec des poissons *sly*^{+/-};*lamC1:LamC1-sfGFP*. (A & C) Sections d'embryons contrôles exprimant uniquement *omp:yfp* à 28 hpf (A) et 36 hpf (C). (B & D) Sections d'embryons mutants *sly*^{-/-} exprimant uniquement *omp:yfp* à 28 hpf (B) et 36 hpf (D). (E & G) Sections d'embryons doubles transgéniques présentant un phénotype du système olfactif normal à 28 hpf (E) et 36 hpf (G). (H) Section d'un embryon double transgénique présentant un phénotype du système olfactif "mutant" à 36 hpf. (I) Pourcentage des différents phénotypes (morphologie globale de l'embryon, et défauts du système olfactif) en fonction de la présence ou non de *LamC1-sfGFP*. On observe que parmi les embryons n'exprimant pas *LamC1-sfGFP*, quelle que soit la ponte, il y a environ trois quart d'embryons avec une morphologie globale normale et un quart avec une morphologie globale caractéristique des mutants *sly*^{-/-} (colonne de gauche, proportions attendues). A l'inverse, parmi les embryons exprimant *LamC1-sfGFP*, on n'observe que très peu d'embryons présentant une morphologie globale "mutante" (colonne du milieu). Parmi les embryons exprimant les transgènes *Lamc1-sfGFP* et *omp:yfp*, il n'y a pas d'embryons présentant une morphologie "mutante" ou un phénotype "mutant" du système olfactif à 28 hpf (0/12). Par contre, à 36 hpf, alors qu'aucun embryon analysé ne présente une morphologie mutante, 25 % (3/12) ont un phénotype mutant du système olfactif (colonne de droite). A noter que tous les embryons imagés sont issus de la ponte 1.

Ces observations suggèrent que, de manière surprenante, la *LamC1-sfGFP* exprimée par le transgène ne compense pas la mutation *sly*^{-/-} à ces stades plus tardifs du développement du

système olfactif. Le niveau d'expression de LamC1-sfGFP n'est peut être pas suffisant, ou bien l'étiquette GFP affecte la fonction de la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine spécifiquement au cours du développement du système olfactif entre 28 et 36 hpf.

A l'avenir, il faudra réitérer ces expériences afin de collecter plus d'échantillons de manière à pouvoir investiguer dans quelles mesures cette chaîne exogène permet ou pas d'assurer un sauvetage du phénotype des embryons *sly*^{-/-}.

II.4 Matériels et méthodes additionnels

Pour cette partie des résultats additionnels, j'ai globalement utilisé les mêmes outils et techniques que ceux détaillés dans la partie "*Materials and methods*" de l'article scientifique. Dans cette partie complémentaire je parlerai donc uniquement des outils qui n'ont pas encore été détaillés dans l'article.

Lignées de poisson-zèbre

En plus des lignées précédemment décrites dans la partie « Materials and Methods » de l'article, nous avons utilisé la lignée *Tg(HuC:Gal4)* (appelée *HuC:gal4* dans le texte) (Akerboom et al. 2012), la lignée *Tg(CldnB:gal4;uas:meGFP)* (appelée *cldnb:gal;uas:meGFP*) (Marie A. Breau, Wilkinson, et Xu 2013; Münzel et al. 2012), et des lignées permettant l'expression de formes dominantes négatives (DN) ou constitutivement actives (CA) des Rho GTPases sous le contrôle d'un promoteur UAS, générées par Marion Baraban, Pauline Monnot et Camille Lejeune de mon équipe d'accueil: *Tg(5xUAS:Rac1-DN-V2A-GFP)* (appelée *uas:Rac1-DN*), *Tg(5xUAS:Rac1-CA-V2A-GFP)* (appelée *uas:Rac1-CA*), *Tg(5xUAS:RhoA-DN-V2A-mCherry)* (appelée *uas:RhoA-DN*), *Tg(5xUAS:RhoA-CA-V2A-mCherry)* (appelée *uas:RhoA-CA*). Le design de ces lignées s'est inspiré de la publication Hanovice et al. 2016 (Hanovice, McMains, et Gross 2016). J'ai également construit une lignée *Tg(UAS-FRNK-GFP)* permettant l'expression d'une forme dominante négative de la kinase FAK sous le contrôle du promoteur UAS (voir partie "résultats additionnels").

Injection d'ARNm et d'ADN

Les ARNm de *Kif5c*⁵⁶⁰-*YFP* (Randlett et al. 2011), de la Cherry membranaire (Megason 2009) et de la transposase Tol2 (Kwan et al. 2007) ont été synthétisés à partir de vecteurs

pCS2 linéarisés grâce au kit de transcription SP6 mMACHINE (Ambion), puis injectés à 30 ng/μL, 80 ng/μL et 20 ng/μL respectivement. L'ADN Tol2-UAS-FRNK-GFP (envoyé par Stéphanie Woo, Université de Californie, San Francisco) a été injecté à 15 ng/μl (et co-injecté avec l'ARNm Tol2 à 20 ng/μL pour produire la lignée stable). Les injections ont eu lieu dans des embryons au stade une cellule (notamment les injections d'ADN), quatre cellules ou huit cellules en fonction des expériences et du mosaïcisme souhaité, puis maintenus à 23°C ou à 28°C jusqu'au stade désiré. Les embryons devant être fixés à 36 hpf le lendemain ont été incubés à 33°C pendant la nuit.

Injections CRISPR/Cas9 pour produire des embryons *crispants* pour le Collagène IV

Les deux sites CRISPR ciblant Col4α1 dans les exons 5 et 7 (Col4α1_G1: CTGGAATACCTGGACGTCCTGGG, Col4α1_G2 : TATAAAATGAGTCATACCGGTGG) et deux autres ciblant Col4α5 dans les exons 8 et 10 (Col4α5_G1 : TTTTGTCTATAAGACCTGGTGG, Col4α5_G2 : ATAGGCCCTTGAAGACCTGGGGG) ont été sélectionnés pour leur haute spécificité et efficacité prédites via l'outil en ligne CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). L'Alt-R crRNA et le tracrRNA commandés chez *Integrated DNA Technologies* (IDT, Coralville, IA, USA) ont été dissous dans le tampon duplex (IDT) à 100 μM chacun. Les mélanges cr:tracrRNA ont été obtenus en mélangeant la même quantité de crRNA et de tracrRNA, puis en chauffant cinq minutes à 95°C avant de laisser refroidir à température ambiante. Les quatre mélanges gRNA:Cas9 RNP ont été obtenus en incubant, pendant 10 minutes à 28°C, 1 μL de protéine Cas9 à 30 μM (TACGENE, Paris, France) avec 2 μL de mélange cr:tracrRNA pour un volume final de 10 μL de tampon d'injection (20 mM Hepes-NaOH ph 7.5, 150 mM KCl). Le mix d'injection ciblant les quatre sites CRISPR a été obtenu en mélangeant la même quantité de chaque solution gRNA:Cas9 RNP. Les embryons ont été injectés au stade une cellule avec 1 nL de mix puis maintenus à 28°C jusqu'au stade désiré. Les embryons devant être fixés à 36 hpf le lendemain ont été incubés à 33°C pendant la nuit.

Génotypage

Afin d'identifier les poissons adultes ayant intégré de manière stable le transgène *Tg(Tol2-UAS-FRNK-GFP)*, les embryons ont été génotypés par PCR avec les primers suivants, permettant d'amplifier la séquence de la GFP. GFP_F : AAGGGCGAGGAGCTGTTCA ; GFP_R : GGGCACAAGCTGGAGTACAA. Pour

identifier les crispants F0 ayant subi une délétion dans l'une et/ou l'autre des deux chaînes de Collagène, les embryons ont été génotypés par PCR avec les primers suivants :

Col4 α 5_intron7_F ATGAGCAGCCTTAAGTGAAATGC

Col4 α 5_intron10_R AATCTTATGCCAGCCCATGCC

Col4 α 1_intron4_F ACTGTTGTCTTCTGTATGTGCT

Col4 α 1_exon8_F ACAAGTTCCATACCTTTCCTCCC

Traitement d'image par *surfcut*

Pour les embryons fixés ayant l'OP, les axones olfactifs et la peau (le périoderme) marqués avec la RFP cytoplasmique (embryons *cldnb:gal;uas:RFP*), le plugin *surfcut* (Erguvan et al. 2019) a permis de supprimer des données la couche la plus superficielle des embryons. En effet, ce plugin permet d'extraire et/ou de supprimer, dans un z-stack obtenu par microscopie confocale, les signaux fluorescents présents à la surface d'un échantillon lorsque celui-ci est courbé. L'épaisseur à extraire ou à enlever est choisie par l'utilisateur. Cette manipulation nous a permis de supprimer des données la couche de la peau, pour ne visualiser en projection maximale que les structures du système olfactif (OP, axones).

Discussion et perspectives

Mes travaux de thèse mettent en évidence de nouvelles fonctions de la Laminine dans la morphogenèse des tissus et le développement des axones.

- ***Laminine et assemblage des membranes basales***

Tout d'abord, nous avons confirmé que la Laminine est présente autour de l'OP et du cerveau au sein de deux membranes basales distinctes, comme l'avait observé le laboratoire de K. Whitlock (Torres-Paz, Tine, et Whitlock 2021), qui ne se forment pas en même temps au cours du développement. Celle du cerveau est observable plus tôt, dès 14 hpf, alors que celle de l'OP se met en place lors des stades tardifs de la coalescence, entre 18 et 22 pf. De plus, il semblerait que ce soient certaines cellules de l'OP, du télencéphale ainsi que des cellules mésenchymateuses adjacentes (potentiellement les NCC) qui sécrètent la Laminine contribuant à cette membrane basale.

L'absence de la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine induit des perturbations des autres composants de la membrane basale. Dans les mutants *sly*, le Nidogène n'est plus détectable par immunohistochimie et le Collagène IV présente un patron d'expression perturbé avec seulement des *patches* de Collagène IV toujours présents à proximité de la trajectoire des axones mutants. Ces perturbations affectent l'intégrité des membranes basales comme l'ont montré les analyses réalisées sur des images de microscopie électronique qui indiquent que l'espace intercellulaire chez les mutants est considérablement réduit à l'interface OP/cerveau et contient très peu de matériel dense aux électrons.

Ces résultats confirment que la Laminine $\gamma 1$ joue un rôle primordial dans l'assemblage de la membrane basale, ce qui avait été démontré dans plusieurs autres systèmes (voir notamment (Pöschl et al. 1996; Smyth et al. 1999; Parsons, Pollard, et al. 2002; McKee et al. 2007)). A l'avenir il serait intéressant d'étudier la distribution de la Laminine et d'autres composants des membranes basales chez d'autres mutants Laminine tel que *bashful* (muté pour la chaîne $\alpha 1$ de la Laminine), *grumpy* (muté pour la chaîne $\beta 1$ de la Laminine) ou encore chez des poissons mutants pour d'autres composants de la MEC comme le mutant *dragnet* (muté pour la chaîne $\alpha 5$ du Collagène IV (Xiao et Baier 2007)), ou dans les lignées simples et doubles mutantes pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ du Collagène IV que l'on aura produites au sein du

laboratoire. Nous pourrions également regarder la distribution de la Laminine et du Collagène IV dans des lignées mutantes pour le Nidogène (comme *nid1b*^{sa13713} ou *nid2a*^{sa15802} (Kettleborough et al. 2013)). Les hybridations *in situ* réalisées par Carrara 2019 montrent que *nid1b* et *nid2a* sont effectivement exprimés autour des OP (Fig.11) (Carrara et al. 2019), sans doute par les NCC (Bryan et al. 2020).

- **Laminine et morphogenèse de l'OP**

Aux stades de coalescence de l'OP, la mutation de la Laminine $\gamma 1$ n'induit pas de défauts majeurs dans la morphogenèse de l'OP, cette dernière étant seulement légèrement plus grande selon l'axe ML. Cette augmentation n'est pas due à une augmentation du déplacement des cellules lors de la coalescence comme l'ont montré mes films sur les embryons *sly*^{-/-};*ngn1*:*gfp*. Il n'est pas impossible que cette augmentation de la taille du tissu selon l'axe ML soit due à l'absence de NCC entre l'OP et le cerveau aux stades précoces, car nous avons identifié que le développement des NCC est affecté chez les mutants *sly*. En effet, des quantifications publiées par Monnot et al 2022 montre que chez les mutants *foxd3*, dans lesquels la migration des NCC est retardée, il y a une augmentation de la taille ML de l'OP à 21 hpf, de l'ordre de celle que l'on observe dans nos mutants *sly*^{-/-}. Nous avons vu que la Laminine de la membrane basale terminait de s'assembler autour de l'OP autour de 18-22 hpf. Il est donc possible que cette augmentation ML de la taille de la placode soit complètement indépendante de la Laminine et soit uniquement causée par l'absence de NCC. Sans Laminine, l'OP aurait donc plus de place pour s'étendre en ML en l'absence de NCC. A l'avenir il serait intéressant de réaliser des quantifications similaires chez les doubles mutants *tfap2a*;*foxd3* qui présentent une perte presque totale des NCC céphaliques, alors que dans le mutant *foxd3* seul, la migration des NCC n'est que partiellement affectée (Arduini, Bosse, et Henion 2009; Bryan et al. 2020).

La seule différence notable sur la dynamique des cellules de l'OP aux stades de coalescence est le *shift* antérieur observé dans leurs déplacements, potentiellement provoqué par le mouvement antérieur des cellules du cerveau qui entraînerait vers l'avant les cellules postérieures de l'OP. Ce mouvement antérieur des cellules du cerveau semble d'ailleurs exacerbé dans les mutants *sly*. Lors d'une précédente étude menée au sein de mon laboratoire d'accueil (M. A. Breau et al. 2017), Marie Breau a observé que les cellules postérieures de l'OP présentaient un déplacement antérieur corrélé avec le déplacement antérieur de cellules

du cerveau qui a lieu lors de la coalescence des OP. Il est possible qu'en l'absence de Laminine/de membranes basales autour du cerveau et de l'OP, les cellules de l'OP soient encore plus entraînées par ce déplacement antérieur du cerveau car (i) il est plus intense et (ii) elles ne peuvent plus y résister. La Laminine et les membranes basales permettraient ainsi aux tissus de résister aux différents mouvements de morphogenèse.

Après la fin de la coalescence, au moment où le mouvement de flexure du cerveau antérieur (qui a une forte composante/implication en DV) se produit, on voit que l'OP est plus allongée en DV chez les mutants *sly* que chez les contrôles, allongement qui n'est pas causé par une augmentation de la prolifération des cellules, et de nombreuses cellules ectopiques sont présentes autour des OP. De plus, les cellules du cerveau et surtout de l'OP, qui présentent un déplacement ventral à ces stades, ont tendance à se déplacer de façon plus directionnelle (leur MSD (*Mean Square Displacement*) est augmenté) chez les embryons mutants. Comme pour le *shift* antérieur observé lors de la coalescence, il est possible que la Laminine (ou les membranes basales) empêche la flexure d'influencer la trajectoire et la vitesse des cellules de l'OP et leur permet de résister aux potentielles forces de traction induites par ce mouvement. Si l'OP est entraînée par le cerveau lors du *shift* antérieur et du mouvement de flexure du cerveau, il y a de fortes chances qu'elle soit soumise à une tension supérieure chez les mutants. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences d'ablations laser, dans lesquelles la vitesse immédiate d'ouverture du tissu de part et d'autre de l'ablation permet d'évaluer la tension de ce tissu. Nous pourrions par exemple réaliser des ablations linéaires selon l'axe ML au milieu des OP contrôles et mutants afin de mesurer la tension dorso-ventrale à laquelle l'OP est soumise, à différents stades de développement. Nous nous attendons à ce que chez les mutants la tension soit plus élevée. Cette technique d'ablation laser à l'échelle tissulaire a déjà été réalisée au sein de mon laboratoire d'accueil (Monnot et al. 2022) et permettrait de conclure sur une potentielle augmentation de la tension à laquelle les OP sont soumises chez les embryons *sly*^{-/-}.

Pendant la flexure, les trajectoires des cellules des OP mutantes présentent également un déplacement médial et les OP se rapprochent l'une de l'autre au cours du temps, alors que chez les contrôles leur déplacement est latéral. De plus, l'épaisseur du cerveau est significativement réduite chez les mutants *sly*, notamment à proximité des OP. Nos acquisitions en 3D montrent que les placodes sont presque encastrées dans le tissu du cerveau, indiquant que la frontière entre les deux tissus n'est pas bien mise en place en

absence de membranes basales. Nos analyses de la forme de la frontière OP/cerveau ont démontré que chez les mutants la frontière est moins droite. Nos résultats montrent donc que la Laminine (ou les membranes basales) joue un rôle de barrière physique qui permet de bien séparer les deux tissus, comme l'avaient proposé Torres-Paz, Tine, et Whitlock 2021, en analysant la distribution de la Laminine dans cette région de l'embryon.

- ***Laminine et développement des axones olfactifs***

Une fois les deux membranes basales de l'OP et du cerveau formées, la Laminine, ainsi que d'autres composants des membranes basales, le Nidogène et le Collagène IV, sont présents autour des deux tissus. Les seuls endroits où l'on détecte une interruption des membranes basales à ces stades sont (i) au niveau de point de sortie des axones olfactifs de l'OP, (ii) au niveau de leur point d'entrée dans le cerveau et (iii) au-dessus de la rosette de dendrites d'OSN, là où se forme la narine. Nos films avec la lignée *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP)* suggèrent que le point de sortie se forme par l'assemblage incomplet de la membrane basale aux stades tardifs de la coalescence, tandis que le point d'entrée est généré par création d'une ouverture dans la membrane basale du cerveau. Les mécanismes qui contrôlent la formation de ces interruptions ne sont pas connus dans notre système. Pour la formation du point de sortie des axones olfactifs, il est possible que les cellules de l'OP et/ou les cellules environnantes sécrètent des molécules empêchant l'assemblage local de la Laminine, ce qui pourrait expliquer l'absence de membrane basale au point de sortie des axones. Il est également possible que ce mécanisme soit régulé par une sécrétion locale de MMP (*Matrix Metalloproteinases*), connues pour cliver de multiples composants des membranes basales (Nagase et Woessner 1999), ce clivage pourrait avoir lieu juste après l'assemblage de la Laminine. Plus simplement, il est également possible qu'il n'y ait pas du tout de dégradation de la Laminine au niveau du point de sortie des axones et qu'il s'agisse uniquement d'un assemblage non complet de la membrane basale. La formation du point d'entrée des axones dans le cerveau résulte, elle, forcément d'une dégradation ou d'une déformation locale de la membrane basale étant donné que celle-ci est continue avant que les axones ne pénètrent dans le cerveau. Il est possible que les axones olfactifs eux-mêmes sécrètent des protéases permettant de dégrader la membrane basale préalablement assemblée au niveau du point d'entrée dans le cerveau.

Nous avons vu que certains neurones olfactifs ont leur axones ancrés à la surface du cerveau chez des mutants *sly*, et qu'il y a un mouvement latéral des cellules de OP pendant la coalescence, observé grâce aux films réalisés sur les embryons *sly*^{-/-};*ngn1:gfp*. Cela suggère que la Laminine ne supprime pas ce mécanisme d'extension rétrograde des axones olfactifs à la fin de la coalescence pour au moins certains axones chez le mutant. Nous avons essayé de regarder si ce mécanisme était perturbé chez les mutants *sly*, en visualisant de manière mosaïque les axones olfactifs et pour l'instant nos observations suggèrent que l'extension rétrograde peut se faire au moins pour certains axones mutants, mais des quantifications seraient nécessaires.

A l'avenir, il faudra également analyser en détail la polarité des neurones dans les mutants, par exemple en utilisant le marqueur de spécification axonale *Kif5C⁵⁶⁰-YFP*, car la polarité neuronale est perturbée dans d'autres contextes lorsque la Laminine est perturbée (Randlett et al. 2011).

Nous avons montré que, suite à leur extension rétrograde qui précède leur sortie de la placode, la croissance des axones se fait en deux temps. Tout d'abord, dès leur sortie de l'OP, les cônes de croissance des axones olfactifs font un brusque virage et migrent dorsalement entre les membranes basales de l'OP et du cerveau. Ensuite, ils pénètrent dans le cerveau par le point d'entrée et continuent leur navigation le long de la membrane basale dorsale du cerveau. Ces observations suggèrent que les cônes de croissances des axones olfactifs suivent la membrane basale qui leur sert de substrat permettant aux axones de migrer. Chez les mutants n'ayant plus de Laminine, les membranes basales sont fortement perturbées avec notamment une absence de Nidogène et une modification de l'expression du Collagène IV. D'autres composants que nous n'avons pas étudiés sont probablement également absents et/ou perturbés. Il est donc difficile de déterminer lequel des composants de la membrane basale est responsable du guidage des axones olfactifs. La Laminine reste néanmoins un bon candidat, de nombreuses études ayant montré son implication dans la navigation de différents axones dans de nombreux systèmes. Par exemple, *in vitro*, la Laminine participe à la navigation des neurones de la racine dorsale du poulet (Kuhn, Schmidt, et Kater 1995), des neurones hippocampaux chez la souris (Esch, Lemmon, et Banker 1999; Abe et al. 2018; 2021) et *in vivo* chez le poisson-zèbre, elle influence la navigation de plusieurs populations d'axones (Wolman et al. 2008; Paulus et Halloran 2006; Semina et al. 2006; Karlstrom et al. 1996). De plus, il a été montré que la Laminine *in vitro* promeut la croissance des axones des

neurones olfactifs et est présente *in vivo* dans la zone du nerf olfactif chez les rongeurs (K. W. Kafitz et Greer 1999; Whitesides et LaMantia 1996).

Il est possible que la Laminine et les membranes basales fonctionnent de paire avec d'autres molécules de signalisation. Par exemple, on sait qu'un des couples signal/récepteur qui régule la croissance des axones olfactif est *Robo/Slit* (N. Miyasaka 2005; Madelaine, Garric, et Blader 2011), or *Slit* se lie au Dystroglycan (Wright et al. 2012), un des récepteurs principal de la Laminine, et donc interagit physiquement avec la membrane basale. Il est donc possible que, par l'intermédiaire du Dystroglycan, la Laminine participe à la navigation de certaines axones. Enfin, la présence ou l'absence de Laminine peut modifier la réponse des axones aux signaux *Slit in vitro* (Nguyen-Ba-Charvet et al. 2001). La présence de Laminine peut également moduler la réponse à une autre molécule de guidage, la *Nétrine-1* (Weinl et al. 2003; Höpker et al. 1999), qui avec son récepteur *DCC* jouent un rôle dans la navigation des axones des OSN ciliés (Lakhina et al. 2012; Dang et al. 2023). On peut donc penser qu'en l'absence de Laminine, la réponse des axones aux *Slit* ainsi qu'à la *Nétrine-1* est modifiée et induit au moins certains défauts de navigation que nous observons chez les mutants *sly*. Comment ces différentes protéines interagissent les unes avec les autres reste à déterminer.

Une autre protéine candidate est Tag1 (*Transient Axonal Glycoprotein 1*), une molécule d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines qui participe à la navigation des axones du nucMLF chez le poisson-zèbre. Un KO de cette protéine induit des défauts en partie similaires à ceux observés chez des mutants pour la chaîne $\alpha 1$ de la Laminine (Wolman et al. 2008). Le rôle de Tag1 dans le système olfactif de poisson-zèbre est actuellement étudié au sein de mon laboratoire d'accueil par Karen Pottin afin de déterminer si cette protéine joue un rôle dans le développement des axones olfactifs *in vivo*.

Chez les mutants *sly*, il y a des défauts sévères de navigation des axones olfactifs. Ces derniers peinent à sortir de l'OP, ne forment pas de faisceau fasciculé et leur trajectoire est fortement perturbée. Tout d'abord, l'absence de Laminine autour de l'OP et donc l'absence d'un point de sortie défini provoque une désorganisation des axones à l'intérieur de la placode qui ne trouvent pas de sortie commune. Le fait que les quelques axones qui parviennent à sortir dorsalement de l'OP se dirigent vers la zone présomptive de l'OB renforce l'idée que, bien que la présence de Laminine soit essentielle au guidage correct des axones olfactifs chez le poisson-zèbre, d'autres processus de guidage sont maintenus chez les mutants *sly*.

Dans le futur, il serait intéressant de savoir comment se comporte le cytosquelette des axones dans le contexte mutant. Nous pourrions par exemple réaliser des films sur des embryons sauvages et mutants exprimant des rapporteurs fluorescents pour certains éléments du cytosquelette (actine, myosin II, microtubules), ces outils sont présents au sein du laboratoire. Nous pourrions également visualiser les signaux calciques accompagnant le développement axonal dans les deux contextes, pour regarder comment l'absence de Laminine peut influencer ce type de signalisation dans les axones olfactifs. En effet, la signalisation induite par le calcium influence la croissance des neurites, la motilité des cônes de croissance, le branching des axones ainsi que la dynamique du cytosquelette des cônes de croissance (pour revue voir Gomez et Zheng 2006; Henley et Poo 2004). Chez les poisson-zèbre il est possible de visualiser l'activité calcique en utilisant des lignées transgéniques exprimant des sondes de type GCaMP dont l'intensité de la fluorescence augmente suite à la liaison d'ions calciums (Nakai, Ohkura, et Imoto 2001).

- ***Rôle potentiel du Collagène IV***

Nous avons observé que chez les mutants *sly*, des *patches* de Collagène IV étaient toujours présents à proximité de la trajectoire des axones qui parviennent à sortir de l'OP. Il est possible que ce composant des membranes basales participe au guidage de ces axones, ce qui expliquerait que lorsque des résidus de Collagène IV sont toujours présents chez le mutant, certains axones parviennent à migrer vers le bulbe. Le Collagène IV ne se lie pas directement à la Laminine au sein des membranes basales, il est lié au Nidogène qui lui est lié à la Laminine (McKee et al. 2007). On peut penser qu'en absence de Laminine, les dépôts de Collagène IV attendus dans les membranes basales se produisent, mais que, comme il n'y a plus de formation de réseaux possible avec la Laminine et le Nidogène (qui lui est absent), il s'accumule sous forme de *patches*. Il serait intéressant de regarder chez des mutants *sly* à des stades plus tardifs si on retrouve toujours ces accumulations/*patches* de Collagène IV. Il est en effet possible que les défauts de la membrane basale deviennent plus importants au cours du temps comme l'ont vu l'équipe de D. Stemple en microscopie électronique, avec des perturbations plus marquées à 32 hpf en comparaison avec 24 hpf dans la notochorde (Parsons, Pollard, et al. 2002).

Pour tester le rôle du Collagène IV dans les contextes contrôles et mutants, nous avons produit des embryons F0 crispants pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ du Collagène IV. Chez les crispants présentant une délétion sur les deux chaînes du Collagène IV ($\alpha 1$ et $\alpha 5$), le

marquage Collagène IV est toujours présent avec une distribution “normale” (identique à celle des embryons sauvages, avec une accumulation aux membranes basales et sous forme d’un réseau fibreux autour de l’OP) chez les embryons crispants *sly*^{+/-} et *sly*^{+/+}, et sous forme de *patches* fibreux chez les crispants *sly*^{-/-}. Il est possible que, comme nous le détectons avec un anticorps polyclonal, d’autres chaînes *col4 α* soient reconnues par l’anticorps. Une autre hypothèse serait qu’une partie des chaînes de Collagène IV α 1 et/ou α 5 sont quand mêmes produites dans les crispants, ainsi l’anticorps pourrait reconnaître la partie de la protéine qui se trouve avant la délétion ou bien les protéines pour lesquelles la délétion permet de garder la même phase de la séquence protéique. Même si les chaînes α 1 et α 5 sont présentes dans les trois trimères du collagène IV, il est également possible qu’en leur absence l’activation de l’expression d’autres chaînes *col4 α* compensent leur perte (phénomène de compensation génétique qui inclut potentiellement de la redondance fonctionnelle, des réarrangement du réseau génétique et parfois l’acquisition de mutations adaptatives (pour revue voir El-Brolosy et Stainier 2017; El-Brolosy et al. 2019; Kontarakis et Stainier 2020). Nous avons choisi de nous concentrer sur les embryons avec une double délétion des chaînes α 1 et α 5 du Collagène IV, et de ne pas analyser les embryons présentant une délétion simple pour l’une ou l’autre des chaînes dans ces expériences, car le statut précis du gène codant pour l’autre chaîne (présence d’*indels* produisant ou non un décalage de lecture ou l’apparition d’un codon stop) ne peut être connu que par PCR suivie de séquençage. Les expériences avec les crispants F0 sont en général complexes car il est difficile techniquement d’établir un lien précis entre phénotype et génotype de l’embryon. A l’avenir, nous pourrions générer des lignées de mutants stables à partir des embryons injectés. Le Collagène IV reste un bon candidat pour médier le guidage des axones olfactifs car nos analyses très préliminaires suggèrent l’existence de défauts dans la navigation de ces axones dans les crispants. L’objectif serait également de croiser des embryons mutants pour l’une, l’autre ou les deux chaînes de Collagène IV α 1 et α 5 avec des poissons *sly* afin de voir si les défauts observés sur les axones sont encore plus drastiques.

- ***Qu’en est-il des récepteurs de la Laminine ?***

Malheureusement nous n’avons pas pu tester l’implication des Intégrines dans le développement du système olfactif. A l’avenir, il serait intéressant de déterminer quelles isoformes des Intégrines sont exprimées par les neurones de l’OP puis d’analyser les différents mutants correspondants, ou bien de générer/utiliser des formes dominantes

négatives. Nous pourrions également injecter des antagonistes des Intégrines tel que le peptide RGD qui agit sur de nombreux dimères des Intégrines *in vitro* et *in vivo* (Ruoslahti 1996) ou l'Echistatine (Becker, McLane, et Becker 2003).

Nous avons essayé de perturber la signalisation en aval des Intégrines avec un dominant négatif de la kinase FAK et des versions dominantes négatives ou constitutivement actives des Rho GTPases. Malheureusement l'absence de phénotype observé après expression du dominant négatif de FAK ne nous permet pas de conclure sur le rôle potentiel de cette kinase dans la navigation des axones olfactifs ni dans la morphogenèse de l'OP, car cette absence de défaut pourrait être due à un niveau d'expression trop faible du dominant négatif. Le niveau d'expression était très variable et nous n'avons malheureusement pas obtenu assez d'embryons contrôles n'exprimant pas le dominant négatif. Il faudrait arriver à stabiliser cette lignée (en isolant les différentes insertions du transgène) afin d'avoir des niveaux d'expression reproductibles et plus d'embryons contrôles par expérience.

En ce qui concerne les Rho GTPases, l'expression des versions dominantes négatives et constitutivement actives de RhoA était très mosaïque et celle du dominant négatif de Rac1 n'engendrait pas de perturbation notable. Pour *uas-Rac1-CA*, même si nous avons observé des faisceaux d'axones plus ou moins denses, la morphogenèse de l'OP semblait également très affectée et il y avait une augmentation de la mort cellulaire dans tout l'embryon. Les défauts axonaux peuvent donc être une conséquence indirecte de phénotypes plus précoces. Il pourrait être intéressant d'induire une perturbation globale du cytosquelette avec des drogues par exemple, et d'observer le comportement des axones olfactifs à mes stades d'intérêts. Nous pourrions traiter les embryons avec du Colcémide, une drogue qui perturbe la polymérisation des microtubules (Norden et al. 2009), de la Blebbistatine qui perturbe l'activité de la Myosine II ou Rockout qui perturbe l'activité d'un activateur en amont de la Myosine II (M. A. Breau et al. 2017).

Nous pourrions également étudier le rôle du Dystroglycan, récepteur de la Laminine qui pourraient intervenir étant donné qu'il se lie à *Slit* (Wright et al. 2012), qui intervient dans la navigation des axones olfactifs chez le poisson-zèbre (N. Miyasaka 2005; Madelaine, Garric, et Blader 2011). Des expériences d'hybridations *in situ* chez le poisson-zèbre montrent que *DAG1* est exprimé dans le cerveau en développement, l'oeil et dans la queue à la fin de la somitogenèse puis dans le cerveau antérieur, le mésencéphale, l'oeil et la vésicule auditive à 30 hpf (Christopher J. Moore, Goh, et Hewitt 2008), ce qui en fait un candidat plausible pour participer à la morphogenèse de l'OP et la navigation des axones olfactifs. Une autre équipe a

identifié un mutant, *pachytail*, muté pour *DAG1*, et chez qui il y a une diminution de l'ARNm *DAG1* et de la protéine Dystroglycan. A 5 jours post fécondation, cette mutation affecte la structure de l'œil au niveau de la couche ganglionnaire, du cristallin et de la cornée mais aussi celle du SNC, notamment la structure du mésencéphale et du cervelet (Gupta et al. 2011). Nous pourrions utiliser ce mutant et observer au niveau du système olfactif si on voit des perturbations. Il existe également un morpholino dirigé contre le Dystroglycan mais celui-ci n'induit apparemment pas de défaut dans le cerveau du poisson-zèbre (Parsons, Campos, et al. 2002).

- **Réintroduction de la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine de manière exogène**

De manière surprenante, il semblerait que l'expression exogène de LamC1-sfGFP ne permette pas de rétablir un phénotype complètement sauvage chez les mutants *sly*. En effet, dans nos expériences avec la lignée transgénique *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP)*, même si la morphologie globale des embryons semble être restaurée en présence du transgène, cela n'est pas le cas des défauts du système olfactif, au moins pour les embryons à 36 hpf. L'équipe de H. Knaut (Yamaguchi et al. 2022) a observé que chez leurs mutants $\gamma 1$ LamC1-sfGFP positifs, certains embryons avaient un phénotype (morphologie de l'embryon) partiellement "mutant" à 48 hpf (N = 72/94 des embryons avaient un phénotype sauvage et N = 22/94 ont un phénotype partiellement mutant). Il est possible qu'aux stades précoces l'expression du transgène, combinée à l'expression maternelle de la Laminine, permettent de maintenir un phénotype sauvage, cela expliquerait pourquoi à 28 hpf nous n'avons pas observé d'OP mutantes chez 12 embryons exprimant LamC1-sfGFP. Pour tester cette hypothèse, il faudrait refaire ces expériences, en analysant à la fois des stades encore plus précoces mais aussi plus tardifs pour voir si l'apparition des phénotypes est seulement retardée en présence du transgène. Même si Yamaguchi et al. (2022) ont observé un phénotype "*mild*" dans leurs embryons mutants Laminine exprimant le transgène LamC1-sfGFP, ils n'ont pas noté de défauts de migration du primordium de la ligne latérale postérieure (Yamaguchi et al. 2022). Il se pourrait que le transgène rétablisse le phénotype sauvage uniquement dans certaines zones/tissus des embryons et pas d'autres, ce qui, transposé à notre problématique, ne facilite pas nos analyses.

Il est possible que ce soit l'expression hétérozygote du transgène (une seule copie) qui empêche un sauvetage total, ou bien la fusion de la sfGFP à la Laminine $\gamma 1$ qui pourrait affecter sa fonction spécifiquement dans les OP à des stades tardifs. Il est peu probable que le

transgène BAC récapitule mal le patron d'expression de la Laminine car nos immunomarquages réalisés sur des embryons non mutants montrent un marquage similaire entre la Laminine endogène et le transgène. Cependant, ces expériences ont été réalisées seulement à des stades précoces (entre 17 et 40 hpf) et il semble nécessaire de réaliser des marquages similaires plus tardivement afin de vérifier que le patron d'expression du transgène correspond toujours à celui de la Laminine endogène.

- ***Autonomie du phénotype mutant sly***

L'analyse des mutants *sly*^{-/-} ne permet pas de déterminer si les défauts observés en l'absence de Laminine (membranes basales, forme de l'OP, migration des axones olfactifs) sont des effets cellulaires autonomes ou non. Pour répondre à cette question, il faudrait réaliser des expériences de transplantations de cellules mutantes dans des embryons sauvages et *vice-versa*. Comme l'ont fait les auteurs de Parsons et al. 2002 en transplantant des cellules issues d'embryons mutants *sly* et *gup* (mutés pour la chaîne β 1 de la Laminine) dans des embryons contrôles et *vice-versa* pour étudier le développement de la notochorde (Parsons, Pollard, et al. 2002) ou les auteurs de Randlett 2011 qui ont transplanté des cellules d'embryons contrôles dans des embryons injectés avec un morpholino ciblant la Laminine γ 1 pour étudier la croissance des axones des RGC (Randlett et al. 2011). Dans la notochorde, les phénotypes observés chez les mutants sont à la fois cellule-autonome et non cellule-autonome (Parsons, Pollard, et al. 2002). Par contre, dans les RGC, le phénotype n'est pas cellule autonome (Randlett et al. 2011). L'avantage du poisson-zèbre est que, grâce aux cartes de destin cellulaire établies au stade *shield* (voir par exemple (Kozlowski et al. 1997), nous pouvons transplanter les cellules dans les zones de l'embryon précoce qui donneront le cerveau antérieur *versus* les placodes olfactives (M. A. Breau et al. 2017).

Conclusion

La Laminine ainsi que les membranes basales contrôlent de nombreux mécanismes qui permettent d'assurer le bon développement et la survie des cellules en contribuant à l'élaboration de signaux mécaniques et chimiques régulant leur biologie. Bien que les différents composants des membranes basales soient extensivement étudiés depuis les années 70, de nombreux rôles restent à découvrir, notamment l'implication des membranes basales dans des processus développementaux *in vivo*. En effet, de part leur implication très précoces dans le développement, les pertes de fonctions et mutations sont généralement létales chez les embryons.

Lors de ma thèse, j'ai étudié le rôle de la sous-unité $\gamma 1$ de la Laminine dans le développement du système olfactif chez le poisson-zèbre. Mes résultats montrent que la Laminine est essentielle à l'assemblage des membranes basales : en son absence, l'intégrité de ces dernières est fortement affectée. La Laminine joue également un rôle minime dans la coalescence de la placode olfactive et un rôle important dans le maintien de sa forme au cours du temps. En effet, mes résultats suggèrent que la présence de Laminine entourant la placode olfactive lui permet de résister aux mouvements des cellules adjacentes provoqués par le déplacement antérieur de cellules du cerveau lors de la coalescence, puis par le mouvement ventral global de toute la tête de l'embryon lors du mouvement de flexure. Enfin, la Laminine permet également aux axones olfactifs de naviguer correctement vers leur cible dans le cerveau, le bulbe olfactif. Non seulement la distribution de la Laminine en conditions normales lui suggère un rôle de substrat pour la croissance des axones olfactifs, mais de plus, en son absence, leur navigation est fortement perturbée. Ces résultats démontrent l'implication de la Laminine et des membranes basales associées dans le maintien de la forme et de la position des placodes olfactives au cours du développement et dans le développement des axones olfactifs.

Bibliographie

- Abe, Kouki, Kentarou Baba, Liguang Huang, Koay Teng Wei, Kazunori Okano, Yoichiro Hosokawa, et Naoyuki Inagaki. 2021. « Mechanosensitive Axon Outgrowth Mediated by L1-Laminin Clutch Interface ». *Biophysical Journal* 120 (17): 3566-76. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.08.009>.
- Abe, Kouki, Hiroko Katsuno, Michinori Toriyama, Kentarou Baba, Tomoyuki Mori, Toshio Hakoshima, Yonehiro Kanemura, Rikiya Watanabe, et Naoyuki Inagaki. 2018. « Grip and Slip of L1-CAM on Adhesive Substrates Direct Growth Cone Haptotaxis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (11): 2764-69. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711667115>.
- Ablooglu, Ararat J., Jian Kang, Robert I. Handin, David Traver, et Sanford J. Shattil. 2007. « The Zebrafish Vitronectin Receptor: Characterization of Integrin *AV* and *B3* Expression Patterns in Early Vertebrate Development ». *Developmental Dynamics* 236 (8): 2268-76. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21229>.
- Aguillon, R., P. Blader, et J. Batut. 2016. « Patterning, Morphogenesis, and Neurogenesis of Zebrafish Cranial Sensory Placodes ». In *Methods in Cell Biology*, 134:33-67. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.01.002>.
- Aguillon, Raphaël, Julie Batut, Arul Subramanian, Romain Madelaine, Pascale Dufourcq, Thomas F Schilling, et Patrick Blader. 2018. « Cell-Type Heterogeneity in the Early Zebrafish Olfactory Epithelium Is Generated from Progenitors within Preplacodal Ectoderm ». *ELife* 7 (janvier): e32041. <https://doi.org/10.7554/eLife.32041>.
- Aguillon, Raphaël, Romain Madelaine, Harendra Guturu, Sandra Link, Pascale Dufourcq, Virginie Lecaudey, Gill Bejerano, Patrick Blader, et Julie Batut. 2019. « Morphogenesis Is Transcriptionally Coupled to Neurogenesis during Peripheral Olfactory Organ Development ». Preprint. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/725705>.
- Akerboom, Jasper, Tsai-Wen Chen, Trevor J. Wardill, Lin Tian, Jonathan S. Marvin, Sevinç Mutlu, Nicole Carreras Calderón, et al. 2012. « Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging ». *The Journal of Neuroscience* 32 (40): 13819-40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012>.
- Akins, Michael R., et Charles A. Greer. 2006. « Cytoskeletal Organization of the Developing Mouse Olfactory Nerve Layer ». *The Journal of Comparative Neurology* 494 (2): 358-67. <https://doi.org/10.1002/cne.20814>.
- Amsterdam, Adam, Robert M. Nissen, Zhaoxia Sun, Eric C. Swindell, Sarah Farrington, et Nancy Hopkins. 2004. « Identification of 315 Genes Essential for Early Zebrafish Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (35): 12792-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403929101>.
- Arduini, Brigitte L., Kevin M. Bosse, et Paul D. Henion. 2009. « Genetic Ablation of Neural Crest Cell Diversification ». *Development* 136 (12): 1987-94. <https://doi.org/10.1242/dev.033209>.
- Argo, Silke, Franco Weth, et Sigrun I. Korsching. 2003. « Analysis of Penetrance and Expressivity during Ontogenesis Supports a Stochastic Choice of Zebrafish Odorant Receptors from Predetermined Groups of Receptor Genes: Quantitative Analysis of Zebrafish OR Gene Expression ». *European Journal of Neuroscience* 17 (4): 833-43. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02505.x>.
- Arrington, Cammon B., et H. Joseph Yost. 2009. « Extra-Embryonic Syndecan 2 Regulates Organ Primordia Migration and Fibrillogenesis throughout the Zebrafish Embryo ». *Development* 136 (18): 3143-52. <https://doi.org/10.1242/dev.031492>.

- Aumailley, Monique, Cristina Battaglia, Ulrike Mayer, Dieter Reinhardt, Roswitha Nischt, Rupert Timpl, et Jay W. Fox. 1993. « Nidogen Mediates the Formation of Ternary Complexes of Basement Membrane Components ». *Kidney International* 43 (1): 7-12. <https://doi.org/10.1038/ki.1993.3>.
- Bagri, Anil, Oscar Marín, Andrew S. Plump, Judy Mak, Samuel J. Pleasure, John L.R. Rubenstein, et Marc Tessier-Lavigne. 2002. « Slit Proteins Prevent Midline Crossing and Determine the Dorsoventral Position of Major Axonal Pathways in the Mammalian Forebrain ». *Neuron* 33 (2): 233-48. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00561-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00561-5).
- Baier, H, et S Korsching. 1994. « Olfactory Glomeruli in the Zebrafish Form an Invariant Pattern and Are Identifiable across Animals ». *The Journal of Neuroscience* 14 (1): 219-30. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00219.1994>.
- Baraban, Marion, Clara Gordillo Pi, Isabelle Bonnet, Jean-François Gilles, Camille Lejeune, Mélody Cabrera, Florian Tep, et Marie Anne Breau. 2023. « Actomyosin Contractility in Olfactory Placode Neurons Opens the Skin Epithelium to Form the Zebrafish Nostril ». *Developmental Cell* 58 (5): 361-375.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.02.001>.
- Barresi, Rita, et Kevin P. Campbell. 2006. « Dystroglycan: From Biosynthesis to Pathogenesis of Human Disease ». *Journal of Cell Science* 119 (2): 199-207. <https://doi.org/10.1242/jcs.02814>.
- Barth, Alison L, Nicholas J Justice, et John Ngai. 1996. « Asynchronous Onset of Odorant Receptor Expression in the Developing Zebrafish Olfactory System ». *Neuron* 16 (1): 23-34. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80020-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80020-3).
- Becker, Thomas, Mary Ann McLane, et Catherina G Becker. 2003. « Integrin Antagonists Affect Growth and Pathfinding of Ventral Motor Nerves in the Trunk of Embryonic Zebrafish ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 23 (1): 54-68. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00018-6).
- Bello, Valérie, Nicole Moreau, Cathy Sirour, Magdalena Hidalgo, Nicolas Buisson, et Thierry Darrivière. 2015. « The Dystroglycan: Nestled in an Adhesome during Embryonic Development ». *Developmental Biology* 401 (1): 132-42. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.07.006>.
- Belvindrah, Richard, Sabine Hankel, John Walker, Bruce L. Patton, et Ulrich Müller. 2007. « B1 Integrins Control the Formation of Cell Chains in the Adult Rostral Migratory Stream ». *The Journal of Neuroscience* 27 (10): 2704-17. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2991-06.2007>.
- Biehlmaier, Oliver, Yuri Makhankov, et Stephan C. F. Neuhaus. 2007. « Impaired Retinal Differentiation and Maintenance in Zebrafish Laminin Mutants ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (6): 2887. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1212>.
- Blader, Patrick, Charles Plessy, et Uwe Strähle. 2003. « Multiple Regulatory Elements with Spatially and Temporally Distinct Activities Control Neurogenin1 Expression in Primary Neurons of the Zebrafish Embryo ». *Mechanisms of Development* 120 (2): 211-18. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00413-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00413-6).
- Bonner, Jennifer, et Timothy P. O'Connor. 2001. « The Permissive Cue Laminin Is Essential for Growth Cone Turning *In Vivo* ». *The Journal of Neuroscience* 21 (24): 9782-91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09782.2001>.
- Bonod-Bidaud, Christelle, Muriel Roulet, Uwe Hansen, Ahmed Elsheikh, Marilyne Malbouyres, Sylvie Ricard-Blum, Clément Faye, Elisabeth Vaganay, Patricia Rousselle, et Florence Ruggiero. 2012. « In Vivo Evidence for a Bridging Role of a Collagen V Subtype at the Epidermis–Dermis Interface ». *Journal of Investigative Dermatology* 132 (7): 1841-49. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.56>.

- Brandslet Steinar 2021. « Human sense of smell resemble that of insects ». *Medical press* : <https://medicalxpress.com/news/2021-10-human-resembles-insects.html>
- Braubach, O. R., N. Miyasaka, T. Koide, Y. Yoshihara, R. P. Croll, et A. Fine. 2013. « Experience-Dependent versus Experience-Independent Postembryonic Development of Distinct Groups of Zebrafish Olfactory Glomeruli ». *Journal of Neuroscience* 33 (16): 6905-16. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5185-12.2013>.
- Braubach, Oliver R., Alan Fine, et Roger P. Croll. 2012. « Distribution and Functional Organization of Glomeruli in the Olfactory Bulbs of Zebrafish (*Danio Rerio*) ». *The Journal of Comparative Neurology* 520 (11): 2317-39. <https://doi.org/10.1002/cne.23075>.
- Breau, M. A., I. Bonnet, J. Stoufflet, J. Xie, S. De Castro, et S. Schneider-Maunoury. 2017. « Extrinsic Mechanical Forces Mediate Retrograde Axon Extension in a Developing Neuronal Circuit ». *Nature Communications* 8 (1): 282. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00283-3>.
- Breau, Marie A., David G. Wilkinson, et Qiling Xu. 2013. « A Hox Gene Controls Lateral Line Cell Migration by Regulating Chemokine Receptor Expression Downstream of Wnt Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (42): 16892-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306282110>.
- Breau, Marie Anne, et Sylvie Schneider-Maunoury. 2014. « Mechanisms of Cranial Placode Assembly ». *The International Journal of Developmental Biology* 58 (1): 9-19. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130351mb>.
- Bryan, Chase D., Macaulie A. Casey, Rebecca L. Pfeiffer, Bryan W. Jones, et Kristen M. Kwan. 2020. « Optic Cup Morphogenesis Requires Neural Crest-Mediated Basement Membrane Assembly ». *Development*, janvier, dev.181420. <https://doi.org/10.1242/dev.181420>.
- Bryan, Chase D., Chi-Bin Chien, et Kristen M. Kwan. 2016. « Loss of Laminin Alpha 1 Results in Multiple Structural Defects and Divergent Effects on Adhesion during Vertebrate Optic Cup Morphogenesis ». *Developmental Biology* 416 (2): 324-37. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.025>.
- Buck, L., et R. Axel. 1991. « A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors: A Molecular Basis for Odor Recognition ». *Cell* 65 (1): 175-87. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90418-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90418-x).
- Calvo-Ochoa, Erika, et Christine Byrd-Jacobs. 2019. « The Olfactory System of Zebrafish as a Model for the Study of Neurotoxicity and Injury: Implications for Neuroplasticity and Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (7): 1639. <https://doi.org/10.3390/ijms20071639>.
- Campbell, I. D., et M. J. Humphries. 2011. « Integrin Structure, Activation, and Interactions ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (3): a004994-a004994. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004994>.
- Canty, Elizabeth G., Yinhui Lu, Roger S. Meadows, Michael K. Shaw, David F. Holmes, et Karl E. Kadler. 2004. « Coalignment of Plasma Membrane Channels and Protrusions (Fibripositors) Specifies the Parallelism of Tendon ». *Journal of Cell Biology* 165 (4): 553-63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312071>.
- Carrara, Nicholas, Megan Weaver, Warlen Pereira Piedade, Oliver Vöcking, et J.K. Famulski. 2019. « Temporal Characterization of Optic Fissure Basement Membrane Composition Suggests Nidogen May Be an Initial Target of Remodeling ». *Developmental Biology* 452 (1): 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.04.012>.
- Castellanos, Barbara S., Nayeli G. Reyes-Nava, et Anita M. Quintana. 2021. « Knockdown of Hspg2 Is Associated with Abnormal Mandibular Joint Formation and Neural Crest Cell Dysfunction in Zebrafish ». *BMC Developmental Biology* 21 (1): 7.

- <https://doi.org/10.1186/s12861-021-00238-4>.
- Castro, Liliana, Cedric Yapo, et Pierre Vincent. 2016. « Physiopathologie de la signalisation AMPc/PKA dans les neurones ». *Biologie Aujourd'hui* 210 (4): 191-203. <https://doi.org/10.1051/jbio/2017005>.
- Cavodeassi, Florencia. 2018. « Dynamic Tissue Rearrangements during Vertebrate Eye Morphogenesis: Insights from Fish Models ». *Journal of Developmental Biology* 6 (1): 4. <https://doi.org/10.3390/jdb6010004>.
- Charvet, Benjamin, Alexandre Guiraud, Marilyne Malbouyres, Daniela Zwolanek, Emilie Guillon, Sandrine Bretaud, Catherine Monnot, et al. 2013. « Knockdown of *Col22a1* Gene in Zebrafish Induces a Muscular Dystrophy by Disruption of the Myotendinous Junction ». *Development* 140 (22): 4602-13. <https://doi.org/10.1242/dev.096024>.
- Cheah, Menghon, et Melissa Andrews. 2018. « Integrin Activation: Implications for Axon Regeneration ». *Cells* 7 (3): 20. <https://doi.org/10.3390/cells7030020>.
- Chen, Zu-Lin, Véronique Haegeli, Huaxu Yu, et Sidney Strickland. 2009. « Cortical Deficiency of Laminin Γ 1 Impairs the AKT/GSK-3 β Signaling Pathway and Leads to Defects in Neurite Outgrowth and Neuronal Migration ». *Developmental Biology* 327 (1): 158-68. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.12.006>.
- Cheng, Jason S, Dena B Dubal, Daniel H Kim, Justin Legleiter, Irene H Cheng, Gui-Qiu Yu, Ina Tesseur, Tony Wyss-Coray, Paolo Bonaldo, et Lennart Mucke. 2009. « Collagen VI Protects Neurons against A β Toxicity ». *Nature Neuroscience* 12 (2): 119-21. <https://doi.org/10.1038/nn.2240>.
- Cheng, Ryan P., Puneet Dang, Alemji A. Taku, Yoon Ji Moon, Vi Pham, Xiaohe Sun, Ethan Zhao, et Jonathan A. Raper. 2022. « Loss of Neuropilin2a/b or Sema3fa Alters Olfactory Sensory Axon Dynamics and Protoglomerular Targeting ». *Neural Development* 17 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s13064-021-00157-x>.
- Christiansen, Helena E., Michael R. Lang, James M. Pace, et David M. Parichy. 2009. « Critical Early Roles for Col27a1a and Col27a1b in Zebrafish Notochord Morphogenesis, Vertebral Mineralization and Post-Embryonic Axial Growth ». Édité par Michael Hendricks. *PLoS ONE* 4 (12): e8481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008481>.
- Dang, Puneet, Daniel T. Barnes, Ryan P. Cheng, Alison Xu, Yoon Ji Moon, Sai Sripad Kodukula, et Jonathan A. Raper. 2023. « Netrins and Netrin Receptors Are Essential for Normal Targeting of Sensory Axons in the Zebrafish Olfactory Bulb ». *Neuroscience* 508 (janvier): 19-29. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.08.004>.
- Dang, Puneet, Stephen A. Fisher, Derek J. Stefanik, Junhyong Kim, et Jonathan A. Raper. 2018. « Coordination of Olfactory Receptor Choice with Guidance Receptor Expression and Function in Olfactory Sensory Neurons ». Édité par Cecilia Moens. *PLOS Genetics* 14 (1): e1007164. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007164>.
- Dolez, M., J.-F. Nicolas, et E. Hirsinger. 2011. « Laminins, via Heparan Sulfate Proteoglycans, Participate in Zebrafish Myotome Morphogenesis by Modulating the Pattern of Bmp Responsiveness ». *Development* 138 (5): 1015-1015. <https://doi.org/10.1242/dev.065151>.
- Domogatskaya, Anna, Sergey Rodin, et Karl Tryggvason. 2012. « Functional Diversity of Laminins ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28 (1): 523-53. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155750>.
- Drago, John, Victor Nurcombe, et Perry F. Bartlett. 1991. « Laminin through Its Long Arm E8 Fragment Promotes the Proliferation and Differentiation of Murine Neuroepithelial Cells in Vitro ». *Experimental Cell Research* 192 (1): 256-65. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90184-V](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90184-V).

- Duggan, C. D., S. DeMaria, A. Baudhuin, D. Stafford, et J. Ngai. 2008. « Foxg1 Is Required for Development of the Vertebrate Olfactory System ». *Journal of Neuroscience* 28 (20): 5229-39. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1134-08.2008>.
- Durbeej, Madeleine. 2010. « Laminins ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 259-68. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0838-2>.
- Dynes, Joseph L, et John Ngai. 1998. « Pathfinding of Olfactory Neuron Axons to Stereotyped Glomerular Targets Revealed by Dynamic Imaging in Living Zebrafish Embryos ». *Neuron* 20 (6): 1081-91. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80490-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80490-0).
- El-Brolosy, Mohamed A., Zacharias Kontarakis, Andrea Rossi, Carsten Kuenne, Stefan Günther, Nana Fukuda, Khrievono Kikhi, et al. 2019. « Genetic Compensation Triggered by Mutant mRNA Degradation ». *Nature* 568 (7751): 193-97. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1064-z>.
- El-Brolosy, Mohamed A., et Didier Y. R. Stainier. 2017. « Genetic Compensation: A Phenomenon in Search of Mechanisms ». Édité par Cecilia Moens. *PLOS Genetics* 13 (7): e1006780. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006780>.
- Erguvan, Özer, Marion Louveaux, Olivier Hamant, et Stéphane Verger. 2019. « ImageJ SurfCut: A User-Friendly Pipeline for High-Throughput Extraction of Cell Contours from 3D Image Stacks ». *BMC Biology* 17 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0657-1>.
- Esch, Teresa, Vance Lemmon, et Gary Banker. 1999. « Local Presentation of Substrate Molecules Directs Axon Specification by Cultured Hippocampal Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 19 (15): 6417-26. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-15-06417.1999>.
- Esterberg, Robert, et Andreas Fritz. 2009. « Dlx3b/4b Are Required for the Formation of the Preplacodal Region and Otic Placode through Local Modulation of BMP Activity ». *Developmental Biology* 325 (1): 189-99. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.017>.
- Falat, Elizabeth J., Gabriella C. Voit, et Jennifer H. Gutzman. 2022. « Laminin-111 Mutant Studies Reveal a Hierarchy within Laminin-111 Genes in Their Requirement for Basal Epithelial Tissue Folding ». *Developmental Biology* 492 (décembre): 172-86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.10.006>.
- Fleischmajer, Raul, Alan Schechter, Marco Bruns, Jerome S. Perlish, E. Douglas MacDonald, Te-Cheng Pan, Rupert Timpl, et Mon-Li Chu. 1995. « Skin Fibroblasts Are the Only Source of Nidogen During Early Basal Lamina Formation In Vitro ». *Journal of Investigative Dermatology* 105 (4): 597-601. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12323604>.
- Forrester, W. C., et G. Garriga. 1997. « Genes Necessary for C. Elegans Cell and Growth Cone Migrations ». *Development (Cambridge, England)* 124 (9): 1831-43. <https://doi.org/10.1242/dev.124.9.1831>.
- Fox, J.W., U. Mayer, R. Nischt, M. Aumailley, D. Reinhardt, H. Wiedemann, K. Mann, R. Timpl, T. Krieg, et J. Engel. 1991. « Recombinant Nidogen Consists of Three Globular Domains and Mediates Binding of Laminin to Collagen Type IV. » *The EMBO Journal* 10 (11): 3137-46. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04875.x>.
- Fox, Michael A. 2008. « Novel Roles for Collagens in Wiring the Vertebrate Nervous System ». *Current Opinion in Cell Biology* 20 (5): 508-13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.05.003>.
- Fox, Michael A., Joshua R. Sanes, Dorin-Bogdan Borza, Veraragavan P. Eswarakumar, Reinhard Fässler, Billy G. Hudson, Simon W.M. John, et al. 2007. « Distinct Target-Derived Signals Organize Formation, Maturation, and Maintenance of Motor Nerve Terminals ». *Cell* 129 (1): 179-93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.035>.

- Frade, José M., Juan R. Martínez-Morales, et Alfredo Rodríguez-Tébar. 1996. « Laminin-1 Selectively Stimulates Neuron Generation from Cultured Retinal Neuroepithelial Cells ». *Experimental Cell Research* 222 (1): 140-49. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0018>.
- Franzke, Claus-Werner, Peter Bruckner, et Leena Bruckner-Tuderman. 2005. « Collagenous Transmembrane Proteins: Recent Insights into Biology and Pathology* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (6): 4005-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400034200>.
- Fricke, Cornelia, Jeong-Soo Lee, Silke Geiger-Rudolph, Friedrich Bonhoeffer, et Chi-Bin Chien. 2001. « *Astray*, a Zebrafish *Roundabout* Homolog Required for Retinal Axon Guidance ». *Science* 292 (5516): 507-10. <https://doi.org/10.1126/science.1059496>.
- Friedrich, Rainer W, et Sigrun I Korsching. 1997. « Combinatorial and Chemotopic Odorant Coding in the Zebrafish Olfactory Bulb Visualized by Optical Imaging ». *Neuron* 18 (5): 737-52. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80314-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80314-1).
- Friedrich, Rainer W., et Sigrun I. Korsching. 1998. « Chemotopic, Combinatorial, and Noncombinatorial Odorant Representations in the Olfactory Bulb Revealed Using a Voltage-Sensitive Axon Tracer ». *The Journal of Neuroscience* 18 (23): 9977-88. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09977.1998>.
- García-Alonso, Luis, Richard D. Fetter, et Corey S. Goodman. 1996. « Genetic Analysis of *Laminin A* in *Drosophila*: Extracellular Matrix Containing Laminin A Is Required for Ocellar Axon Pathfinding ». *Development* 122 (9): 2611-21. <https://doi.org/10.1242/dev.122.9.2611>.
- Gomez, Timothy M., et James Q. Zheng. 2006. « The Molecular Basis for Calcium-Dependent Axon Pathfinding ». *Nature Reviews Neuroscience* 7 (2): 115-25. <https://doi.org/10.1038/nrn1844>.
- Gordon, Marion K., et Rita A. Hahn. 2010. « Collagens ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 247-57. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4>.
- Grant, Paul K, et Cecilia B Moens. 2010. « The Neuroepithelial Basement Membrane Serves as a Boundary and a Substrate for Neuron Migration in the Zebrafish Hindbrain ». *Neural Development* 5 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-5-9>.
- Guillon, Emilie, Sandrine Bretaud, et Florence Ruggiero. 2016. « Slow Muscle Precursors Lay Down a Collagen XV Matrix Fingerprint to Guide Motor Axon Navigation ». *The Journal of Neuroscience* 36 (9): 2663-76. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2847-15.2016>.
- Gupta, Vandana, Genri Kawahara, Stacey R. Gundry, Aye T. Chen, Wayne I. Lencer, Yi Zhou, Leonard I. Zon, Louis M. Kunkel, et Alan H. Beggs. 2011. « The Zebrafish *Dag1* Mutant: A Novel Genetic Model for Dystroglycanopathies ». *Human Molecular Genetics* 20 (9): 1712-25. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr047>.
- Halfter, Willi, Philipp Oertle, Christophe A. Monnier, Leon Camenzind, Magaly Reyes-Lua, Huaiyu Hu, Joseph Candiello, et al. 2015. « New Concepts in Basement Membrane Biology ». *The FEBS Journal* 282 (23): 4466-79. <https://doi.org/10.1111/febs.13495>.
- Hanovice, Nicholas J., Emily McMains, et Jeffrey M. Gross. 2016. « A GAL4-Inducible Transgenic Tool Kit for the in Vivo Modulation of Rho GTPase Activity in Zebrafish: Modulating Rho GTPase Activity in Zebrafish ». *Developmental Dynamics* 245 (8): 844-53. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24412>.
- Hansen, Anne, et Eckart Zeiske. 1993. « Development of the Olfactory Organ in the Zebrafish, *Brachydanio rerio* ». *The Journal of Comparative Neurology* 333 (2): 289-300. <https://doi.org/10.1002/cne.903330213>.
- Hansson, Bill S., et Marcus C. Stensmyr. 2011. « Evolution of Insect Olfaction ». *Neuron* 72 (5): 698-711. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.003>.
- Harden, Maegan V., Luisa Pereiro, Mirana Ramialison, Jochen Wittbrodt, Megana K. Prasad,

- Andrew S. McCallion, et Kathleen E. Whitlock. 2012. « Close Association of Olfactory Placode Precursors and Cranial Neural Crest Cells Does Not Predestine Cell Mixing ». *Developmental Dynamics* 241 (7): 1143-54. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23797>.
- Hauptmann, Giselbert, et Thomas Gerster. 2000. « Regulatory Gene Expression Patterns Reveal Transverse and Longitudinal Subdivisions of the Embryonic Zebrafish Forebrain ». *Mechanisms of Development*, 14.
- Heasman, Sarah J., et Anne J. Ridley. 2008. « Mammalian Rho GTPases: New Insights into Their Functions from in Vivo Studies ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (9): 690-701. <https://doi.org/10.1038/nrm2476>.
- Heaton, M. B., et D. J. Swanson. 1988. « The Influence of Laminin on the Initial Differentiation of Cultured Neural Tube Neurons ». *Journal of Neuroscience Research* 19 (2): 212-18. <https://doi.org/10.1002/jnr.490190206>.
- Hedgecock, Edward M., Joseph G. Culotti, J. Nichol Thomson, et Elizabeth A. Perkins. 1985. « Axonal Guidance Mutants of *Caenorhabditis elegans* Identified by Filling Sensory Neurons with Fluorescein Dyes ». *Developmental Biology* 111 (1): 158-70. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90443-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90443-9).
- Heino, Jyrki. 2007. « The Collagen Family Members as Cell Adhesion Proteins ». *BioEssays* 29 (10): 1001-10. <https://doi.org/10.1002/bies.20636>.
- Heino, Jyrki, Mikko Huhtala, Jarmo Käpylä, et Mark S. Johnson. 2009. « Evolution of Collagen-Based Adhesion Systems ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (2): 341-48. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.021>.
- Henley, John, et Mu-ming Poo. 2004. « Guiding Neuronal Growth Cones Using Ca²⁺ Signals ». *Trends in Cell Biology* 14 (6): 320-30. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.04.006>.
- Henry, Michael D, et Kevin P Campbell. 1998. « A Role for Dystroglycan in Basement Membrane Assembly ». *Cell* 95 (6): 859-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81708-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81708-0).
- Hienola, Anni, Sarka Tumova, Evgeny Kuleskiy, et Heikki Rauvala. 2006. « N-Syndecan Deficiency Impairs Neural Migration in Brain ». *Journal of Cell Biology* 174 (4): 569-80. <https://doi.org/10.1083/jcb.200602043>.
- Ho, Matthew S.P., Kerstin Böse, Sharada Mokkapati, Roswitha Nischt, et Neil Smyth. 2008. « Nidogens—Extracellular Matrix Linker Molecules ». *Microscopy Research and Technique* 71 (5): 387-95. <https://doi.org/10.1002/jemt.20567>.
- Hohenester, Erhard. 2019. « Structural Biology of Laminins ». Édité par Josephine Adams. *Essays in Biochemistry* 63 (3): 285-95. <https://doi.org/10.1042/EBC20180075>.
- Hohenester, Erhard, et Peter D. Yurchenco. 2013. « Laminins in Basement Membrane Assembly ». *Cell Adhesion & Migration* 7 (1): 56-63. <https://doi.org/10.4161/cam.21831>.
- Hong, K., L. Hinck, M. Nishiyama, M. M. Poo, M. Tessier-Lavigne, et E. Stein. 1999. « A Ligand-Gated Association between Cytoplasmic Domains of UNC5 and DCC Family Receptors Converts Netrin-Induced Growth Cone Attraction to Repulsion ». *Cell* 97 (7): 927-41. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80804-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80804-1).
- Höpker, Veit H., Derryck Shewan, Marc Tessier-Lavigne, Mu-ming Poo, et Christine Holt. 1999. « Growth-Cone Attraction to Netrin-1 Is Converted to Repulsion by Laminin-1 ». *Nature* 401 (6748): 69-73. <https://doi.org/10.1038/43441>.
- Huang, Cheng-chen, David H. Hall, Edward M. Hedgecock, Gautam Kao, Vassiliki Karantza, Bruce E. Vogel, Harald Hutter, Andrew D. Chisholm, Peter D. Yurchenco, et William G. Wadsworth. 2003. « Laminin α Subunits and Their Role in *C. elegans* Development ». *Development* 130 (14): 3343-58. <https://doi.org/10.1242/dev.00481>.

- Humphries, Jonathan D., Adam Byron, et Martin J. Humphries. 2006. « Integrin Ligands at a Glance ». *Journal of Cell Science* 119 (19): 3901-3. <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>.
- Hynes, Richard O. 2002. « Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines ». *Cell* 110 (6): 673-87. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6).
- Iida, Atsuo, Zi Wang, Hiromi Hirata, et Atsuko Sehara-Fujisawa. 2018. « Integrin B1 Activity Is Required for Cardiovascular Formation in Zebrafish ». *Genes to Cells* 23 (11): 938-51. <https://doi.org/10.1111/gtc.12641>.
- Imai, T., H. Sakano, et L. B. Vosshall. 2010. « Topographic Mapping--The Olfactory System ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (8): a001776-a001776. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001776>.
- Imai, Takeshi. 2014. « Construction of Functional Neuronal Circuitry in the Olfactory Bulb ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 35 (novembre): 180-88. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.012>.
- Imai, Takeshi, et Hitoshi Sakano. 2008. « Odorant Receptor-Mediated Signaling in the Mouse ». *Current Opinion in Neurobiology* 18 (3): 251-60. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.07.009>.
- . 2011. « Axon-Axon Interactions in Neuronal Circuit Assembly: Lessons from Olfactory Map Formation: Axon-Axon Interactions in Olfactory Map Formation ». *European Journal of Neuroscience* 34 (10): 1647-54. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07817.x>.
- Iozzo, Renato V., et Liliana Schaefer. 2015. « Proteoglycan Form and Function: A Comprehensive Nomenclature of Proteoglycans ». *Matrix Biology* 42 (mars): 11-55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>.
- Ishii, N., W. G. Wadsworth, B. D. Stern, J. G. Culotti, et E. M. Hedgecock. 1992. « UNC-6, a Laminin-Related Protein, Guides Cell and Pioneer Axon Migrations in *C. Elegans* ». *Neuron* 9 (5): 873-81. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90240-e](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90240-e).
- Ivanovitch, Kenzo, Florencia Cavodeassi, et Stephen W. Wilson. 2013. « Precocious Acquisition of Neuroepithelial Character in the Eye Field Underlies the Onset of Eye Morphogenesis ». *Developmental Cell* 27 (3): 293-305. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.023>.
- Jacobson, Catherine, Bruce Schnapp, et Gary A. Banker. 2006. « A Change in the Selective Translocation of the Kinesin-1 Motor Domain Marks the Initial Specification of the Axon ». *Neuron* 49 (6): 797-804. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.005>.
- Johnson, Robert P., Seong Hoon Kang, et James M. Kramer. 2006. « *C. Elegans* Dystroglycan DGN-1 Functions in Epithelia and Neurons, but Not Muscle, and Independently of Dystrophin ». *Development* 133 (10): 1911-21. <https://doi.org/10.1242/dev.02363>.
- Julliard, A.K., et D.J. Hartmann. 1998. « Spatiotemporal Patterns of Expression of Extracellular Matrix Molecules in the Developing and Adult Rat Olfactory System ». *Neuroscience* 84 (4): 1135-50. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00544-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00544-7).
- Kadler, K. 1995. « Extracellular Matrix 1: Fibril-Forming Collagens ». *Protein Profile* 2 (5): 491-619.
- Kafitz, K. W., et C. A. Greer. 1999. « Olfactory Ensheathing Cells Promote Neurite Extension from Embryonic Olfactory Receptor Cells in Vitro ». *Glia* 25 (2): 99-110.
- Kafitz, Karl W., et Charles A. Greer. 1997. « Role of Laminin in Axonal Extension from Olfactory Receptor Cells ». *Journal of Neurobiology* 32 (3): 298-310. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199703\)32:3<298::AID-NEU4>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199703)32:3<298::AID-NEU4>3.0.CO;2-2).
- . 1998. « Differential Expression of Extracellular Matrix and Cell Adhesion Molecules in the Olfactory Nerve and Glomerular Layers of Adult Rats ». *Journal of Neurobiology* 34 (3): 271-82.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(19980215\)34:3<271::AID-NEU6>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(19980215)34:3<271::AID-NEU6>3.0.CO;2-#).

- Karlstrom, R. O., T. Trowe, S. Klostermann, H. Baier, M. Brand, A. D. Crawford, B. Grunewald, et al. 1996. « Zebrafish Mutations Affecting Retinotectal Axon Pathfinding ». *Development (Cambridge, England)* 123 (décembre): 427-38. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.427>.
- Kaupp, U. Benjamin. 2010. « Olfactory Signalling in Vertebrates and Insects: Differences and Commonalities ». *Nature Reviews Neuroscience* 11 (3): 188-200. <https://doi.org/10.1038/nrn2789>.
- Kettleborough, Ross N. W., Elisabeth M. Busch-Nentwich, Steven A. Harvey, Christopher M. Dooley, Ewart de Bruijn, Freek van Eeden, Ian Sealy, et al. 2013. « A Systematic Genome-Wide Analysis of Zebrafish Protein-Coding Gene Function ». *Nature* 496 (7446): 494-97. <https://doi.org/10.1038/nature11992>.
- Khoshnoodi, Jamshid, Jean-Philippe Cartailier, Keith Alvares, Arthur Veis, et Billy G. Hudson. 2006. « Molecular Recognition in the Assembly of Collagens: Terminal Noncollagenous Domains Are Key Recognition Modules in the Formation of Triple Helical Protomers ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (50): 38117-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600025200>.
- Khoshnoodi, Jamshid, Vadim Pedchenko, et Billy G. Hudson. 2008. « Mammalian Collagen IV ». *Microscopy Research and Technique* 71 (5): 357-70. <https://doi.org/10.1002/jemt.20564>.
- Kidd, Thomas, Kimberly S Bland, et Corey S Goodman. 1999. « Slit Is the Midline Repellent for the Robo Receptor in Drosophila ». *Cell* 96 (6): 785-94. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80589-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80589-9).
- Kim, Woo Kyung, Deokhoon Kim, Jun Cui, Ho Hee Jang, Kwang Sei Kim, Hong Jun Lee, Seung U. Kim, et Sung-Min Ahn. 2014. « Secretome Analysis of Human Oligodendrocytes Derived from Neural Stem Cells ». Édité par Cesar V. Borlongan. *PLoS ONE* 9 (1): e84292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084292>.
- Kimmel, Charles B., William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, et Thomas F. Schilling. 1995. « Stages of Embryonic Development of the Zebrafish ». *Developmental Dynamics* 203 (3): 253-310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
- Klass, C.M., J.R. Couchman, et A. Woods. 2000. « Control of Extracellular Matrix Assembly by Syndecan-2 Proteoglycan ». *Journal of Cell Science* 113 (3): 493-506. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.3.493>.
- Klein, G., M. Ekblom, L. Fecker, R. Timpl, et P. Ekblom. 1990. « Differential Expression of Laminin A and B Chains during Development of Embryonic Mouse Organs ». *Development (Cambridge, England)* 110 (3): 823-37. <https://doi.org/10.1242/dev.110.3.823>.
- Kohfeldt, Eddie, Takako Sasaki, Walter Göhring, et Rupert Timpl. 1998. « Nidogen-2: A New Basement Membrane Protein with Diverse Binding Properties ». *Journal of Molecular Biology* 282 (1): 99-109. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2004>.
- Kontarakis, Zacharias, et Didier Y.R. Stainier. 2020. « Genetics in Light of Transcriptional Adaptation ». *Trends in Genetics* 36 (12): 926-35. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.08.008>.
- Kozlowski, David J, Tohru Murakami, Robert K Ho, et Eric S Weinberg. 1997. « Regional Cell Movement and Tissue Patterning in the Zebrafish Embryo Revealed by Fate Mapping with Caged Fluorescein » 75.
- Kuhn, Thomas B, Marc F Schmidt, et Stanley B Kater. 1995. « Laminin and Fibronectin Guideposts Signal Sustained but Opposite Effects to Passing Growth Cones ». *Neuron* 14 (2): 275-85. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90285-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90285-6).

- Kwan, Kristen M., Esther Fujimoto, Clemens Grabher, Benjamin D. Mangum, Melissa E. Hardy, Douglas S. Campbell, John M. Parant, H. Joseph Yost, John P. Kanki, et Chi-Bin Chien. 2007. « The Tol2kit: A Multisite Gateway-Based Construction Kit For Tol2 Transposon Transgenesis Constructs ». *Developmental Dynamics* 236 (11): 3088-99. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21343>.
- Kwan, Kristen M., Hideo Otsuna, Hinako Kidokoro, Keith R. Carney, Yukio Saijoh, et Chi-Bin Chien. 2012. « A Complex Choreography of Cell Movements Shapes the Vertebrate Eye ». *Development* 139 (2): 359-72. <https://doi.org/10.1242/dev.071407>.
- Lakhina, V., C. L. Marcaccio, X. Shao, M. E. Lush, R. A. Jain, E. Fujimoto, J. L. Bonkowsky, M. Granato, et J. A. Raper. 2012. « Netrin/DCC Signaling Guides Olfactory Sensory Axons to Their Correct Location in the Olfactory Bulb ». *Journal of Neuroscience* 32 (13): 4440-56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4442-11.2012>.
- Lawson, Nathan D., et Brant M. Weinstein. 2002. « In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish ». *Developmental Biology* 248 (2): 307-18. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0711>.
- Lee, Jiwoon, et Jeffrey M. Gross. 2007. « Laminin B1 and Γ 1 Containing Laminins Are Essential for Basement Membrane Integrity in the Zebrafish Eye ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (6): 2483. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1211>.
- Leitinger, Birgit, et Erhard Hohenester. 2007. « Mammalian Collagen Receptors ». *Matrix Biology* 26 (3): 146-55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.007>.
- Levic, Daniel S., Naoya Yamaguchi, Siyao Wang, Holger Knaut, et Michel Bagnat. 2021. « Knock-in Tagging in Zebrafish Facilitated by Insertion into Non-Coding Regions ». *Development* 148 (19): dev199994. <https://doi.org/10.1242/dev.199994>.
- Li, Shaohua, David Edgar, Reinhard Fässler, William Wadsworth, et Peter D Yurchenco. 2003. « The Role of Laminin in Embryonic Cell Polarization and Tissue Organization ». *Developmental Cell* 4 (5): 613-24. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00128-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00128-X).
- Li, Shaohua, David Harrison, Salvatore Carbonetto, Reinhard Fässler, Neil Smyth, David Edgar, et Peter D. Yurchenco. 2002. « Matrix Assembly, Regulation, and Survival Functions of Laminin and Its Receptors in Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Journal of Cell Biology* 157 (7): 1279-90. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203073>.
- Liesi, P., I. Seppälä, et E. Trenkner. 1992. « Neuronal Migration in Cerebellar Microcultures Is Inhibited by Antibodies against a Neurite Outgrowth Domain of Laminin: Inhibition of Neuronal Migration ». *Journal of Neuroscience Research* 33 (1): 170-76. <https://doi.org/10.1002/jnr.490330122>.
- Lim, Amy H., Arminda Suli, Karina Yaniv, Brant Weinstein, Dean Y. Li, et Chi-Bin Chien. 2011. « Motoneurons Are Essential for Vascular Pathfinding ». *Development* 138 (21): 4813-4813. <https://doi.org/10.1242/dev.075044>.
- Liy, J. 2005. « Early Development of Functional Spatial Maps in the Zebrafish Olfactory Bulb ». *Journal of Neuroscience* 25 (24): 5784-95. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0922-05.2005>.
- Lodovichi, Claudia. 2021. « Topographic Organization in the Olfactory Bulb ». *Cell and Tissue Research* 383 (1): 457-72. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03348-w>.
- Lodovichi, Claudia, et Leonardo Belluscio. 2012. « Odorant Receptors in the Formation of the Olfactory Bulb Circuitry ». *Physiology* 27 (4): 200-212. <https://doi.org/10.1152/physiol.00015.2012>.
- Long, Hua, Christelle Sabatier, Le Ma, Andrew Plump, Wenlin Yuan, David M Ornitz, Atsushi Tamada, Fujio Murakami, Corey S Goodman, et Marc Tessier-Lavigne. 2004. « Conserved Roles for Slit and Robo Proteins in Midline Commissural Axon Guidance ». *Neuron* 42 (2): 213-23. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00179-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00179-5).

- Long, K., L. Moss, L. Laursen, L. Boulter, et C. French-Constant. 2016. « Integrin Signalling Regulates the Expansion of Neuroepithelial Progenitors and Neurogenesis via Wnt7a and Decorin ». *Nature Communications* 7 (1): 10354. <https://doi.org/10.1038/ncomms10354>.
- Long, Katherine R., et Wieland B. Huttner. 2019. « How the Extracellular Matrix Shapes Neural Development ». *Open Biology* 9 (1): 180216. <https://doi.org/10.1098/rsob.180216>.
- Luo, Bing-Hao, Christopher V Carman, et Timothy A Springer. 2007. « Annu Rev Immunol. Author Manuscript; Available in PMC 2007 August 27. »
- Luo, Ning, Hongda Li, Bo Xiang, Liangjun Qiao, Jiao He, Yi Ji, Yuan Liu, et al. 2016. « Syndecan-4 Modulates the Proliferation of Neural Cells and the Formation of CaP Axons during Zebrafish Embryonic Neurogenesis ». *Scientific Reports* 6 (1): 25300. <https://doi.org/10.1038/srep25300>.
- Ma, Wu, Tahereh Tavakoli, Eric Derby, Yevgeniya Serebryakova, Mahandra S Rao, et Mark P Mattson. 2008. « Cell-Extracellular Matrix Interactions Regulate Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells ». *BMC Developmental Biology* 8 (1): 90. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-90>.
- Madelaine, Romain, Laurence Garric, et Patrick Blader. 2011. « Partially Redundant Proneural Function Reveals the Importance of Timing during Zebrafish Olfactory Neurogenesis ». *Development* 138 (21): 4753-62. <https://doi.org/10.1242/dev.066563>.
- Martinez-Morales, Juan-Ramon, Florencia Cavodeassi, et Paola Bovolenta. 2017. « Coordinated Morphogenetic Mechanisms Shape the Vertebrate Eye ». *Frontiers in Neuroscience* 11 (décembre): 721. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00721>.
- McCarthy, Kevin J. 2015. « The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin ». In *Current Topics in Membranes*, 76:255-303. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.09.001>.
- McKee, Karen K., David Harrison, Stephanie Capizzi, et Peter D. Yurchenco. 2007. « Role of Laminin Terminal Globular Domains in Basement Membrane Assembly ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (29): 21437-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702963200>.
- Megason, Sean G. 2009. « In Toto Imaging of Embryogenesis with Confocal Time-Lapse Microscopy ». In *Zebrafish*, édité par Graham J. Lieschke, Andrew C. Oates, et Koichi Kawakami, 546:317-32. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-977-2_19.
- Mezu-Ndubuisi, Olachi J., et Akhil Maheshwari. 2021. « The Role of Integrins in Inflammation and Angiogenesis ». *Pediatric Research* 89 (7): 1619-26. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01177-9>.
- Miller, Alexandra M, Lydia R Maurer, Dong-Jing Zou, Stuart Firestein, et Charles A Greer. 2010. « Axon Fasciculation in the Developing Olfactory Nerve ». *Neural Development* 5 (1): 20. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-5-20>.
- Miner, Jeffrey H., Cong Li, Jacqueline L. Mudd, Gloriosa Go, et Ann E. Sutherland. 2004. « Compositional and Structural Requirements for Laminin and Basement Membranes during Mouse Embryo Implantation and Gastrulation ». *Development* 131 (10): 2247-56. <https://doi.org/10.1242/dev.01112>.
- Miner, Jeffrey H., et Peter D. Yurchenco. 2004. « LAMININ FUNCTIONS IN TISSUE MORPHOGENESIS ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20 (1): 255-84. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.094555>.
- Miyasaka, N. 2005. « Robo2 Is Required for Establishment of a Precise Glomerular Map in the Zebrafish Olfactory System ». *Development* 132 (6): 1283-93. <https://doi.org/10.1242/dev.01698>.
- Miyasaka, Nobuhiko, Holger Knaut, et Yoshihiro Yoshihara. 2007. « Cxcl12/Cxcr4

- Chemokine Signaling Is Required for Placode Assembly and Sensory Axon Pathfinding in the Zebrafish Olfactory System ». *Development* 134 (13): 2459-68. <https://doi.org/10.1242/dev.001958>.
- Miyasaka, Nobuhiko, Adrian A. Wanner, Jun Li, Julia Mack-Bucher, Christel Genoud, Yoshihiro Yoshihara, et Rainer W. Friedrich. 2013. « Functional Development of the Olfactory System in Zebrafish ». *Mechanisms of Development* 130 (6-8): 336-46. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.09.001>.
- Mombaerts, P., F. Wang, C. Dulac, S. K. Chao, A. Nemes, M. Mendelsohn, J. Edmondson, et R. Axel. 1996. « Visualizing an Olfactory Sensory Map ». *Cell* 87 (4): 675-86. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81387-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81387-2).
- Monnot, Pauline, Girisaran Gangatharan, Marion Baraban, Karen Pottin, Melody Cabrera, Isabelle Bonnet, et Marie Anne Breau. 2022. « Intertissue Mechanical Interactions Shape the Olfactory Circuit in Zebrafish ». *EMBO Reports* 23 (2). <https://doi.org/10.15252/embr.202152963>.
- Moore, Chris J., et Steve J. Winder. 2012. « The inside and out of Dystroglycan Post-Translational Modification ». *Neuromuscular Disorders* 22 (11): 959-65. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.05.016>.
- Moore, Christopher J., Huey Tse Goh, et Jane E. Hewitt. 2008. « Genes Required for Functional Glycosylation of Dystroglycan Are Conserved in Zebrafish☆☆Sequence Data from This Article Have Been Deposited with the GenBank Data Library under Accession Nos. DQ826745 (Fukutin), DQ826746 (FKRP), DQ826747 (POMGnT1), DQ826748 (POMT1), and DQ826749 (POMT2). » *Genomics* 92 (3): 159-67. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.05.008>.
- Morgan, Mark R., Martin J. Humphries, et Mark D. Bass. 2007. « Synergistic Control of Cell Adhesion by Integrins and Syndecans ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (12): 957-69. <https://doi.org/10.1038/nrm2289>.
- Münzel, Eva Jolanda, Karin Schaefer, Barbara Obirei, Elisabeth Kremmer, Edward A. Burton, Veronika Kuscha, Catherina G. Becker, Christian Brösamle, Anna Williams, et Thomas Becker. 2012. « Claudin k Is Specifically Expressed in Cells That Form Myelin during Development of the Nervous System and Regeneration of the Optic Nerve in Adult Zebrafish ». *Glia* 60 (2): 253-70. <https://doi.org/10.1002/glia.21260>.
- Murray, Patricia, et David Edgar. 2000. « Regulation of Programmed Cell Death by Basement Membranes in Embryonic Development ». *Journal of Cell Biology* 150 (5): 1215-21. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.5.1215>.
- Murshed, Monzur, Neil Smyth, Nicolai Miosge, Jörg Karolat, Thomas Krieg, Mats Paulsson, et Roswitha Nischt. 2000. « The Absence of Nidogen 1 Does Not Affect Murine Basement Membrane Formation ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (18): 7007-12. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.18.7007-7012.2000>.
- Nagase, Hideaki, et J. Frederick Woessner. 1999. « Matrix Metalloproteinases ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (31): 21491-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21491>.
- Nakai, Junichi, Masamichi Ohkura, et Keiji Imoto. 2001. « A High Signal-to-Noise Ca²⁺ Probe Composed of a Single Green Fluorescent Protein ». *Nature Biotechnology* 19 (2): 137-41. <https://doi.org/10.1038/84397>.
- Nakata, Takao, et Nobutaka Hirokawa. 2003. « Microtubules Provide Directional Cues for Polarized Axonal Transport through Interaction with Kinesin Motor Head ». *Journal of Cell Biology* 162 (6): 1045-55. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302175>.
- Nedelec, Stéphane, Caroline Dubacq, et Alain Trembleau. 2005. « Morphological and Molecular Features of the Mammalian Olfactory Sensory Neuron Axons: What Makes These Axons so Special? » *Journal of Neurocytology* 34 (1-2): 49-64. <https://doi.org/10.1007/s11068-005-5047-7>.

- Ngal, J. 1993. « The Family of Genes Encoding Odorant Receptors in the Channel Catfish ». *Cell* 72 (5): 657-66. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90395-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90395-7).
- Nguyen-Ba-Charvet, Kim T., Katja Brose, Valérie Marillat, Constantino Sotelo, Marc Tessier-Lavigne, et Alain Chédotal. 2001. « Sensory Axon Response to Substrate-Bound Slit2 Is Modulated by Laminin and Cyclic GMP ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 17 (6): 1048-58. <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.0994>.
- Nguyen-Ba-Charvet, Kim T., Andrew S. Plump, Marc Tessier-Lavigne, et Alain Chédotal. 2002. « Slit1 and Slit2 Proteins Control the Development of the Lateral Olfactory Tract ». *The Journal of Neuroscience* 22 (13): 5473-80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-13-05473.2002>.
- Nickolls, Alec R., et Carsten G. Bönnemann. 2018. « The Roles of Dystroglycan in the Nervous System: Insights from Animal Models of Muscular Dystrophy ». *Disease Models & Mechanisms* 11 (12): dmm035931. <https://doi.org/10.1242/dmm.035931>.
- Niimi, Tomoaki, Yoshitaka Hayashi, Sugiko Futaki, et Kiyotoshi Sekiguchi. 2004. « SOX7 and SOX17 Regulate the Parietal Endoderm-Specific Enhancer Activity of Mouse Laminin A1 Gene ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (36): 38055-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403724200>.
- Nirwane, Abhijit, et Yao Yao. 2019. « Laminins and Their Receptors in the CNS: Laminins and Their Receptors in the CNS ». *Biological Reviews* 94 (1): 283-306. <https://doi.org/10.1111/brv.12454>.
- Norden, Caren, Stephen Young, Brian A. Link, et William A. Harris. 2009. « Actomyosin Is the Main Driver of Interkinetic Nuclear Migration in the Retina ». *Cell* 138 (6): 1195-1208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.032>.
- Pagnon-Minot, Aurélie, Marilyne Malbouyres, Zofia Haftek-Terreau, H. Rosemary Kim, Takako Sasaki, Christine Thisse, Bernard Thisse, Philip W. Ingham, Florence Ruggiero, et Dominique Le Guellec. 2008. « Collagen XV, a Novel Factor in Zebrafish Notochord Differentiation and Muscle Development ». *Developmental Biology* 316 (1): 21-35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.12.033>.
- Park, Su-Hyeon, Sang-Yeob Yeo, Kyeong-Won Yoo, Sung-Kook Hong, Suman Lee, Myungchull Rhee, Ajay B Chitnis, et Cheol-Hee Kim. 2003. « Zath3, a Neural Basic Helix-Loop-Helix Gene, Regulates Early Neurogenesis in the Zebrafish ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308 (1): 184-90. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01353-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01353-6).
- Parsons, Michael J., Isabel Campos, Elizabeth M. A. Hirst, et Derek L. Stemple. 2002. « Removal of Dystroglycan Causes Severe Muscular Dystrophy in Zebrafish Embryos ». *Development* 129 (14): 3505-12. <https://doi.org/10.1242/dev.129.14.3505>.
- Parsons, Michael J., Steven M. Pollard, Leonor Saúde, Benjamin Feldman, Pedro Coutinho, Elizabeth M. A. Hirst, et Derek L. Stemple. 2002. « Zebrafish Mutants Identify an Essential Role for Laminins in Notochord Formation ». *Development* 129 (13): 3137-46. <https://doi.org/10.1242/dev.129.13.3137>.
- Paulsson, Mats, Peter D. Yurchenco, George C. Ruben, Jürgen Engel, et Rupert Timpl. 1987. « Structure of Low Density Heparan Sulfate Proteoglycan Isolated from a Mouse Tumor Basement Membrane ». *Journal of Molecular Biology* 197 (2): 297-313. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90125-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90125-2).
- Paulus, Jeremiah D., et Mary C. Halloran. 2006. « Zebrafishbashful/Laminin-A1 Mutants Exhibit Multiple Axon Guidance Defects ». *Developmental Dynamics* 235 (1): 213-24. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20604>.
- Plump, Andrew S., Lynda Erskine, Christelle Sabatier, Katja Brose, Charles J. Epstein, Corey S. Goodman, Carol A. Mason, et Marc Tessier-Lavigne. 2002. « Slit1 and Slit2 Cooperate to Prevent Premature Midline Crossing of Retinal Axons in the Mouse

- Visual System ». *Neuron* 33 (2): 219-32. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00586-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00586-4).
- Pollard, Steven M., Michael J. Parsons, Makoto Kamei, Ross N.W. Kettleborough, Kevin A. Thomas, Van N. Pham, Moon-Kyoung Bae, Annabelle Scott, Brant M. Weinstein, et Derek L. Stemple. 2006. « Essential and Overlapping Roles for Laminin α Chains in Notochord and Blood Vessel Formation ». *Developmental Biology* 289 (1): 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.10.006>.
- Polleux, F., et W. Snider. 2010. « Initiating and Growing an Axon ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (4): a001925-a001925. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001925>.
- Pöschl, E., U. Mayer, J. Stetefeld, R. Baumgartner, T. A. Holak, R. Huber, et R. Timpl. 1996. « Site-Directed Mutagenesis and Structural Interpretation of the Nidogen Binding Site of the Laminin Gamma1 Chain. » *The EMBO Journal* 15 (19): 5154-59. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00899.x>.
- Pozzi, Ambra, Peter D. Yurchenco, et Renato V. Iozzo. 2017. « The Nature and Biology of Basement Membranes ». *Matrix Biology* 57-58 (janvier): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.12.009>.
- Raabe, Eric H, Keiko Yoshida, et Gerald A Schwarting. 1997. « Differential Laminin Isoform Expression in the Developing Rat Olfactory System ». *Developmental Brain Research* 101 (1-2): 187-96. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(97\)00064-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00064-3).
- Randlett, Owen, Lucia Poggi, Flavio R. Zolessi, et William A. Harris. 2011. « The Oriented Emergence of Axons from Retinal Ganglion Cells Is Directed by Laminin Contact In Vivo ». *Neuron* 70 (2): 266-80. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.013>.
- Ressler, Kerry J., Susan L. Sullivan, et Linda B. Buck. 1993. « A Zonal Organization of Odorant Receptor Gene Expression in the Olfactory Epithelium ». *Cell* 73 (3): 597-609. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90145-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90145-G).
- Ricard-Blum, S. 2011. « The Collagen Family ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (1): a004978-a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
- Ricard-Blum, Sylvie, et Florence Ruggiero. 2005. « The Collagen Superfamily: From the Extracellular Matrix to the Cell Membrane ». *Pathologie Biologie* 53 (7): 430-42. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.024>.
- Richard, Marion B., Seth R. Taylor, et Charles A. Greer. 2010. « Age-Induced Disruption of Selective Olfactory Bulb Synaptic Circuits ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (35): 15613-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007931107>.
- Ries, Albert, Walter Göhring, Jay W. Fox, Rupert Timpl, et Takako Sasaki. 2001. « Recombinant Domains of Mouse Nidogen-1 and Their Binding to Basement Membrane Proteins and Monoclonal Antibodies: Binding Properties of Nidogen-1 Domains ». *European Journal of Biochemistry* 268 (19): 5119-28. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02437.x>.
- Ruoslahti, Erkki. 1996. « RGD AND OTHER RECOGNITION SEQUENCES FOR INTEGRINS ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12 (1): 697-715. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.697>.
- Sakano, Hitoshi. 2010. « Neural Map Formation in the Mouse Olfactory System ». *Neuron* 67 (4): 530-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.003>.
- Salmivirta, Katriina, Jan F. Talts, Magnus Olsson, Takako Sasaki, Rupert Timpl, et Peter Ekblom. 2002. « Binding of Mouse Nidogen-2 to Basement Membrane Components and Cells and Its Expression in Embryonic and Adult Tissues Suggest Complementary Functions of the Two Nidogens ». *Experimental Cell Research* 279 (2): 188-201. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5611>.
- Sato, Shigeru, Keiko Ikeda, Go Shioi, Haruki Ochi, Hajime Ogino, Hiroshi Yajima, et

- Kiyoshi Kawakami. 2010. « Conserved Expression of Mouse Six1 in the Pre-Placodal Region (PPR) and Identification of an Enhancer for the Rostral PPR ». *Developmental Biology* 344 (1): 158-71. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.04.029>.
- Sato, Y. 2005. « Mutually Exclusive Glomerular Innervation by Two Distinct Types of Olfactory Sensory Neurons Revealed in Transgenic Zebrafish ». *Journal of Neuroscience* 25 (20): 4889-97. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0679-05.2005>.
- Sato, Y., N. Miyasaka, et Y. Yoshihara. 2007. « Hierarchical Regulation of Odorant Receptor Gene Choice and Subsequent Axonal Projection of Olfactory Sensory Neurons in Zebrafish ». *Journal of Neuroscience* 27 (7): 1606-15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4218-06.2007>.
- Saxena, Ankur, Brian N Peng, et Marianne E Bronner. 2013. « Sox10-Dependent Neural Crest Origin of Olfactory Microvillous Neurons in Zebrafish ». *ELife* 2 (mars): e00336. <https://doi.org/10.7554/eLife.00336>.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, et J. T. Parsons. 1993. « Autonomous Expression of a Noncatalytic Domain of the Focal Adhesion-Associated Protein Tyrosine Kinase Pp125FAK ». *Molecular and Cellular Biology* 13 (2): 785-91. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.2.785-791.1993>.
- Schier, A. F., S. C. Neuhauss, M. Harvey, J. Malicki, L. Solnica-Krezel, D. Y. Stainier, F. Zwartkruis, et al. 1996. « Mutations Affecting the Development of the Embryonic Zebrafish Brain ». *Development (Cambridge, England)* 123 (décembre): 165-78. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.165>.
- Schlosser, Gerhard. 2006. « Induction and Specification of Cranial Placodes ». *Developmental Biology* 294 (2): 303-51. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.009>.
- Schwanzel-Fukuda, Marlene, David Bick, et Donald W. Pfaff. 1989. « Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH)-Expressing Cells Do Not Migrate Normally in an Inherited Hypogonadal (Kallmann) Syndrome ». *Molecular Brain Research* 6 (4): 311-26. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(89\)90076-4](https://doi.org/10.1016/0169-328X(89)90076-4).
- Seeger, Mark, Guy Tear, Dolores Ferres-Marco, et Corey S. Goodman. 1993. « Mutations Affecting Growth Cone Guidance in Drosophila: Genes Necessary for Guidance toward or Away from the Midline ». *Neuron* 10 (3): 409-26. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90330-T](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90330-T).
- Semina, Elena V., Dmitry V. Bosenko, Natalya C. Zinkevich, Kelly A. Soules, David R. Hyde, Thomas S. Vihtelic, Gregory B. Willer, Ronald G. Gregg, et Brian A. Link. 2006. « Mutations in Laminin Alpha 1 Result in Complex, Lens-Independent Ocular Phenotypes in Zebrafish ». *Developmental Biology* 299 (1): 63-77. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.005>.
- Serafini, Tito, Timothy E. Kennedy, Michael J. Gaiko, Christine Mirzayan, Thomas M. Jessell, et Marc Tessier-Lavigne. 1994. « The Netrins Define a Family of Axon Outgrowth-Promoting Proteins Homologous to C. Elegans UNC-6 ». *Cell* 78 (3): 409-24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90420-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90420-0).
- Shao, Xin, Vanisha Lakhina, Puneet Dang, Ryan P. Cheng, Christina L. Marcaccio, et Jonathan A. Raper. 2017. « Olfactory Sensory Axons Target Specific Protoglomeruli in the Olfactory Bulb of Zebrafish ». *Neural Development* 12 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/s13064-017-0095-0>.
- Shay, Elaine L., Charles A. Greer, et Helen B. Treloar. 2008. « Dynamic Expression Patterns of ECM Molecules in the Developing Mouse Olfactory Pathway ». *Developmental Dynamics* 237 (7): 1837-50. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21595>.
- Simon-Assmann, P, F Bouziges, J N Freund, F Perrin-Schmitt, et M Kedinger. 1990. « Type IV Collagen mRNA Accumulates in the Mesenchymal Compartment at Early Stages of Murine Developing Intestine. » *Journal of Cell Biology* 110 (3): 849-57.

- <https://doi.org/10.1083/jcb.110.3.849>.
- Sittaramane, Vinoth, Anagha Sawant, Marc A. Wolman, Lisa Maves, Mary C. Halloran, et Anand Chandrasekhar. 2009. « The Cell Adhesion Molecule Tag1, Transmembrane Protein Stbm/Vangl2, and Laminin α 1 Exhibit Genetic Interactions during Migration of Facial Branchiomotor Neurons in Zebrafish ». *Developmental Biology* 325 (2): 363-73. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.030>.
- Smith, Simone M.-L., Leigh A. West, Prasanthi Govindraj, Xiuqin Zhang, David M. Ornitz, et John R. Hassell. 2007. « Heparan and Chondroitin Sulfate on Growth Plate Perlecan Mediate Binding and Delivery of FGF-2 to FGF Receptors ». *Matrix Biology* 26 (3): 175-84. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.012>.
- Smyth, Neil, H. Seda Vatansever, Patricia Murray, Michael Meyer, Christian Frie, Mats Paulsson, et David Edgar. 1999. « Absence of Basement Membranes after Targeting the LAMC1 Gene Results in Embryonic Lethality Due to Failure of Endoderm Differentiation ». *Journal of Cell Biology* 144 (1): 151-60. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.1.151>.
- Soans, Karen G., Ana Patricia Ramos, Jaydeep Sidhaye, Abhijeet Krishna, Anastasia Solomatina, Karl B. Hoffmann, Raimund Schlüßler, et al. 2022. « Matrix Topology Guides Collective Cell Migration *in Vivo* ». Preprint. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/2022.01.31.478442>.
- Song, Hong-jun, Guo-li Ming, et Mu-ming Poo. 1997. « CAMP-Induced Switching in Turning Direction of Nerve Growth Cones ». *Nature* 388 (6639): 275-79. <https://doi.org/10.1038/40864>.
- Steele, Theresa J., Aaron J. Lanz, et Katherine I. Nagel. 2023. « Olfactory Navigation in Arthropods ». *Journal of Comparative Physiology A*, janvier. <https://doi.org/10.1007/s00359-022-01611-9>.
- Stemple, D. L., L. Solnica-Krezel, F. Zwartkuis, S. C. Neuhauss, A. F. Schier, J. Malicki, D. Y. Stainier, et al. 1996. « Mutations Affecting Development of the Notochord in Zebrafish ». *Development (Cambridge, England)* 123 (décembre): 117-28. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.117>.
- Streit, Andrea. 2004. « Early Development of the Cranial Sensory Nervous System: From a Common Field to Individual Placodes ». *Developmental Biology* 276 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.037>.
- Sweeney, Elizabeth, Douglas Roberts, Tina Corbo, et Olena Jacenko. 2010. « Congenic Mice Confirm That Collagen X Is Required for Proper Hematopoietic Development ». Édité par Catherine M. Verfaillie. *PLoS ONE* 5 (3): e9518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009518>.
- Swenarchuk, Lauren. 2019. « Nerve, Muscle, and Synaptogenesis ». *Cells* 8 (11): 1448. <https://doi.org/10.3390/cells8111448>.
- Sztaf, Tamar, Silke Berger, Peter D. Currie, et Thomas E. Hall. 2011. « Characterization of the Laminin Gene Family and Evolution in Zebrafish ». *Developmental Dynamics* 240 (2): 422-31. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22537>.
- Takada, Yoshikazu, Xiaojing Ye, et Scott Simon. 2007. « The Integrins ». *Genome Biology* 8 (5): 215. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>.
- Takano, Tetsuya, Chundi Xu, Yasuhiro Funahashi, Takashi Namba, et Kozo Kaibuchi. 2015. « Neuronal Polarization ». *Development* 142 (12): 2088-93. <https://doi.org/10.1242/dev.114454>.
- Takeuchi, Miki, Shingo Yamaguchi, Shigenobu Yonemura, Kisa Kakiguchi, Yoshikatsu Sato, Tetsuya Higashiyama, Takashi Shimizu, et Masahiko Hibi. 2015. « Type IV Collagen Controls the Axogenesis of Cerebellar Granule Cells by Regulating Basement Membrane Integrity in Zebrafish ». Édité par Cecilia Moens. *PLOS Genetics* 11 (10):

- e1005587. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005587>.
- Thomas, T., et M. Dziadek. 1993. « Genes Coding for Basement Membrane Glycoproteins Laminin, Nidogen, and Collagen IV Are Differentially Expressed in the Nervous System and by Epithelial, Endothelial, and Mesenchymal Cells of the Mouse Embryo ». *Experimental Cell Research* 208 (1): 54-67. <https://doi.org/10.1006/excr.1993.1222>.
- Timpl, R. 1993. « Proteoglycans of Basement Membranes ». *Experientia* 49 (5): 417-28. <https://doi.org/10.1007/BF01923586>.
- Timpl, R., H. Rohde, P.G. Robey, S.I. Rennard, J.M. Foidart, et G.R. Martin. 1979. « Laminin—a Glycoprotein from Basement Membranes. » *Journal of Biological Chemistry* 254 (19): 9933-37. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83607-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83607-4).
- Timpl, Rupert, Marie Dziadek, Sakuhei Fujiwara, Hans Nowack, et Georg Wick. 1983. « Nidogen: A New, Self-Aggregating Basement Membrane Protein ». *European Journal of Biochemistry* 137 (3): 455-65. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07849.x>.
- Tisay, Katarina T., et Brian Key. 1999. « The Extracellular Matrix Modulates Olfactory Neurite Outgrowth on Ensheathing Cells ». *The Journal of Neuroscience* 19 (22): 9890-99. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-22-09890.1999>.
- Torres-Paz, Jorge, Eugene M. Tine, et Kathleen E. Whitlock. 2021. « Dissecting the Neural Divide: A Continuous Neurectoderm Gives Rise to the Olfactory Placode and Bulb ». *The International Journal of Developmental Biology* 65 (4-5-6): 275-87. <https://doi.org/10.1387/ijdb.200097kw>.
- Torres-Paz, Jorge, et Kathleen E. Whitlock. 2014. « Olfactory Sensory System Develops from Coordinated Movements within the Neural Plate: Neurectoderm and the Peripheral Nervous System ». *Developmental Dynamics* 243 (12): 1619-31. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24194>.
- Treloar, H. B., V. Nurcombe, et B. Key. 1996. « Expression of Extracellular Matrix Molecules in the Embryonic Rat Olfactory Pathway ». *Journal of Neurobiology* 31 (1): 41-55. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199609\)31:1<41::AID-NEU4>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199609)31:1<41::AID-NEU4>3.0.CO;2-F).
- Treloar, Helen B., Paul Feinstein, Peter Mombaerts, et Charles A. Greer. 2002. « Specificity of Glomerular Targeting by Olfactory Sensory Axons ». *The Journal of Neuroscience* 22 (7): 2469-77. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02469.2002>.
- Treloar, Helen B., Alexandra M. Miller, Arundhati Ray, et Charles A. Greer. 2010. « Development of the Olfactory System ». In *The Neurobiology of Olfaction*, édité par Anna Menini. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55972/>.
- Tufo, Candida, Subathra Poopalasundaram, Ana Dorrego-Rivas, Marc C. Ford, Anthony Graham, et Matthew S. Grubb. 2022. « Development of the Mammalian Main Olfactory Bulb ». *Development* 149 (3): dev200210. <https://doi.org/10.1242/dev.200210>.
- Urbano, Jose M., Catherine N. Torgler, Cristina Molnar, Ulrich Tepass, Ana López-Varea, Nicholas H. Brown, Jose F. de Celis, et Maria D. Martín-Bermudo. 2009. « *Drosophila* Laminins Act as Key Regulators of Basement Membrane Assembly and Morphogenesis ». *Development* 136 (24): 4165-76. <https://doi.org/10.1242/dev.044263>.
- Vassar, Robert, John Ngai, et Richard Axel. 1993. « Spatial Segregation of Odorant Receptor Expression in the Mammalian Olfactory Epithelium ». *Cell* 74 (2): 309-18. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90422-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90422-M).
- Vecino, Elena, et Jessica C.F. Kwok. 2016. « The Extracellular Matrix in the Nervous

- System: The Good and the Bad Aspects ». In *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body*, édité par Francesco Travascio. InTech. <https://doi.org/10.5772/62527>.
- W. Pan, Jia. 2013. « Mechanisms of Development and Evolution of the Insect Olfactory System ». *Cell & Developmental Biology* 02 (04). <https://doi.org/10.4172/2168-9296.1000130>.
- Walma, David A. Cruz, et Kenneth M. Yamada. 2020. « The Extracellular Matrix in Development ». *Development* 147 (10): dev175596. <https://doi.org/10.1242/dev.175596>.
- Wang, Xin, Liping Li, et Dong Liu. 2014. « Expression Analysis of Integrin B1 Isoforms during Zebrafish Embryonic Development ». *Gene Expression Patterns* 16 (2): 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2014.10.001>.
- Wang, Zhaoqing, Qingji Xu, Nengwei Zhang, Xuemei Du, Guangzhong Xu, et Xiyun Yan. 2020. « CD146, from a Melanoma Cell Adhesion Molecule to a Signaling Receptor ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 148. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00259-8>.
- Weinl, Christine, Uwe Drescher, Susanne Lang, Friedrich Bonhoeffer, et Jürgen Löschinger. 2003. « On the Turning of *Xenopus* Retinal Axons Induced by Ephrin-A5 ». *Development* 130 (8): 1635-43. <https://doi.org/10.1242/dev.00386>.
- Weth, Franco, Walter Nadler, et Sigrun Korsching. 1996. « Nested Expression Domains for Odorant Receptors in Zebrafish Olfactory Epithelium ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (23): 13321-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13321>.
- Whitesides, John G., et Anthony-Samuel LaMantia. 1996. « Differential Adhesion and the Initial Assembly of the Mammalian Olfactory Nerve ». *The Journal of Comparative Neurology* 373 (2): 240-54. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960916\)373:2<240::AID-CNE7>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960916)373:2<240::AID-CNE7>3.0.CO;2-3).
- Whitley, Matthew, Helen Treloar, Adele De Arcangelis, Elisabeth Georges Labouesse, et Charles A. Greer. 2005. « The A6 Integrin Subunit in the Developing Mouse Olfactory Bulb ». *Journal of Neurocytology* 34 (1-2): 81-96. <https://doi.org/10.1007/s11068-005-5049-5>.
- Whitlock, Kathleen E., et Monte Westerfield. 1998. « A Transient Population of Neurons Pioneers the Olfactory Pathway in the Zebrafish ». *The Journal of Neuroscience* 18 (21): 8919-27. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08919.1998>.
- . 2000. « The Olfactory Placodes of the Zebrafish Form by Convergence of Cellular Fields at the Edge of the Neural Plate ». *Development* 127 (17): 3645-53. <https://doi.org/10.1242/dev.127.17.3645>.
- Whitlock, K.E. 2008. « Developing a Sense of Scents: Plasticity in Olfactory Placode Formation ». *Brain Research Bulletin* 75 (2-4): 340-47. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.10.054>.
- Whitlock, K.E, C.D Wolf, et M.L Boyce. 2003. « Gonadotropin-Releasing Hormone (Gnrh) Cells Arise from Cranial Neural Crest and Adenohypophyseal Regions of the Neural Plate in the Zebrafish, *Danio Rerio* ». *Developmental Biology* 257 (1): 140-52. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00039-3).
- Williamson, Roger A., Michael D. Henry, Karla J. Daniels, Ronald F. Hrstka, Jane C. Lee, Yoshihide Sunada, Oxana Ibraghimov-Beskrovnaya, et Kevin P. Campbell. 1997. « Dystroglycan Is Essential for Early Embryonic Development: Disruption of Reichert's Membrane in *Dag1*-Null Mice ». *Human Molecular Genetics* 6 (6): 831-41. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.6.831>.
- Willis, Cory M., et Stephen J. Crocker. 2016. « The Mosaic of Extracellular Matrix in the

- Central Nervous System as a Determinant of Glial Heterogeneity ». In *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body*, édité par Francesco Travascio. InTech. <https://doi.org/10.5772/62706>.
- Wolman, Marc A, Vinoth K Sittaramane, Jeffrey J Essner, H Joseph Yost, Anand Chandrasekhar, et Mary C Halloran. 2008. « Transient Axonal Glycoprotein-1 (TAG-1) and Laminin-A1 Regulate Dynamic Growth Cone Behaviors and Initial Axon Direction in Vivo ». *Neural Development* 3 (1): 6. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-6>.
- Wright, Kevin M., Krissy A. Lyon, Haiwen Leung, Daniel J. Leahy, Le Ma, et David D. Ginty. 2012. « Dystroglycan Organizes Axon Guidance Cue Localization and Axonal Pathfinding ». *Neuron* 76 (5): 931-44. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.009>.
- Wu, Xin, et Doodipala Samba Reddy. 2012. « Integrins as Receptor Targets for Neurological Disorders ». *Pharmacology & Therapeutics* 134 (1): 68-81. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.12.008>.
- Wu, Yuexin, et Gaoxiang Ge. 2019. « Complexity of Type IV Collagens: From Network Assembly to Function ». *Biological Chemistry* 400 (5): 565-74. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0317>.
- Xian, Xiaojie, Sandeep Gopal, et John R. Couchman. 2010. « Syndecans as Receptors and Organizers of the Extracellular Matrix ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 31-46. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0829-3>.
- Xiao, Tong, et Herwig Baier. 2007. « Lamina-Specific Axonal Projections in the Zebrafish Tectum Require the Type IV Collagen Dagnet ». *Nature Neuroscience* 10 (12): 1529-37. <https://doi.org/10.1038/nn2002>.
- Yamaguchi, Naoya, Ziyi Zhang, Teseo Schneider, Biran Wang, Daniele Panozzo, et Holger Knaut. 2022. « Rear Traction Forces Drive Adherent Tissue Migration in Vivo ». *Nature Cell Biology* 24 (2): 194-204. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00844-9>.
- Yan, Hua, Shadi Jafari, Gregory Pask, Xiaofan Zhou, Danny Reinberg, et Claude Desplan. 2020. « Evolution, Developmental Expression and Function of Odorant Receptors in Insects ». Édité par Michael H. Dickinson, Leslie B. Vosshall, et Julian A. T. Dow. *Journal of Experimental Biology* 223 (Suppl_1): jeb208215. <https://doi.org/10.1242/jeb.208215>.
- Yang, Dongren, Jesse Bierman, Yukie S. Tarumi, Yong-Ping Zhong, Reshma Rangwala, Thomas M. Proctor, Yuko Miyagoe-Suzuki, et al. 2005. « Coordinate Control of Axon Defasciculation and Myelination by Laminin-2 and -8 ». *Journal of Cell Biology* 168 (4): 655-66. <https://doi.org/10.1083/jcb.200411158>.
- Yanicostas, Constantin, Sylvain Ernest, Cyrielle Dayraud, Christine Petit, et Nadia Soussi-Yanicostas. 2008. « Essential Requirement for Zebrafish Anosmin-1a in the Migration of the Posterior Lateral Line Primordium ». *Developmental Biology* 320 (2): 469-79. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.008>.
- Yanicostas, Constantin, Eric Herbomel, Aurélie Dipietromaria, et Nadia Soussi-Yanicostas. 2009. « Anosmin-1a Is Required for Fasciculation and Terminal Targeting of Olfactory Sensory Neuron Axons in the Zebrafish Olfactory System ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 312 (1-2): 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.017>.
- Yao, Yao. 2017. « Laminin: Loss-of-Function Studies ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (6): 1095-1115. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2381-0>.
- Yeo, Sang-Yeob, Toshio Miyashita, Cornelia Fricke, Melissa H. Little, Toshiya Yamada, John Y. Kuwada, Tae-Lin Huh, Chi-Bin Chien, et Hitoshi Okamoto. 2004. « Involvement of Islet-2 in the Slit Signaling for Axonal Branching and Defasciculation of the Sensory Neurons in Embryonic Zebrafish ». *Mechanisms of Development* 121 (4): 315-24. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.03.006>.

- Yoshida, Tomoyuki, Aya Ito, Naoto Matsuda, et Masayoshi Mishina. 2002. « Regulation by Protein Kinase A Switching of Axonal Pathfinding of Zebrafish Olfactory Sensory Neurons through the Olfactory Placode–Olfactory Bulb Boundary ». *The Journal of Neuroscience* 22 (12): 4964-72. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-12-04964.2002>.
- Yoshida-Moriguchi, Takako, Liping Yu, Stephanie H. Stalnakker, Sarah Davis, Stefan Kunz, Michael Madson, Michael B. A. Oldstone, Harry Schachter, Lance Wells, et Kevin P. Campbell. 2010. « O -Mannosyl Phosphorylation of Alpha-Dystroglycan Is Required for Laminin Binding ». *Science* 327 (5961): 88-92. <https://doi.org/10.1126/science.1180512>.
- Yoshihara, Y. 2008. « Molecular Genetic Dissection of the Zebrafish Olfactory System ». In *Chemosensory Systems in Mammals, Fishes, and Insects*, édité par Sigrun Korsching et Wolfgang Meyerhof, 47:1-19. Results and Problems in Cell Differentiation. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/400_2008_1.
- Yurchenco, P. D. 2011. « Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (2): a004911-a004911. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004911>.
- Yurchenco, Peter D., et Julian J. O’Rear. 1994. « Basal Lamina Assembly ». *Current Opinion in Cell Biology* 6 (5): 674-81. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90093-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90093-0).
- Zhang, G., B. B. Young, Y. Ezura, M. Favata, L. J. Soslowky, S. Chakravarti, et D. E. Birk. 2005. « Development of Tendon Structure and Function: Regulation of Collagen Fibrillogenesis ». *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 5 (1): 5-21.
- Zhang, Jin-Li, Stefania Richetti, Thomas Ramezani, Daniela Welcker, Steffen Lütke, Hans-Martin Pogoda, Julia Hatzold, et al. 2022. « Vertebrate Extracellular Matrix Protein Hemicentin-1 Interacts Physically and Genetically with Basement Membrane Protein Nidogen-2 ». *Matrix Biology* 112 (septembre): 132-54. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2022.08.009>.
- Zhao, Zhilei, et Carolyn S. McBride. 2020. « Evolution of Olfactory Circuits in Insects ». *Journal of Comparative Physiology A* 206 (3): 353-67. <https://doi.org/10.1007/s00359-020-01399-6>.
- Zhou, Sheng, Song Chen, Yixuan Amy Pei, et Ming Pei. 2022. « Nidogen: A Matrix Protein with Potential Roles in Musculoskeletal Tissue Regeneration ». *Genes & Diseases* 9 (3): 598-609. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.03.004>.
- Zhu, Peipei, Zhipeng Ma, Liwei Guo, Wei Zhang, Qinghe Zhang, Ting Zhao, Kunpeng Jiang, Jinrong Peng, et Jun Chen. 2017. « Short Body Length Phenotype Is Compensated by the Upregulation of Nidogen Family Members in a Deleterious Nid1a Mutation of Zebrafish ». *Journal of Genetics and Genomics* 44 (11): 553-56. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2017.09.011>.
- Zoeller, Jason J., Angela McQuillan, John Whitelock, Shiu-Ying Ho, et Renato V. Iozzo. 2008. « A Central Function for Perlecan in Skeletal Muscle and Cardiovascular Development ». *Journal of Cell Biology* 181 (2): 381-94. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708022>.
- Zoeller, Jason J., John M. Whitelock, et Renato V. Iozzo. 2009. « Perlecan Regulates Developmental Angiogenesis by Modulating the VEGF-VEGFR2 Axis ». *Matrix Biology* 28 (5): 284-91. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.04.010>.

Liste des figures

- Figure 1 : Schéma représentant la structure et les principaux composants des membranes basales (tirée de Hohenester et Yurchenco 2013). 25
- Figure 2 : Schéma de l'isoforme 111 de la Laminine composée des chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ (tirée de Hohenester 2019). 26
- Figure 3 : Phylogramme des séquences protéiques de la Laminine chez le poisson-zèbre (Dr), la souris (Mm) et l'Homme (Hs) (tirée de Sztal et al. 2011). 27
- Figure 4 : Schéma représentant les différentes isoformes connues de la Laminine chez les mammifères et leur structure (tirée de Durbeej 2010). 28
- Figure 5 : Expression maternelle des gènes *lamB1* et *lamC1* chez le poisson-zèbre, détectée par hybridation *in situ* (tirée de Parsons et al. 2002). 32
- Figure 6 : Expression de la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine visualisée grâce à la lignée transgénique *TgBAC(lamC1:lamC1-sfGFP)* à 28 hpf (barre d'échelle 0,5 mm) (tirée de Yamaguchi et al. 2022). 33
- Figure 7 : Organisation en triple hélice du Collagène (exemple de différentes isoformes de Collagène IV) (adaptée de Wu et Ge 2019). 35
- Figure 8 : Organisation en fibrilles et en réseaux des Collagènes fibrillaires et des collagènes formant des réseaux (exemple du Collagène IV) (adaptée de S. Ricard-Blum 2011). 36
- Figure 9 : Expression de l'ARNm des six gènes de Collagène IV chez le poisson-zèbre (tirée de Carrara et al. 2019). 38
- Figure 10 : Structure des différents homologues du Nidogène chez le poisson-zèbre (tirée de Zhu et al. 2017). 40

- Figure 11 : Expression du Nidogène chez le poisson-zèbre visualisé par hybridation *in situ* (tirée de Carrara et al. 2019). 42
- Figure 12 : Structure des trois protéoglycans faisant partie des membranes basales, le Perlécan, l'Aggrine et le Collagène XVIII (et XV, non représenté ici mais ayant une structure similaire) (tirée de Iozzo et Schaefer 2015). 45
- Figure 13 : Structure des Intégrines (tirée de Luo, Carman, et Springer 2007). 47
- Figure 14 : Schéma des conformations inactive (gauche) et active (droite) des Intégrines ainsi que certaines voies de signalisation impliquées (tirée de Cheah et Andrews 2018). 50
- Figure 15 : Schéma du Dystroglycan et de ses liaisons avec les composés intra et extracellulaires (tirée de Nickolls et Bönnemann 2018). 55
- Figure 16 : Les défauts de la coupe optique chez les mutants *bal^{UW1} (lama1^{UW1})* révélés par imagerie *live* (tirée de Bryan, Chien, et Kwan 2016). 61
- Figure 17 : Les étapes de la polarisation des neurones hippocampaux de souris *in vitro* (tirée de Polleux et Snider 2010). 65
- Figure 18 : Schéma illustrant l'émergence des axones des RGC *in vivo* chez le poisson-zèbre, en condition contrôle et en absence de Laminine $\alpha 1$ (tirée de Randlett et al. 2011). 66
- Figure 19 : Schéma du système olfactif de la souris (tirée de Nedelec, Dubacq, et Trembleau 2005). 73
- Figure 20 : Représentation schématique montrant les similarités entre l'organe sensoriel olfactif des mammifères et des insectes (tirée de (Kaupp 2010). 75
- Figure 21 : Organisation du circuit olfactif des insectes (tirée de Zhao et McBride 2020). 78
- Figure 22 : Schéma montrant l'organisation similaire des projections sensorielles olfactives des vertébrés et des "invertébrés". 79

Figure 23 : Schéma représentant le système olfactif chez le poisson-zèbre adulte (tirée de (Calvo-Ochoa et Byrd-Jacobs 2019).	82
Figure 24 : Représentation schématique du système olfactif avant puis après la coalescence de la placode (tirée de Whitlock et Westerfield 2000).	86
Figure 25 : Le déplacement antéro-postérieur (mouvement de convergence) des cellules de l'OP) se fait de manière active tandis que le déplacement latéral est passif (adaptée de Breau et al. 2017).	87
Figure 26 : Schéma récapitulatif du développement de la placode olfactive (OP) (tirée de Miyasaka et al. 2013).	91
Figure 27 : Schéma représentant le mouvement de flexure céphalique chez le poisson-zèbre (adaptée de Hauptmann et Gerster 2000).	96
Figure 28 : Les étapes du développement du système olfactif du poisson-zèbre.	97
Figure 29 : Schéma du modèle actuel décrivant la mise en place des projections des axones sensoriels olfactifs entre 24 et 54 hpf (tirée de Whitlock et Westerfield 1998).	102
Figure 30 : Schéma représentant la navigation des axones des neurones pionniers et des OSN vers l'OB et les mécanismes moléculaires impliqués (tirée de Miyasaka et al. 2013).	104
Figure 31 : Représentation schématique des domaines d'expression des gènes des ligands Slits et Nétrines.	107
Figure 32 : Projections des OSN ciliés et des OSN à microvillosités à 72 hpf dans les protoglomerules (tirée de Cheng et al. 2022).	114
Figure 33 : Effets de la mutation des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 5$ du Collagène IV sur le développement du système olfactif.	172

Figure 34 : Effets de l'expression d'un récepteur dominant négatif de la kinase FAK sur le développement du système olfactif. 176

Figure 35 : Effets de l'expression de dominants négatifs (DN) ou de formes constitutivement actives (CA) de RhoA et Rac1 sur le développement du système olfactif. 178

Figure 36 : Tentative de sauvetage du phénotype *sly* par croisement avec une lignée transgénique exprimant la chaîne $\gamma 1$ de la Laminine. 180

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau montrant l'expression des gènes de la Laminine chez le poisson-zèbre à différents stades de développement, déterminée par hybridation *in situ* (tiré de Sztal et al. 2011). 31

Tableau 2 : Les gènes des Intégrines présents dans le génome du poisson-zèbre (tiré de Takada, Ye, et Simon 2007). 48

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents outils permettant de visualiser les OSN et/ou leurs axones, ainsi que des mécanismes mis en évidence grâce à ces outils. 99